

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS**  
**À SAÚDE DO ADULTO**

**JESSICA DINIZ PEREIRA**

**microRNAs NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO ASSOCIADOS À  
DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E ANÁLISE DE  
VIAS USANDO A ABORDAGEM DE APRENDIZADO DE MÁQUINA**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

JESSICA DINIZ PEREIRA

**microRNAs NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO ASSOCIADOS À  
DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E ANÁLISE DE  
VIAS USANDO A ABORDAGEM DE APRENDIZADO DE MÁQUINA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Aplicadas  
à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito para obtenção do título de  
mestre em Ciências Aplicadas  
à Saúde do Adulto.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes  
Borges

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Michelle Teodoro Alves

**BELO HORIZONTE**

**2023**

P436m Pereira, Jéssica Diniz.  
MicroRNAs no Líquido cefalorraquidiano associados à Doença de Alzheimer [recurso eletrônico]: uma revisão sistemática e análise de vias usando a abordagem de aprendizado de máquina / Jéssica Diniz Pereira. - - Belo Horizonte: 2023.  
139f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientadora: Karina Braga Gomes Borges.  
Coorientadora: Michelle Teodoro Alves.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Doença de Alzheimer/diagnóstico. 2. **MicroRNAs**. 3. Biomarcadores. 4. Aprendizado de Máquina. 5. Dissertação Acadêmica. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Alves, Michelle Teodoro. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WT 156

Bibliotecário responsável: Monaliza Maria da Silveira Caires Lima CRB-6/1707



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**microRNAs NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO ASSOCIADOS À DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E ANÁLISE DE VIAS USANDO A ABORDAGEM DE APRENDIZADO DE MÁQUINA**

**JESSICA DINIZ PEREIRA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia seis de julho de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Karina Braga Gomes Borges - Orientadora  
UFMG

Michelle Teodoro Alves Vieira - Coorientadora  
HEMOMINAS

Frederico Marianetti Soriani  
UFMG

Maria Aparecida Camargos Bicalho  
UFMG

Belo Horizonte, 6 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Teodoro Alves Vieira, Usuário Externo**, em 07/07/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 07/07/2023, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 08/07/2023, às 08:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Camargos Bicalho, Professora do Magistério Superior**, em 09/07/2023, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2428252** e o código CRC **A70E9EA3**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos e oportunidades concedidas ao longo desta jornada. Gostaria de expressar minha sincera gratidão e reconhecimento a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa trajetória, contribuindo para o sucesso da minha dissertação. Aos meus pais, José e Leda, cujo amor incondicional, apoio e encorajamento foram fundamentais para eu chegar até aqui. Vocês são minha fonte constante de inspiração e força, e sou grata por tudo o que fizeram por mim. A Alexandre e Fátima, meu companheiro e minha segunda mãe, o apoio de vocês foi fundamental para enfrentar desafios com coragem e determinação. Agradeço por estarem ao meu lado e compartilharem essa jornada comigo. Aos meus queridos irmãos e amigos, antigos e novos, que compreendem a minha ausência e vibram de coração aberto a cada conquista alcançada. Sei que, apesar da distância que a minha dedicação exigiu, vocês sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso e comemorando cada etapa vencida. Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora Karina Braga sua expertise, orientação e paciência foram inestimáveis para o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço também pelo acolhimento e carinho. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que participaram e contribuíram para este trabalho. Também gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, à Faculdade de Medicina e à Universidade Federal de Minas Gerais.

## RESUMO

O aumento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional têm contribuído para o crescimento da prevalência da doença de Alzheimer (DA), uma vez que o envelhecimento é um dos fatores de risco para o desenvolvimento da forma esporádica da doença. O diagnóstico da DA é essencialmente baseado na avaliação clínica e requer a experiência de profissionais altamente treinados para um diagnóstico conclusivo. No entanto, devido à complexidade da doença e à necessidade de métodos mais precisos, a pesquisa por biomarcadores tem ganhado uma crescente importância. Nos últimos tempos, tem-se observado um aumento significativo no interesse pelo papel dos microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão gênica e sua associação com a DA. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que desempenham um papel crucial na regulação de processos celulares. Vários miRNAs foram identificados como potenciais marcadores para o diagnóstico e progressão da DA. O presente estudo objetivou realizar uma busca por miRNAs diferencialmente expressos em líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DA comparados a indivíduos cognitivamente saudáveis, a partir de banco de dados públicos e usando ferramentas de aprendizado de máquina, com validação dos resultados em uma revisão sistemática e a proposição de vias biológicas reguladas. Para isso, a primeira busca foi realizada na plataforma GEO Database e aplicado o algoritmo LightGBM. Posteriormente, a revisão sistemática foi realizada utilizando o PECO – população (P): indivíduos idosos, exposição (E): doença de Alzheimer (C): indivíduos cognitivamente saudáveis, desfecho ou outcome (O): miRNAs diferencialmente expressos no líquido, usando os repositórios eletrônicos: MEDLINE/PubMed (Medical Literature Analysis and Retrieve System Online), Scopus, Cinahl, Web of Science e Embase. A análise de vias foi feita no miRTarBase. Após a sobreposição dos resultados obtidos pelo algoritmo e pela revisão sistemática, foram identificados sete miRNAs mais diferencialmente expressos no líquido de indivíduos com DA: miRNA-1274a, miRNA-193a-5p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-145, miRNA-19b e miRNA-143. Na análise de enriquecimento de vias, foram identificadas: resposta ao dano no DNA por ATM, sinalização ERBB, sinalização de mensageiro secundário

intracelular, sinalização MAPK e sinalização TGF-beta, as quais possuem participação na fisiopatologia da DA. Os resultados sugerem que os miRNA-1274a, miRNA-193a-5p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-145, miRNA-19b e miRNA-143 podem estar envolvidos nos mecanismos moleculares e nas vias biológicas envolvidas na doença e podem ser no futuro alvos terapêuticos para a DA.

**Palavras chaves:** doença de Alzheimer; mirnas; biomarcadores; revisão sistemática; vias biológicas; aprendizado de máquina.

## ABSTRACT

The increase in life expectancy and the aging population have contributed to the growth in the prevalence of Alzheimer's disease (AD), as aging is one of the risk factors for the development of the sporadic form of the disease. The diagnosis of AD is primarily based on clinical evaluation and requires the expertise of highly trained professionals for a conclusive diagnosis. However, due to the complexity of the disease and the need for more precise methods, research on biomarkers has gained increasing importance. In recent times, there has been a significant increase in interest in the role of microRNAs (miRNAs) in gene expression regulation and their association with AD. MiRNAs are small non-coding RNA molecules that play a crucial role in regulating cellular processes. Several miRNAs have been identified as potential markers for the diagnosis and progression of AD. This study aimed to search for differentially expressed miRNAs in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients compared to cognitively healthy individuals using public databases and machine learning tools, with the validation of the results in a systematic review and the proposal of regulated biological pathways. To do this, the initial search was conducted on the GEO Database platform, and the LightGBM algorithm was applied. Subsequently, the systematic review was performed using the PECO framework – Population (P): elderly individuals, Exposure (E): Alzheimer's disease, Control (C): cognitively healthy individuals, Outcome (O): differentially expressed miRNAs in CSF, utilizing the electronic repositories: MEDLINE/PubMed, Scopus, Cinahl, Web of Science, and Embase. Pathway analysis was conducted using miRTarBase. After overlapping the results obtained by the algorithm and the systematic review, seven miRNAs were identified as the most differentially expressed in the CSF of individuals with AD: miRNA-1274a, miRNA-193a-5p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-145, miRNA-19b, and miRNA-143. In the pathway enrichment analysis, the following pathways were identified: DNA damage response by ATM, ERBB signaling, intracellular second messenger signaling, MAPK signaling, and TGF-beta signaling, all of which have a role in the pathophysiology of AD. The results suggest that miRNA-1274a, miRNA-193a-5p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-145, miRNA-19b, and miRNA-143 may be involved in the molecular mechanisms and biological pathways

associated with the disease and could potentially serve as therapeutic targets for AD in the future.

**Keywords:** alzheimer's disease; mirnas; biomarkers; systematic review; biological pathways; machine learning.

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- ABP - Placas beta amiloides
- ADP - Adenosina Difosfato
- AGO - Proteína Argonauta (*Argonaute Protein*)
- ApoA1 - Apolipoproteína A1
- ApoB - Apolipoproteína B
- ApoC1 - Apolipoproteína C1
- APOER2 - Receptor da Apolipoproteína E 2 (*Apolipoprotein E Receptor 2*)
- ApoJ - Apolipoproteína J
- ApoE - Apolipoproteína E
- APP - Proteína Precursora Amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)
- ATP - Adenosina Trifosfato
- A $\beta$  - Peptídeo  $\beta$ -amilóide (*Beta-amyloid Peptide*)
- BACE - Beta-secretase 1 (*Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme*)
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CCL - Quimiocina ligante do motivo C-C (*Chemokine (C-C motif) ligand*)
- CCL - Comprometimento cognitivo leve
- CCL1 - CC motif quimiocina ligante 1 (*CC motif chemokine ligand 1*)
- CCL5 - CC motif quimiocina ligante 5 (*CC motif chemokine ligand 5*)
- CD14 - Antígeno de superfície celular mielóide 14 (*Cluster of Differentiation 14*)
- CD33 - Antígeno de superfície celular mielóide 33 (*Cluster of Differentiation 33*)
- CD36 - Antígeno de superfície celular mielóide 36 (*Cluster of Differentiation 36*)
- CD47 - Antígeno de superfície celular mielóide 47 (*Cluster of Differentiation 47*)
- cdk5 - Proteína quinase dependente de ciclina 5 (*Cyclin-Dependent Kinase 5*)
- CXCL1 - CXC motif quimiocina ligante 1 (*Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1*)
- DA - Doença de Alzheimer
- DGCR8 - Cofator de DROSHA (*Drosha RNase III cofactor*)
- DM2 - Diabetes tipo 2

DROSHA - Enzima endoribonuclease específica de RNA de fita dupla (*Double-stranded RNA-specific endoribonuclease*)

DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

ER - Retículo endoplasmático (Endoplasmic Reticulum)

ERK2 - Quinase Regulada por Sinal Extracelular (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 2*)

FDG - Fluorodeoxiglicose

GSK-3 $\beta$  - Quinase glicogênio-sintase quinase-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* )

IL-18 - Interleucina-18

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$

IL-6 - Interleucina-6

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LRP1 - Proteína Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade 1 (*Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*)

Pré - MiRNA precursor - MicroRNA precursor

miRNAs - MicroRNAs

MMSE - Mini Exame do Estado Mental (*Mini-Mental Status Examination*)

MoCA - *Montreal Cognitive Assessment*

MRI - Imagem por ressonância magnética (*Magnetic Resonance Imaging*)

NADPH oxidase - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*

ncRNAs - RNAs não codificantes (*non-coding RNAs*)

NIA-AA - *National Institute on Aging and Alzheimer's Association*

NINCDS-ADRDA - *National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*

NO - Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NFTs - Emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles*)

PCR digital - *Polymerase Chain Reaction Digital*

PET - Tomografia por emissão de pósitrons (*Positron Emission Tomography*)

PKA - Proteína quinase A (*Protein Kinase A*)

pri-miRNA - MiRNA primário (*Primary MicroRNA*)

PSEN1 - Presenilina-1

PSEN2 - Presenilina-2

RISC - Complexo de silenciamento induzido por miRNA (*RNA-induced silencing complex*)

RNS - Espécies reativas de nitrogênio Reactive Nitrogen Species

ROS - Espécies reativas de oxigênio Reactive Oxygen Species

RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SNC - Sistema nervoso central

SNPs - Polimorfismos de nucleotídeo único Single Nucleotide Polymorphisms

SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único Single Photon Emission Computed Tomography

TGN - Rede trans-Golgi Trans-Golgi Network

Tirosina quinase 2-MAPK - Quinase de Tirosina 2 - Quinase de Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (*Tyrosine Kinase 2-Mitogen-Activated Protein Kinase*)

TLR4 - Toll-like receptor 4

TLR6 - Toll-like receptor 6

TNF - Fator de necrose tumoral Tumor Necrosis Factor

TRB - Cofator de DICER

TREM2 – Receptor desencadeador expresso em células mielóides 2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*)

TRPM2 - Membro 2 da Subfamília M do Canal de Cátion Potencial Transitório Receptor (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 2*)

$\gamma$ -secretase - Gama-secretase

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura fisiológica de um cérebro normal e um com DA.....	23
<b>Figura 2:</b> Vias de processamento da proteína precursora amilóide (APP).....	25
<b>Figura 3:</b> Ação da proteína tau na estabilidade do microtúbulo.....	27
<b>Figura 4:</b> Representação de diferenças no cérebro de indivíduos cognitivamente saudáveis e com doença de Alzheimer (DA).....	30
<b>Figura 5:</b> Maturação do miRNA. ....	44

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>3. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Epidemiologia da doença de Alzheimer.....	19
3.2 Fisiologia da doença de Alzheimer.....	20
3.3 Processamento da proteína precursora amilóide e acúmulo da proteína beta-amiloide.....	22
3.4 Variantes genéticas.....	31
3.5 Fatores de risco para a da.....	34
3.6 Sintomas e diagnóstico.....	37
3.7 miRNA.....	41
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
4.1 Objetivo Geral.....	48
4.2 Objetivos específicos.....	48
<b>5. ARTIGO.....</b>	<b>47</b>
<i>miRNAs in Cerebrospinal Fluid Associated with Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Pathway Analysis using a Machine Learning Approach</i>	
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>101</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE A – Comprovante de prêmio e de participação em evento...99</b>	
<b>APÊNDICE B - Material suplementar do artigo.....</b>	<b>105</b>

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em 2025, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, e, conseqüentemente, o número de pessoas afetadas por doenças relacionadas ao envelhecimento também aumentará. Uma dessas condições é a Doença de Alzheimer (DA), que já atinge mais de um milhão de pessoas no país.

A DA é uma neuropatologia que afeta a formação de memória, aprendizado e a autonomia do indivíduo. Embora não tenha cura, o diagnóstico precoce pode direcionar o tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente. No entanto, o diagnóstico da DA é exclusivamente clínico, e a doença não possui biomarcadores padronizados para rastreamento e diagnóstico.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes com 21-25 nucleotídeos, possuem estruturas altamente conservadas, são moléculas estáveis e estão presentes na maioria dos fluidos corporais. A utilização dos miRNAs como biomarcadores tem sido investigada em várias condições clínicas, uma vez que são moléculas capazes de controlar a expressão de outros genes. Assim, os miRNAs são potenciais alvos de estudo para o conhecimento da fisiopatologia das doenças e marcadores de diagnóstico. O presente estudo se justifica por investigar miRNAs presentes no líquido cefalorraquidiano relacionados à DA, podendo, no futuro, melhorar a precisão diagnóstica da DA e permitir o início mais precoce do tratamento, melhorando assim a qualidade de vida do paciente.

## 2. INTRODUÇÃO

Por ano, é esperado que 10 milhões de pessoas no mundo sejam diagnosticadas com demência, um número que se acumula com outros 55 milhões de pessoas que já convivem com esta condição (WHO, 2023). Entre os tipos de demência, a mais comum é a Doença de Alzheimer (DA) que representa entre 60%-70% dos casos relatados (OPAS, 2020). Segundo dados publicados por Khan et al. (2020), o Brasil ocupa o oitavo lugar no ranking dos países que possuem maiores incidências de DA e já registrou mais de um milhão de casos de pacientes com a condição (KHAN et al., 2020).

A DA é uma doença neurológica e complexa, que foi caracterizada pela primeira vez em 1905, pelo pesquisador Alois Alzheimer, durante a autópsia de uma mulher de 55 anos que possuía histórico de distúrbios cognitivos e de comportamento (ALZHEIMER et al., 1995). Foi descrita a presença de emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles* – NFTs) e de placas neuríticas, que mais tarde seriam caracterizadas por formas hiperfosforiladas e clivadas da proteína tau e do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), respectivamente (GLENNER et al., 1984; KANG et al., 1987). Atualmente, não há cura para DA e sua fisiopatologia ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que sua evolução é lenta e que o sinal clínico inicial é a incapacidade de formar novas memórias, e que em seu estágio tardio a doença é caracterizada pelo quadro de demência (ALZHEIMER DISEASE INTERNATIONAL et al., 2023; JAGUST et al., 2018).

Na fisiopatologia da DA, ocorre agregação e deposição de proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) na superfície extracelular de neurônios, a qual forma oligômeros e fibrilas, além da hiperfosforilação da proteína tau cerebral, que se acumula nos microtúbulos dos neurônios e forma NFTs (SOBÓW et al., 2004; SCHOONENBOOM et al., 2004; JIN et al., 2011). Como consequência, as células neurais ficam mais propensas a atividades citotóxicas que levam à destruição da estrutura neural e ao declínio da memória e aprendizado dos indivíduos (YANG et al., 2019). É importante ressaltar que os processos fisiopatológicos da doença podem começar décadas antes de algum sintoma

clínico (MONTINE et al., 2012). Com o amplo estudo da patologia, foi visto que outros mecanismos também estão relacionados ao desenvolvimento da DA como neuroinflamação, mutações no gene *APOE*, degeneração neurofibrilares, disfunção sináptica e desequilíbrio de neurotransmissores, disfunção do microbioma intestinal, presença de doenças infecciosas, estresse oxidativo, e autofagia (KHAN et al., 2020).

Inicialmente, o diagnóstico da DA era feito exclusivamente por meio de critérios clínicos e a avaliação neuropatológica era usada para a confirmação da doença *pós mortem* (TREJO-LOPEZ et al., 2021). Entretanto, o *National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) atualizou em 2011 os critérios com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da DA adicionando marcadores líquidos (BREIJYEH et al., 2020; MCKHANN et al., 2011). Entretanto, mesmo com todos os avanços, o diagnóstico da condição ainda depende da avaliação clínica de profissionais qualificados para tal, sendo o diagnóstico conclusivo da doença realizado após a morte do paciente por meio da autópsia (BATEMAN et al., 2020). Sendo assim, a busca por novos biomarcadores se faz necessária.

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs), que possuem entre 21 e 25 nucleotídeos, eles estão envolvidos na modulação da expressão gênica e em diversos mecanismos moleculares (DE SOUSA MARTA et al., 2019; GRIFFITHS-JONES et al., 2006). O que faz dos miRNAs excelentes candidatos como biomarcadores de processos fisiológicos e patológicos é o fato de apresentarem alta especificidade tecidual, sensibilidade, fácil acesso e sua obtenção ser minimamente invasiva (HO et al., 2022). Os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversas condições como câncer, doenças cardiovasculares, metabólicas e demências (DE SOUSA MARTA et al., 2019; LEE et al., 2021). Os mesmos podem ser encontrados no plasma, soro, tecidos e no líquido cefalorraquidiano (LUKIW et al., 2007; SWARBRICK et al., 2019; TAKOUSIS et al., 2019). Diversos estudos relacionaram e validaram miRNAs envolvidos na DA, como por exemplo miRNA-9, miRNA-125b e miR-128 tiveram alterações induzidas pela produção

de espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes com DA; e o miRNA-29a/b/c, miRNA-107 miRNA-181c, miRNA-101, miRNA-15, miRNA-125b, miRNA-128 e miRNA-146a, os quais tiveram expressão alterada no cérebro de pacientes com DA (LUKIW et al., 2007).

O objetivo do nosso estudo foi a realização de um levantamento sistemático dos bancos de dados disponíveis a fim de verificar miRNAs diferencialmente expressos no líquido cefalorraquidiano de pacientes diagnosticados com a DA. Além disso, por meio das técnicas de aprendizado de máquina, foi realizada a avaliação dos principais miRNAs que mostraram valores preditivos satisfatórios para a diferenciação dos pacientes com DA em relação a pacientes saudáveis, além do estudo de vias biológicas controladas por estes miRNAs encontrados. O trabalho fornecerá dados para o entendimento da relação dos miRNAs com a DA, podendo futuramente ser validados como biomarcadores para o diagnóstico da doença.

### **3. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS**

#### **3.1. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

De acordo com estatísticas recentes, estima-se que 55 milhões de indivíduos no mundo vivem com algum tipo de demência, e espera-se que a cada ano, 10 milhões de novos casos sejam registrados. Projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o ano de 2050, indicam que o número total de pacientes acometidos ultrapasse o número de 130 milhões de pessoas (WHO, 2023). Já no Brasil, cerca de um milhão de pessoas vivem com algum tipo de demência e 100 mil novos casos são diagnosticados por ano (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, 2023). Em relação ao número de pessoas que vivem com a DA, o país ocupa o oitavo lugar no ranking global, ficando atrás apenas da China, EUA, Índia, Japão, Alemanha, Rússia, e França no ano de 2010 (KHAN et al., 2020).

A DA é a forma mais comum de demência e representa cerca de 70% dos casos (WHO, 2023). Em 2019, foi registrado que a DA e outras demências estão listadas entre as 10 principais causas de morte no mundo, ficando em sétimo lugar em todo mundo e terceiro lugar nas Américas e na Europa (OPAS, 2020; WHO, 2021). É observado também que a DA possui grande impacto econômico, pois em 2019 foi estimado que os custos da doença foram de 1,3 trilhões de dólares, e o estimado para 2030 é que esse valor seja de 2,8 trilhões de dólares (WHO, 2023). Por pessoa, o custo anual varia de 16 a 36 mil dólares, de acordo com a gravidade e país do indivíduo (WHO, 2021). Os dados sugerem que a DA está se tornando uma das doenças mais letais e onerosas do século 21 (SCHELTENS et al., 2021).

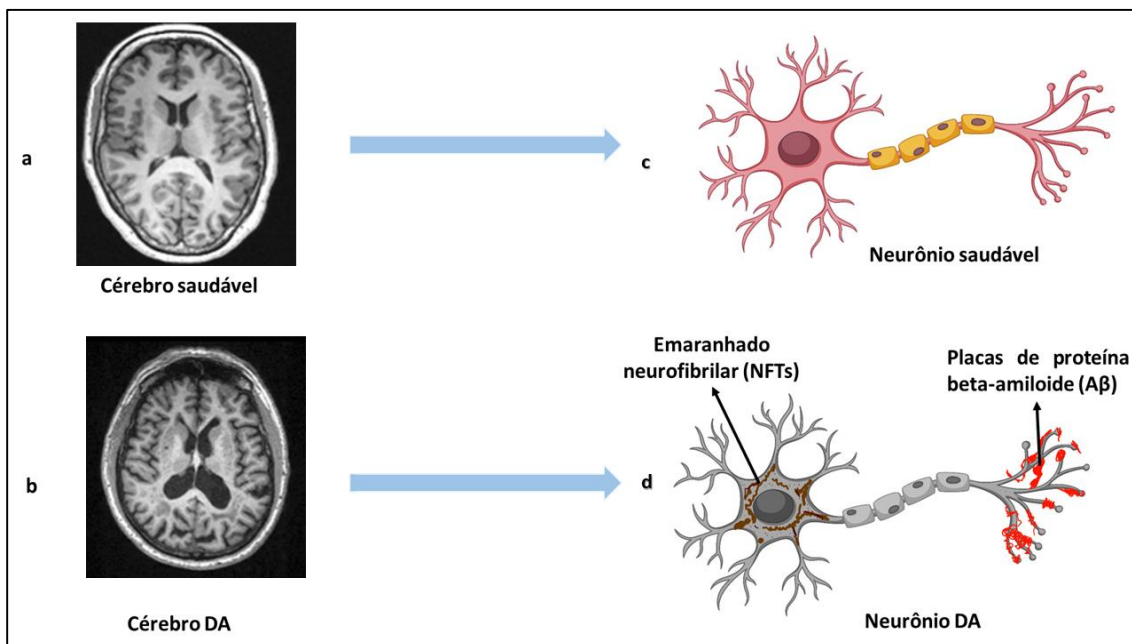
Uma das características da DA é que sua incidência aumenta com a idade, pois cerca de 8% dos pacientes têm idade igual ou superior a 65 anos, e entre 25%-50% possuem idade superior a 85 anos (KHAN et al., 2020; MIECH et al., 2002), condição essa relacionada ao envelhecimento anormal dos neurônios relacionado à desestabilização genômica e alterações nas vias metabólicas, processos de oxidação do DNA, encurtamento dos telômeros e

disfunções mitocondriais (ZHU et al., 2021; THAL et al., 2015; CHEN et al., 2022).

Outra característica é que a condição atinge mais a população feminina (KHAN et al., 2020), uma vez que cerca de dois terços dos pacientes com DA são mulheres na população estadunidense (ZHU et al., 2021). Uma possível explicação é que mulheres vivem mais que homens, dessa maneira, são mais propensas a desenvolver a doença ao longo da vida. Outras explicações relacionadas são a diferença estrutural dos cérebros masculinos e femininos, expressão de biomarcadores, respostas psicossociais ao estresse, gravidez, menopausa e hormônios sexuais, antecedentes genéticos, inflamação, e distúrbios vasculares (ZHU et al., 2021; DUMITRESCU et al., 2019; MATYI et al., 2017).

### 3.2. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é caracterizada pela agregação anormal da proteína A $\beta$  e a formação da placa senil, ação anormal da enzima que cliva a proteína precursora amiloide (APP), e a formação NFTs em consequência de hiperfosforilação da proteína Tau (DE STROOPER et al., 2016; TIWARI et al., 2019; CONGDON et al., 2018). A **Figura 1** representa um cérebro saudável e um cérebro de paciente com DA, que exemplifica os eventos citados. A nível anatômico, a DA é definida por atrofia cerebral associada à perda de sinapses e neurônios (CONGDON et al., 2018). A formação das placas A $\beta$  acontece inicialmente nas regiões neocórtex basal, temporal e orbitofrontal do cérebro e posteriormente progridem e atingem o neocórtex, hipocampo, amígdala, diencéfalo e gânglios da base, sendo que em casos mais graves, as placas podem ser encontradas no mesencéfalo, tronco cerebral inferior e também no córtex cerebelar (TIWARI et al., 2019). Já a deposição da proteína tau se inicia no córtex entorrinal e no hipocampo (CONGDON et al., 2018).



**Figura 1: Comparação da estrutura cerebral entre um cérebro normal e um com doença de Alzheimer.** Imagens de ressonância magnética ilustrando a estrutura de um cérebro normal (a) e um cérebro com DA (b). Imagens de ressonância magnética revelam uma diminuição no volume da substância cinzenta em um paciente com DA quando comparado a um indivíduo saudável. Em relação aos indivíduos saudáveis, os pacientes com DA apresentam uma redução de 26 a 27% no volume do hipocampo e uma diminuição de 38 a 40% no volume do córtex entorrinal (ERC). Conforme a doença progride, a atrofia se expande para outras regiões do lobo temporal medial, resultando na perda de substância cinzenta no giro temporal medial, na área para-hipocampal, nos giros para-hipocampais, fusiformes e no polo temporal. As ilustrações representam neurônios de indivíduos cognitivamente saudáveis (c) e de pacientes com DA (d). A DA é caracterizada pela atrofia cerebral acompanhada pela perda sináptica e morte de neurônios. Ocorre a formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs) em decorrência da hiperfosforilação da proteína tau presente nos microtúbulos. Além disso, também ocorre a formação de placas de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), devido ao processamento inadequado da proteína precursora amilóide (APP). (Adaptado de CHANDRA et al., 2019)

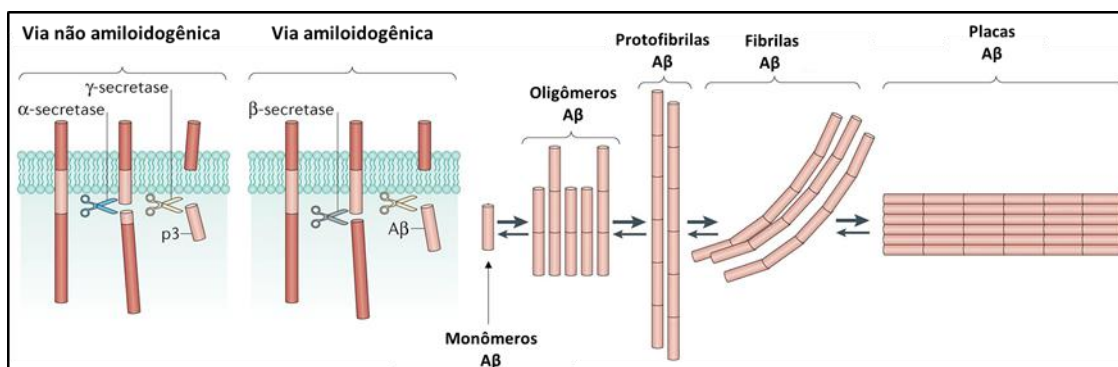
### 3.3. PROCESSAMENTO DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE E ACÚMULO DA PROTEÍNA BETA-AMILOIDE

Em 1905, Alois Alzheimer relatou os resultados obtidos durante a autópsia de uma mulher de 55 anos que faleceu com distúrbios cognitivos e comportamentais progressivos (ALZHEIMER et al., 1995). O pesquisador notou a presença de NFTs e placas neuríticas no cérebro autopsiado, que mais tarde foram caracterizadas por formas hiperfosforiladas e clivadas da proteína tau e do A $\beta$ , respectivamente (GLENNER et al., 1984; KANG et al., 1987). O A $\beta$  é um produto de clivagem da APP que tem sido alvo de diversos estudos desde então. Sua função fisiológica ainda não foi bem elucidada, entretanto foi sugerido que a APP possui ação no crescimento de neuritos e sinaptogênese, tráfego de proteínas neuronais ao longo do axônio, transdução de sinal transmembrana, adesão celular e metabolismo de cálcio (ZHANG et al., 2011). Além disso, o peptídeo A $\beta$  também desempenha funções importantes na fisiologia da sinapse, regulando a liberação de vesículas sinápticas e o escalonamento sináptico (O'BRIEN et al., 2011).

A APP é uma proteína da família das precursoras amiloides que possui domínios extracelulares e é uma glicoproteína transmembranar do tipo I de passagem única (BAYER et al., 1999, ZHANG et al., 2011). Em condições normais, a glicoproteína é clivada por via não amiloidogênica, entretanto, em condições de doença, ela é clivada por via amiloidogênica (**Figura 2**) (TIWARI et al., 2023). A APP é sintetizada no retículo endoplasmático (ER) e depois transportada para a rede trans-Golgi (TGN), através do complexo de Golgi, e sua maior concentração se encontra nos neurônios em estado estacionário (ZHANG et al., 2011). O *splicing* alternativo durante a transcrição de APP gera oito isoformas possíveis, as três mais comuns são 695, 751 e 770 aminoácidos, onde a primeira é mais expressa no sistema nervoso central (BAYER et al., 1999). O processamento da APP ocorre de maneira rápida e em larga escala nos neurônios. As secretases desempenham papel fundamental nesse processo, dividindo a proteína em três fragmentos. Essa clivagem pode ocorrer pela via amiloidogênica ou não amiloidogênica (CHOW et al., 2010). Quando a clivagem é iniciada pela alfa-secretase ( $\alpha$ -secretase), não há formação de A $\beta$ . No entanto, se a clivagem ocorrer sequencialmente pela beta-secretase 1

(BACE1) e gama-secretase ( $\gamma$ -secretase), haverá a produção do A $\beta$ , que, por sua vez, se agrega e forma as placas amilóides encontradas nos cérebros afetados pela DA (CHOW et al., 2010; O'BRIEN et al., 2011).

O A $\beta$  é um polipeptídeo insolúvel que se agrupa e forma as chamadas placas beta amiloides (ABP) que são deteriorantes para as células e podem gerar as seguintes condições: impedir a comunicação e sinalização entre dois neurônios, levar à inflamação e danificar neurônios circulantes e causar quadros de hemorragia, uma vez que, ao se depositar do lado externo dos vasos sanguíneos, pode impedir o fluxo sanguíneo (ASHRAFIAN et al., 2021). Os polímeros A $\beta$  podem ser de dois tipos, A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, o primeiro é mais abundante e menos tóxico, enquanto o segundo é altamente insolúvel, neurotóxico e mais propenso a agregação, e por consequência, à formação de oligômeros, polímeros e, eventualmente, placas amiloides insolúveis (TIWARI et al., 2019; LENG et al., 2021). A agregação de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 leva ao aumento de canais iônicos bloqueados, homeostase de cálcio alterada, aumento do estresse oxidativo mitocondrial, diminuição do metabolismo energético e da regulação da glicose, e inibição sobre neurônios e sinapses, fundamental para a formação de memórias (TIWARI et al., 2019; GALVÃO et al., 2019). É importante ressaltar que vários modelos de agregação de A $\beta$  coexistem na doença de Alzheimer, sendo eles monômeros, oligômeros, protofibrilas, fibrilas e placas de A $\beta$  (**Figura 2**). Trabalhos recentes demonstram que provavelmente cada um apresenta um nível diferente de impacto, o que pode refletir na sua importância diagnóstica (HEPPNER et al., 2015).



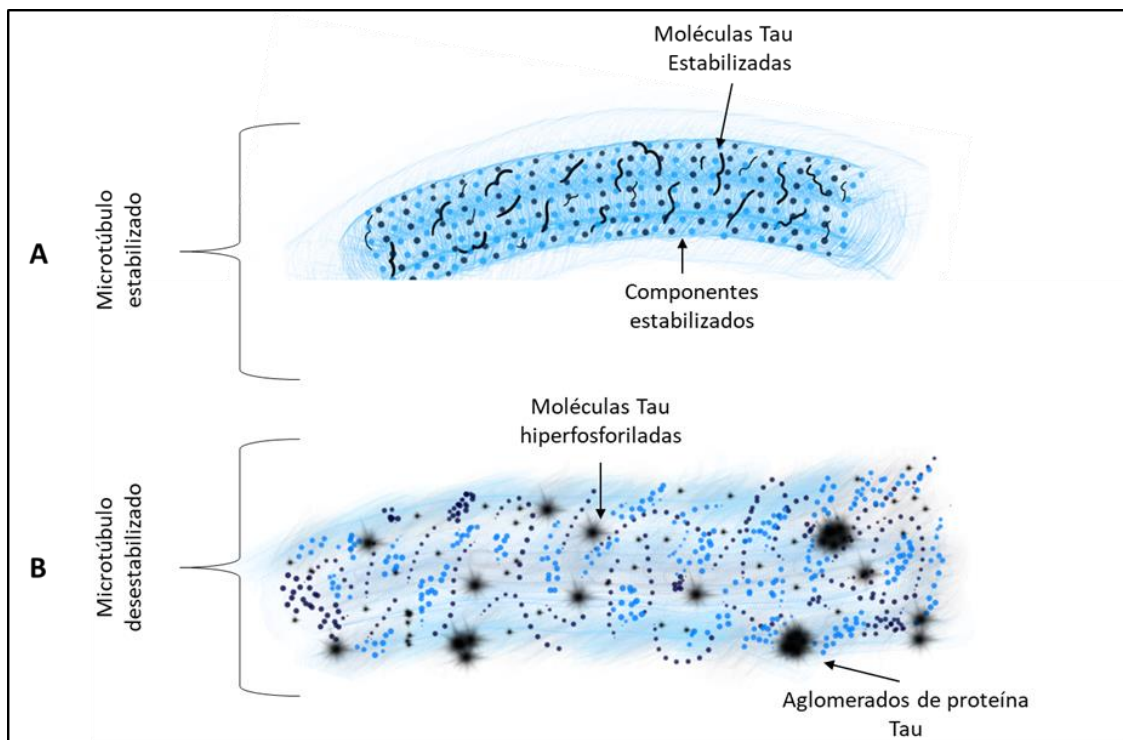
**Figura 2: Vias de processamento da proteína precursora amilóide (APP).**

(a) na via não amiloidogênica, a APP é clivada sequencialmente pela alfa-

secretase e gama-secretase e não há formação do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). (b) na via amiloidogênica a clivagem ocorre inicialmente pela beta-secretase 1 (BACE1) e, em seguida, sofre ação da gama-secretase, ocorrendo a produção de  $A\beta$ . As moléculas de  $A\beta$  se agregam e formam monômeros, oligômeros, protofibrilas, fibrilas e placas amiloides que podem ser encontradas nos cérebros de pacientes com DA (Adaptado de HEPPNER et al., 2015).

### ***Proteína Tau***

A proteína tau é codificada pelo gene *MAPT* no cérebro humano e devido ao seu *splicing* alternativo seis principais isoformas de tau são geradas (YE et al., 2022). Em condições normais, a proteína tau confere estabilidade aos microtúbulos por estabelecer pontes de interconexão entre eles, pois ela possui um domínio de ligação à tubulina para a formação da estrutura madura e estável (CONGDON et al., 2018). Entretanto, quando a proteína entra em contato com quinases, liberadas em consequência da abundância de  $A\beta$ , ocorre sua hiperfosforilação e por consequência a instabilidade do conjunto do microtúbulo que primeiro se desfaz, e depois pode formar monômeros, filamentos helicoidais e filamentos retos que ao sofrerem oligomerização, formando os NFTs (**Figura 3**) (TIWARI et al., 2019; CONGDON et al., 2018). Os NFTs são manchas retas, fibrilares e insolúveis no citoplasma da célula neural que podem causar a perda de comunicação e sinal entre os neurônios e a apoptose da célula (23). Na DA, a tau forma monômeros, filamentos helicoidais e filamentos retos (CONGDON et al., 2018). Tanto a tau anormal solúvel quanto seus oligômeros são tóxicos para os neurônios, e dessa maneira, leva à morte celular e a demência (29).



**Figura 3: Ação da proteína tau na estabilidade do microtúbulo.** (A) representação da proteína Tau estabilizando os componentes do microtúbulo. Há formação de uma estrutura madura e estável devido ao seu domínio de ligação à tubulina. (B) representação do microtúbulo em desordem após a hiperfosforilação da proteína Tau, o que resulta em instabilidade dos microtúbulos e na sua desmontagem. Posteriormente há formação de monômeros, filamentos helicoidais e filamentos retos, os quais podem oligomerizar e formar os emaranhados neurofibrilares (NFTs) característicos da DA (Autoria própria).

A proteína tau pode sofrer diferentes modificações pós transducionais, sendo essas a fosforilação, acetilação e truncamento carboxi-terminal que interferem no dobramento da proteína (CONGDON et al., 2018). A hiperfosforilação da proteína tau, um dos primeiros eventos que acontece na DA, atrapalha a capacidade da mesma se ligar e promover a montagem dos microtúbulos. Na DA, o padrão de fosforilação se altera de acordo com a evolução da doença - é visto que a fosforilação de sítios como Ser199, Ser202/205, Thr231 e Ser262 estão relacionados com os pré-emaranhados

nos processos neurais (LUNA-MUNOZ et al., 2007; AUGUSTINACK et al., 2002), além disso, a fosforilação em um local pode estimular a fosforilação em outras regiões da proteína (CONGDON et al., 2018).

Foi relatado que o A $\beta$  pode ser responsável por controlar a clivagem e a fosforilação da proteína Tau, e por consequência, controlar a geração dos NFTs (O'BRIEN et al., 2011). A fosforilação normal de tau é explicada pela regulação dinâmica entre as tau quinases e tau fosfatases, sendo as principais quinases glicogênio-sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e proteína quinase dependente de ciclina 5 (cdk5), que são ativadas por A $\beta$ ; as proteínas quinase dependente de cAMP (PKA); e quinases ativadas por estresse (O'BRIEN et al., 2011; GONG et al., 2008). Outras quinases importantes para a hiperfosforilação de tau são Proteína Quinase C, Proteína Quinase A, ERK2 (uma serina/treonina quinase), caspase 3 e caspase 9, as quais também podem ser ativadas por A $\beta$  (O'BRIEN et al., 2011; TIWARI et al., 2019; GONG et al., 2008). Já entre as fosfatases, a principal é a PP2A (GONG et al., 2008). É importante salientar que os substratos das enzimas citadas também possuem papel importante na hiperfosforilação e agregação de Tau (GONG et al., 2008). Diferentes outros fatores podem causar a hiperfosforilação anormal de Tau, como o metabolismo da glicose cerebral (GONG et al., 2008).

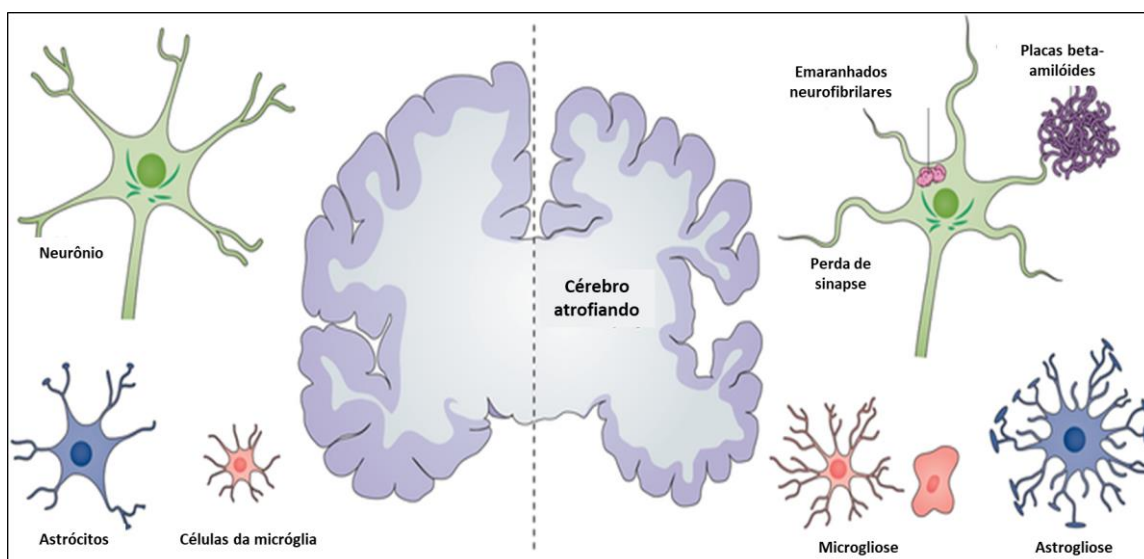
### **Neuroinflamação**

A neuroinflamação é uma resposta do sistema nervoso central (SNC) que pode ser desencadeada por diversos acontecimentos como infecção, trauma, isquemia e toxinas (LENG et al., 2021). Durante o processo, há produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas como CC motif quimiocina ligante 1 (CCL1), CCL5 e CXC motif quimiocina ligante 1 (CXCL1), mensageiros de pequenas moléculas, como prostaglandinas e óxido nítrico (NO), e espécies reativas de oxigênio por células imunes inatas (DISABATO et al., 2016). As células do sistema inato envolvidas no processo são, principalmente, micróglia e astrócitos, mas outras células como endoteliais e sanguíneas também podem contribuir para o desfecho, em especial quando há danos na barreira hematoencefálica (BHE) (LENG et al., 2021). Estudos recentes demonstraram

participação do sistema inflamatório antes do desenvolvimento da DA, quando o processo inflamatório ocorre sem sintomas clínicos, o que precede a fase prodrômica da doença, denominada comprometimento cognitivo leve (CCL) (HEPPNER et al., 2015). Estudos genéticos também ajudaram no melhor entendimento da relação entre DA e sistema imune, uma vez que genes codificadores de moléculas do sistema imune, como o receptor desencadeador expresso em células mielóides 2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* – TREM2) e o antígeno de superfície celular mielóide (CD33), apresentaram variantes patogênicas em modelos animais e pacientes com DA (JONSSON et al., 2013; GUERREIRO et al., 2013, BRADSHAW et al., 2013).

A micróglia faz parte do conjunto de células imunes inatas, de linhagem mielóide, que está distribuída em todo o SNC, e são responsáveis por localizar patógenos e detritos celulares, além de fornecer fatores para a manutenção do tecido, e promover proteção e remodelação das sinapses (HENEKA et al., 2015; LENG et al., 2021). Este conjunto de células são aquelas mais relacionadas com as alterações observadas na DA, uma vez que macrófagos, provavelmente derivados da micróglia, e monócitos são observados ao redor das placas A $\beta$  em análise de autópsias (HEPPNER et al., 2015). Ao ser ativada por patógenos, a micróglia se estende até o local da lesão e inicia uma resposta imune inata (HICKMAN et al., 2008). Na DA, a micróglia se liga a oligômeros  $\beta$  amilóides solúveis e fibrilas A $\beta$  por meio de receptores, incluindo receptores inflamatórios (HEPPNER et al., 2015; HENEKA et al., 2015). A ativação da micróglia, também conhecida como microgliose, ocorre quando há a ligação de A $\beta$  aos receptores CD14, CD36, CD47, TLR4 e TLR6 que, por consequência, passa a produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (HEPPNER et al., 2015; HENEKA et al., 2015; PROKOP et al., 2013). Além de produzir mediadores, a micróglia também é responsável por eliminar A $\beta$  por meio de fagocitose (HEPPNER et al., 2015). Em alguns casos de DA, a depuração ineficiente de A $\beta$  pela micróglia foi identificada como uma das principais vias patogênicas da condição (HENEKA et al., 2015). É sugerido que essa redução da capacidade de depuração se deve a elevação dos níveis de citocinas e a diminuição de um componente importante para a via fagocitária, o beclin1 (HICKMAN et al., 2008; LUCIN et al., 2013).

Outras células estão envolvidas na reação inflamatória observada na DA. Estudos apontam relação entre a infiltração de células mononucleares derivadas do sangue no SNC com a DA, relatando que os macrófagos perivasculares podem ter relação com a depuração de A $\beta$  (SIMARD et al., 2016). Além disso, também foi observado que células endoteliais, oligodendrócitos, neurônios e astrócitos também estão envolvidos na DA (HEPPNER et al., 2015), uma vez que células reativas hipertróficas foram encontradas em torno de placas senis em tecidos *post mortem* de pacientes com DA, a ativação exacerbada de astrócitos é conhecida como astrogliose (HEPPNER et al., 2015; HENEKA et al., 2015). A **Figura 4** representa os principais pontos relacionados a inflamação na DA.



**Figura 4: Representação de diferenças no cérebro de indivíduos cognitivamente saudáveis e com doença de Alzheimer (DA).** O lado esquerdo representa componentes normais presentes no cérebro de indivíduos saudáveis. O lado direito representa os componentes do cérebro de indivíduos com DA, incluindo atrofia cerebral, perda de sinapses e neurônios, deposição de placas extracelulares de peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares (NFTs), microgliose e astrogliose (Adaptado de CONGDON et al., 2018).

### ***Metabolismo da glicose e estresse oxidativo***

Durante o envelhecimento, as mitocôndrias desempenham um papel importante na geração de estresse oxidativo no contexto neural. Isso porque há a formação de espécies reativas como subprodutos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, o que pode culminar no desequilíbrio das reações redox, e aumento da neurotoxicidade. Além disso, o cenário contribui para a instabilidade genômica, desregulação na transcrição de genes de caráter pós-inflamatório e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF (IONESCU-TUCKER et al., 2021). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e as defesas antioxidativas do organismo. Quando as espécies reativas reagem com as biomoléculas, pode ocorrer o dano aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (BUTTERFIELD et al., 2019; IONESCU-TUCKER et al., 2021). Em pacientes com DA, foram observados danos oxidativos em moléculas vitais para o órgão, incluindo biomoléculas presentes nas membranas neurais, como lipídios e proteínas, bem como ácidos nucleicos. Isso pode resultar na ruptura das membranas celulares e desencadear consequências para a funcionalidade das proteínas. A modificação da integridade funcional das membranas neurais pode propiciar interações entre as proteínas formadoras de amiloide e as membranas, o que pode aumentar a permeabilidade destas últimas. Além disso, o processo oxidativo pode ser suficiente para comprometer a integridade da membrana (CHEIGNON et al., 2018).

Além do mais, placas neuríticas, ricas em A $\beta$ 42 e A $\beta$ 40, e emaranhados neurofibrilares foram associados aos níveis aumentados de produtos de oxidação (BUTTERFIELD et al., 2019; CHEIGNON et al., 2018). Além disso, regiões do cérebro ricas em A $\beta$ , como o hipocampo e córtex, apresentaram altos índices de produtos de oxidação, já regiões com baixa agregação do peptídeo, por exemplo o cerebelo, não apresentaram elevação dos marcadores de estresse oxidativo (CHEIGNON et al., 2018).

Dois grupos de pesquisa relacionaram a região hidrofóbica 25-35 do A $\beta$  com a toxicidade neural e a geração de ROS, demonstrando assim que o A $\beta$  é uma fonte de estresse oxidativo (HENSLEY et al., 1994; PIKE et al., 1992). A causa do estresse oxidativo por A $\beta$  provavelmente é devido à sua capacidade

de ligação a metais, como cobre, zinco e ferro que se ligam ao peptídeo (IONESCU-TUCKER et al., 2021; TÖNNIES et al., 2017). O estresse oxidativo causado por essa ligação leva à neurotoxicidade, promove a despolarização da membrana e prejudica a função mitocondrial (IONESCU-TUCKER et al., 2021).

Outro mecanismo proposto está relacionado à ativação de proteína quinase C e da NADPH oxidase, as quais ativam a poli (ADP-ribose) polimerase 1, ADP-ribose e TRPM2. Por consequência, o influxo de cálcio resultante ativa a produção de citocinas e a via de *feedback* positivo da tirosina quinase 2-MAPK rica em prolina (LENG et al., 2021). A disfunção mitocondrial observada na DA já foi bem documentada, e o dano oxidativo ao DNA mitocondrial é um dos primeiros marcadores na doença. Em conjunto, é sugerido que a idade, a diminuição dos mecanismos de reparo e a ativação da cascata mitocondrial estão envolvidos nas alterações detectadas na expressão e processamento de APP (IONESCU-TUCKER et al., 2021, TÖNNIES et al., 2017).

Na DA, a disfunção da mitocôndria é ainda mais exacerbada devido ao metabolismo prejudicado da glicose, produção de insulina e mitofagia (BUTTERFIELD et al., 2019; IONESCU-TUCKER et al., 2021). As proteínas envolvidas na glicólise e na produção de ATP podem se tornar disfuncionais e comprometer o metabolismo energético do órgão, como a frutose bifosfato aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído fosfato desidrogenase, fosfoglicose mutase, enolase, piruvato quinase (CHEIGNON et al., 2018). Em um cérebro saudável, a glicose é a principal fonte de energia, a qual entra na vasculatura do SNC e por meio da insulina é transportada para as células alvo, entretanto, na DA, a resistência à insulina se faz presente (BUTTERFIELD et al., 2019). Pesquisas recentes demonstram a íntima relação entre o uso ineficiente da glicose e o dano oxidativo na DA (BUTTERFIELD et al., 2019). O metabolismo da glicose se reduz ainda mais durante o CCL, o qual é marcado pela diminuição de enzimas produtoras de insulina e pela regulação negativa do receptor de insulina, ocasionando aumento da resistência com piora da disfunção mitocondrial, disfunção sináptica e deficiências cognitivas (IONESCU-TUCKER et al., 2021, TÖNNIES et al., 2017). Na DA também

ocorre a degradação excessiva mitocondrial e danos sinápticos, pois a proteína de fissão mitocondrial (DRP1) é hiperativada pelos elevados níveis de beta amiloide (IONESCU-TUCKER et al., 2021).

Outro fenômeno observado é a alteração das atividades de enzimas antioxidantes, dessa maneira, aumentando o acúmulo de danos oxidativos (KIM et al., 2006). O estresse oxidativo pode também prejudicar a depuração de A $\beta$ , isso porque a Proteína Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade 1 (LRP1 - *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*), uma proteína responsável pelo efluxo de A $\beta$  do cérebro para o sangue, sofreria oxidação pelo próprio peptídeo, o que levaria ao acúmulo do A $\beta$  neurotóxico (CHEIGNON et al., 2018).

### **3.4. VARIANTES GENÉTICAS**

#### ***Apolipoproteína E***

A Apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína que transporta o colesterol, e outros lipídios, no plasma e no SNC (ZHAO et al., 2018). Ela é produzida por hepatócitos, macrófagos e adipócitos nos tecidos periféricos, mas no SNC ela é altamente expressa em astrócitos, micróglia e neurônios quando em condição de estresse ou danos (ZHAO et al., 2018). A proteína funciona como um regulador chave e crítico para a mobilização e distribuição do colesterol nas células do SNC, uma vez que a manutenção da mielina e das membranas neuronais dependem do colesterol (LEDUC et al., 2010). No SNC, além da ApoE, as proteínas ApoJ e ApoC1 também realizam a entrega do colesterol, entretanto outros transportadores, como ApoA1 e ApoB, praticamente não estão presentes no cérebro, o que faz a região ser dependente principalmente da APOE (LEDUC et al., 2010). Localizado no cromossomo 19, o gene *APOE* possui 3,6 kb de comprimento e três alelos que codificam diferentes isoformas, as quais se distinguem entre si nas posições de aminoácidos 112 e 158 (ApoE2 Cys-112, Cys-158, ApoE3 Cys-112, Arg-158 e ApoE4 Arg-112, Arg-158). Os níveis de ApoE no LCR e intersticial variam de acordo com o genótipo. A presença do alelo  $\epsilon$ 4 é um forte fator de risco

genético para DA, resultando em uma manifestação mais prematura da doença em contraste com o alelo mais frequente,  $\epsilon 3$ . Já o alelo  $\epsilon 2$  seria um alelo protetor em relação aos alelos  $\epsilon 3$  e, principalmente, ao  $\epsilon 4$  (ZHAO et al., 2018; MARTENS et al., 2022; SERRANO-POZO et al., 2021; RIEDEL et al., 2016).

Estudos clínicos, utilizando 18 F-florbetapir-PET ou 11 C-Pittsburgh composto B (PiB)-PET, mostraram que a presença do alelo ApoE $\epsilon 4$  está positivamente associado à deposição de A $\beta$  no cérebro de indivíduos cognitivamente normais, casos de CCL e DA sintomática, pois os achados histopatológicos surgem mais cedo em carreadores do genótipo  $\epsilon 4\epsilon 4$  (GONNEAUD et al., 2016; MURPHY et al., 2013; ZHAO et al., 2018). O risco aumentado de DA em indivíduos cognitivamente normais e CCL estaria associado à maior predisposição ao acúmulo, agregação e deposição de A $\beta$  (ZHAO et al., 2018). Já o alelo ApoE $\epsilon 2$  está associado a uma patologia mais branda da DA, em comparação aos outros alelos, sugerindo assim que o mesmo tenha um efeito neuroprotetor (ZHAO et al., 2018). Isso é explicado porque a substituição da cisteína na posição 158 na ApoE2 resulta em baixos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), já a substituição de cisteína por arginina na posição 112 da ApoE4 leva ao aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e LDL, o que causa o aumento do risco de doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos como a DA (RIEDEL et al., 2016).

Os níveis de oligômeros A $\beta$  são 2,7 vezes maiores em cérebros que possuem o alelo  $\epsilon 4$ , o que sugere que a ApoE afeta o metabolismo da molécula (ZHAO et al., 2018). É proposto que a interação entre ApoE e A $\beta$  em condições fisiológicas são insignificantes, mas que os dois podem competir pelo mesmo receptor LRP1 que está envolvido na depuração de A $\beta$  por neurônios, astrócitos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, e pericitos (SERRANO-POZO et al., 2021). Sendo assim, quando há maior expressão de ApoE, devido à competição, a depuração fica prejudicada levando ao aumento da deposição de A $\beta$ . Além disso, a ApoE4 promove internalização de APP e aumento da produção de A $\beta$  em maior extensão que a ApoE3 (YE et al., 2005). Foi relatado que as isoformas de ApoE também influenciam a transcrição de

APP, por meio da ativação de uma via de sinalização proteica quinase não canônica ativada por mitógeno em neurônios humanos, onde a ApoE4 afeta mais que a ApoE3, que por sua vez afeta mais que a ApoE2 (ZHAO et al., 2018; 56). A glicoproteína interage diretamente com A $\beta$ , mas não há evidências que ela interage com a proteína tau (SERRANO-POZO et al., 2021).

Outro evento importante para a DA é a modulação da integridade sináptica e plasticidade, uma vez que foi relatado que receptores de ApoE podem estar envolvidos nesses eventos (ZHAO et al., 2018). APOER2 e LRP1, dois receptores de APOE, podem interagir com as subunidades do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), modular a internalização do receptor do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e regular a plasticidade sináptica (HOE et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2013). Além disso, a própria ApoE suprime a expressão de proteínas sinápticas e prejudica a morfologia dendrítica e a plasticidade (SEN et al., 2012; HAYASHI et al., 2007).

### ***Outras variantes genéticas***

Além das variantes no gene *APOE*, outras são relatadas como fatores de risco para a DA como aqueles presentes no receptor desencadeador expresso nas TREM2 (GUERREIRO et al., 2014). Ao desenvolver um estudo em dois grupos, DA *versus* controle, *Guerreiro et al., 2014* observaram uma variante rara heterozigótica no gene de TREM2 que foi relacionada ao aumento do risco de DA em 2,9% (GUERREIRO et al., 2014; GUERREIRO et al., 2013; SILVA et al., 2019). Ainda não foi bem elucidado o mecanismo fisiopatológico pelo qual a deficiência no gene aumenta o risco de DA, mas é sabido que a TREM2 é uma glicoproteína transmembranar conhecida por controlar dois fluxos de sinalização para regulação da micróglia e por suprimir a reatividade inflamatória, sendo altamente expressa pela micróglia com função na fagocitose de detritos neurais (HENEKA et al., 2015; GUERREIRO et al., 2014). A atividade de TREM2 é verificada em astrócitos reativos ao redor de placas amiloides e em neurônios danificados (HENEKA et al., 2015; SILVA et al., 2019).

Outras variantes genéticas patogênicas estão envolvidas com o desenvolvimento da DA familiar, como aqueles presentes no gene *APP*, presenilina-1 (*PSEN1*) e presenilina-2 (*PSEN2*) (GUERREIRO et al., 2014; KABIR et al., 2020). As proteínas PSEN1 e 2, subunidades de proteases que clivam a APP, podem desencadear o aumento de A $\beta$ 42 ou ter a perda da sua função, conforme as hipóteses para explicar sua relação com a DA (KABIR et al., 2020).

### **3.5. FATORES DE RISCO PARA A DA**

A expectativa de vida e o envelhecimento aumentam a cada ano no mundo todo e é esperado que a prevalência da DA continue em crescimento, já que é uma condição multifatorial que possui fatores genéticos e ambientais para seu desenvolvimento (ZHANG et al., 2021). O envelhecimento cerebral possui diversos fatores que contribuem para o aumento do risco da doença e incluem hipometabolismo da glicose e disfunção mitocondrial, reações imunes e inflamatórias inatas, processamento beta-amilóide, desregulação da homeostase do colesterol, degeneração da substância branca e declínio na capacidade regenerativa (RIEDEL et al., 2016). A seguir serão discutidos alguns fatores de risco para a DA.

#### ***Idade e sexo***

Um dos fatores de risco mais significativos da DA é a idade, sendo que a porcentagem de pessoas com a doença aumenta significativamente de acordo com o envelhecimento (ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT, 2023). A revisão publicada pela *Alzheimer's Association Report* em 2023 relatou que 5% das pessoas entre 65 e 74 anos, 13,1% das pessoas entre 75 e 84 anos e 33,3% das pessoas com mais de 85 anos apresentam a DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT, 2023). Outro fator importante é o sexo, uma vez que já foi observado que a prevalência da DA é maior em mulheres, em especial com idade avançada. Geralmente, o maior risco de DA é atribuído a

mulheres, pois elas vivem em média 4,5 anos a mais que os homens (RIEDEL et al., 2016).

### ***DM2 e obesidade***

A revisão sistemática com metanálises de Xue et al. (2019) reuniu 24 estudos longitudinais que relacionaram positivamente o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) ao aumento do risco de DA (XUE et al., 2019). Os indivíduos diabéticos que não fazem o tratamento adequado para a doença possuem níveis mais elevados de proteína tau fosforilada em comparação aos indivíduos em uso da farmacoterapia correta (MCINTOSH et al., 2019). Em uma revisão sistemática publicada por nosso grupo, foram elencadas as principais proteínas diferencialmente expressas simultaneamente na DA e no DM2, todas relacionadas à fisiopatologia de ambas as condições clínicas, o que sugere inter-relação entre elas (DINIZ PEREIRA et al., 2021).

Assim como a DM2, a obesidade também é considerada um fator de risco para DA (TERZO et al., 2021). A obesidade é capaz de promover remodelação e lipotoxicidade do tecido adiposo, com isso, o SNC pode receber elevados níveis de ácidos graxos, o que pode levar a toxicidade central e causar danos aos neurônios (LOTTA et al., 2017; NUZZO et al., 2018). A condição também promove inflamação, que é desencadeada pelo aumento de adipocinas e citocinas inflamatórias, além da disfunção de mitocôndrias (TERZO et al., 2021). Ainda, um fator chave para as três doenças é o comprometimento na sinalização de insulina que pode ser responsável pela agregação de A $\beta$ , hiperfosforilação da tau, inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (TERZO et al., 2021).

### ***Doenças cerebrovasculares***

Alterações cerebrovasculares estão fortemente ligadas ao desenvolvimento da DA, uma vez que mais de 50% das análises *post-mortem* de pacientes com a doença mostraram a presença de doença vascular

parenquimatosa com surtos hemorrágicos e infartos (SILVA et al., 2019). A possível explicação para os acontecimentos são que os fatores de riscos vasculares levam à disfunção da BHE e à diminuição do fluxo sanguíneo, o que causa danos neurais, uma vez que essa disfunção permite o acúmulo de moléculas neurotóxicas, aumento da expressão e processamento de APP e aumento de A $\beta$  e hiperfosforilação da proteína tau (ZIMMER et al., 2021).

### ***Dislipidemia***

Foi relatado que pessoas com hipercolesterolemia possuem um risco maior do desenvolvimento da DA, isso porque a condição pode comprometer a integridade da BHE, aumentar a deposição de A $\beta$  e causar neuroinflamação (ZHANG et al., 2021). Níveis aumentados de colesterol podem levar à apoptose neuronal, estresse oxidativo, hiperfosforilação da tau e afetar as enzimas de processamento de APP (MCLAURIN et al., 2002; MA et al., 2010; ABAD-RODRIGUEZ et al., 2004). Outra evidência que sustenta a importância do colesterol para a DA é que quando analisadas as placas senis provenientes de pacientes com DA, foram observados níveis significativamente aumentados de colesterol (ABAD-RODRIGUEZ et al., 2004).

### ***Hipertensão***

Indivíduos com grande variação de pressão arterial apresentaram 2 vezes mais chance de desenvolver DA seja na meia idade ou no final da vida (OISHI et al., 2017; MCGRATH et al., 2017). O risco de DA foi significativamente menor em pacientes que faziam tratamento para controle da pressão arterial, sugerindo assim que anti-hipertensivos teriam efeitos protetores para o desenvolvimento da demência (LARSSON et al., 2018).

### ***Outros fatores relacionados***

Dois estudos relacionaram o aumento do risco de DA com o status civil do indivíduo. Foi observado que pessoas que perderam seus parceiros têm

risco aumentado de desenvolver a condição e o fator de risco aumenta nos portadores do alelo  $\epsilon 4$  da ApoE (HÅKANSSON et al., 2009; FAN et al., 2015). A depressão precoce, distúrbios do sono e estresse também foram relacionados ao aumento do risco de DA. Foi identificado em modelo animal que no estresse ocorre a hiperativação dos eixos hipotalâmicos, pituitários e adrenais, o que leva ao aumento de cortisol e de deposição de A $\beta$  em regiões do cérebro como hipotálamo e região pré-frontal do córtex. Observou-se ainda que o prolongamento da condição causa o aumento da deposição de tau hiperfosforilada e neurodegeneração em camundongos (SILVA et al., 2019). Os achados em camundongos reforçam as observações em humanos, uma vez que níveis aumentados de cortisol em pacientes com DA são maiores em comparação a pessoas saudáveis, e os maiores níveis foram correlacionados à progressão mais rápida da doença (SILVA et al., 2019).

### **3.6. SINTOMAS E DIAGNÓSTICO**

Os sinais e sintomas da DA são diversos, e variam desde alterações precoces da memória até a dependência funcional e morte. Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) o diagnóstico da DA pode ser dividido em provável e possível onde os indivíduos possuem as seguintes características: comprometimento de memória recente, surgimento e progressão de prejuízos em um ou mais domínios cognitivos e um curso gradual e progressivo que gera comprometimento funcional significativo para o paciente (DSM-5, 2014). Ainda de acordo com o manual de diagnóstico, pacientes com provável DA são assim classificados se há evidências de variantes genéticas relacionadas a DA, há evidências concretas de declínio na memória e aprendizado e em pelo menos outro domínio cognitivo, declínio progressivo e gradual na cognição e ausência de evidências de etiologia mista (DSM-5, 2014). Já a possível DA é classificada se não há evidência de variantes genéticas relacionadas com a condição (DSM-5, 2014).

De acordo com o *National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA), o diagnóstico para a DA pode ser classificado em provável,

possível e provável ou possível com evidência do processo fisiopatológico da DA (NEUGROSCHL et al., 2011; MCKHANN et al., 2011). O diagnóstico de DA provável é feito quando o início da demência é insidioso, com sintomas graduais ao longo de meses a anos, ao invés de surgirem de maneira abrupta. Uma característica é a clara evidência de deterioração cognitiva, relatada ou observada. Os déficits cognitivos iniciais e mais relevantes são a apresentação amnésica, a qual é a mais comum, e envolve prejuízos na aprendizagem e recordação de informações recentes, além de disfunção cognitiva em pelo menos um domínio. Nas apresentações não amnésicas, a deficiência pode se manifestar na linguagem, cognição visuoespacial ou função executiva. O diagnóstico de provável demência da DA não é aplicado em casos com doença cerebrovascular substancial, características de outras demências específicas, evidência de outra doença neurológica ativa ou comorbidades médicas que afetem a cognição de forma significativa (MCKHANN et al., 2011).

Além disso, o diagnóstico de DA provável pode ser dividido em outros dois eixos, provável demência de DA com declínio documentado e provável demência da DA em um portador de uma mutação genética causadora da DA. A provável demência da DA com declínio documentado é caracterizada por um declínio cognitivo progressivo avaliado em diversas avaliações consecutivas, utilizando informações de terceiros e testes cognitivos de avaliação neuropsicológica formal ou exames padronizados do estado mental. O declínio documentado indica um processo patológico ativo e em contínuo (MCKHANN et al., 2011). Já em indivíduos que atendem aos critérios clínicos básicos para provável demência da DA, a presença de uma mutação genética causadora da DA (APP, PSEN1 ou PSEN2) reforça a certeza de que a condição está associada à patologia da DA (MCKHANN et al., 2011).

Um diagnóstico de possível demência DA é feito em casos de um curso atípico, os critérios clínicos essenciais para os déficits cognitivos da DA são satisfeitos, mas existe um início repentino do comprometimento cognitivo, ausência de detalhes históricos suficientes ou falta de documentação objetiva de um declínio cognitivo progressivo. Ou quando há a apresentação etiologicamente mista que abrange todos os critérios clínicos básicos para a

DA, porém demonstra a coexistência de doença cerebrovascular, caracterizada por um histórico de acidente vascular cerebral ligado temporalmente ao início ou agravamento do comprometimento cognitivo; ou a presença de múltiplos ou extensos infartos, ou carga substancial de hiperintensidade na substância branca; ou manifesta características divergentes da demência com corpos de Lewy que não se relacionam à própria demência; ou exibe evidência de outra doença neurológica, comorbidade médica não neurológica ou uso de medicamentos com potencial impacto substancial na cognição. Importante ressaltar que um diagnóstico de possível DA segundo os critérios NINCDS-ADRDA de 1984 não necessariamente corresponde aos critérios atuais para o diagnóstico de possível de demência por DA, enfatizando a recomendação de reavaliar pacientes avaliados pelo antigo critério (MCKHANN et al., 1984; MCKHANN et al., 2011).

O diagnóstico de provável demência da DA com evidência do processo fisiopatológico da DA se dá com a atualização dos critérios em 2011, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da DA. Foram adicionadas duas categorias de biomarcadores da doença sendo eles: os biomarcadores para a deposição de proteína beta-amilóide ( $A\beta$ ) no cérebro incluindo níveis reduzidos de  $A\beta$  42 no LCR e resultados positivos em imagens de amiloide por PET. Quanto aos biomarcadores de degeneração ou lesão neuronal, os principais indicadores são elevação dos níveis de tau no LCR, tanto total quanto fosforilada, a diminuição da captação de  $^{18}F$ -fluorodesoxiglicose (FDG) por PET no córtex temporo-parietal e a atrofia desproporcional no lobo temporal medial, basal e lateral, bem como no córtex parietal medial, conforme observado na ressonância magnética estrutural (BREIJYEH et al., 2020; MCKHANN et al., 2011).

Os métodos de imagem são capazes de revelar atrofia cerebral e outras anormalidades teciduais no paciente com DA. A progressão da atrofia cerebral segue o estadiamento de Braak e é observada primeiramente nas estruturas do lobo temporal medial, que inclui o córtex e o hipotálamo, e é observado que em relação aos controles, os volumes do hipocampo e do córtex em pacientes com DA são reduzidos (CHANDRA et al., 2019). A imagem por ressonância

magnética (MRI) apresenta os perfis de atividade cerebral por meio do sinal dependente do nível de oxigênio central nas tarefas de memória, os indivíduos com DA apresentam nenhuma ou menor ativação do hipocampo em comparação aos controles (LOGOTHETIS et al., 2001; SMALL et al., 1999). Para o estudo das funções sinápticas, que são dependentes de glicose, são usadas as técnicas de 18F-fluorodesoxiglicose (18F-FDG) PET e SPECT usando tecnécio-99m-hexametil propileno amina oxima (99mTc-HMPAO) ou tecnécio-99m-etil cisteinato dietílico (99mTc-ECD). Em pacientes com DA, observa-se nestas técnicas de perfusão padrões específicos de hipometabolismo e hipoperfusão em estágios iniciais da doença no córtex cingulado posterior e pré-cúneo, seguidos por diminuição nos córtices temporo-parietais posteriores, e córtices frontais afetados em estágios avançados (VALOTASSIOU et al., 2018).

Outros testes complementares usados para o rastreamento dos pacientes com possível declínio cognitivo são *Mini-Mental Status Examination* (MMSE) e *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) (WRIGHT et al., 2022). O MMSE é um teste breve e fácil de administrar, além de poder ser ajustado por idade e nível de escolaridade do paciente. Entretanto, uma das desvantagens do teste é que ele não tem alta sensibilidade e especificidade para casos de demência leve, mas é um bom teste para demência moderada e avançada (DSM-5, 2014; WRIGHT et al., 2022). Já o MoCA é um teste mais sensível e específico para o diagnóstico de demência leve e DA precoce, entretanto seu tempo de aplicação é maior que o teste anterior (WRIGHT et al., 2022; PINTO et al., 2019).

O diagnóstico da DA também pode seguir as diretrizes do *National Institute on Aging and Alzheimer's Association* (NIA-AA), onde a DA pré-clínica é definida como um estágio inicial da doença, na qual se tem uma longa fase assintomática em que alguns indivíduos apresentam evidências patológicas, mas não possuem declínio cognitivo (DUBOIS et al., 2010). A DA pré-clínica pode evoluir para o CCL, sendo que nessa fase o indivíduo apresenta dificuldade na linguagem, na memória recente, na função executiva e na função visuo-espacial (TOLBERT et al., 2019). A duração da DA pré-clínica pode variar de 6 a 10 anos e depende de diversos fatores como idade, sexo e

expressão de genes relacionados a DA, entretanto nem todos os pacientes desenvolveram a DA (VERMUNT et al., 2019; INSEL et al., 2019). Na diretriz NIA-AA, os biomarcadores usados para o diagnóstico da doença são divididos em três grupos: o grupo A avalia agregação A $\beta$ , o T a agregação da proteína Tau e o N a neurodegeneração, sendo que as avaliações são realizadas por meio da quantificação da razão A $\beta$  42 /A $\beta$  40, A $\beta$  42 e Tau fosforilada no LCR, além das técnicas de PET (JACK et al., 2018).

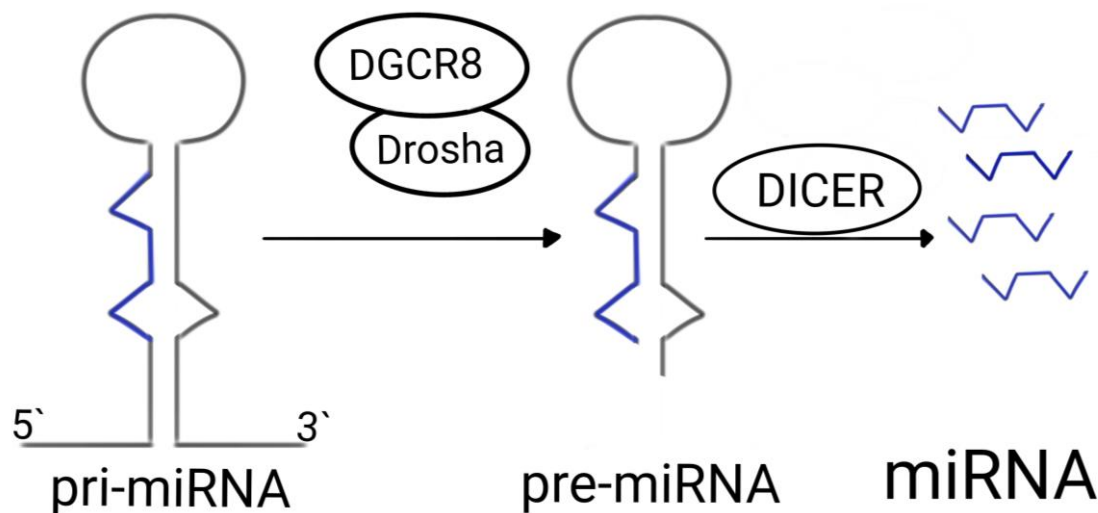
### **3.7. MiRNAs**

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) e estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica, controlando muitos processos celulares por meio de sua ação nos RNAs mensageiros (mRNA) (CORREIA DE SOUSA et al., 2019). A alteração na expressão dos miRNAs pode resultar em mudanças no perfil gênico e acarretar diversas desordens no organismo (HO et al., 2022). Devido ainda à sua alta estabilidade nos fluidos humanos, os miRNAs são potenciais biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de doenças, dentre elas a DA (HO et al., 2022).

#### ***Biogênese dos miRNAs***

Os miRNAs são inicialmente transcritos como miRNAs primários (pri-miRNA) pela RNA polimerase II de genes independentes ou representam íntrons de genes codificadores de proteína (KROL et al., 2010). Os pri-miRNAs se dobram em formato de grampos de cabelo, os quais são clivados em miRNA precursor (pré-miRNA) pela enzima endoribonuclease específica de RNA de fita dupla (DROSHA) e seu cofator DGCR8, formando uma estrutura de cerca de 70-100 nucleotídeos (KROL et al., 2010, CORREIA DE SOUSA et al., 2019; HO et al., 2022). Os pre-miRNAs então são transportados pela Exportina até o citoplasma e processados pela enzima DICER e seu cofator TRB, formando um duplex de cerca de 20 nucleotídeos cada (LEE et al., 2013; KROL et al., 2010). Duas fitas são geradas, a fita passageira, que será degradada, e a fita madura

que será incorporada no complexo de silenciamento induzido por miRNA (*RNA-induced silencing complex* - RISC). O miRNA maduro então vai se incorporar à proteína Argonata (AGO) do complexo e será guiado até o alvo da repressão (CORREIA DE SOUSA et al., 2019; HO et al., 2022) (**Figura 5**).



**Figura 5:** Maturação do miRNA. Representação da via canônica da biogênese do miRNA, evidenciando a etapa mediada pelo microprocessador (DROSHA/DGCR8) no núcleo, seguida pelo processamento DICER no citoplasma (Autoria própria).

A regulação da transcrição dos genes de miRNAs é semelhante à de genes codificadores de proteína e é uma etapa fundamental no controle da expressão. Um dos controles é feito por meio de *loops* de *feedback* autorregulatório que é importante durante a determinação e o desenvolvimento dos destinos celulares (KROL et al., 2010). Os miRNAs são boas estruturas para participarem dos *loops* de *feedback*, pois possuem a capacidade de se emparelhar diretamente nas bases de mRNAs e reprimir a codificação de fatores envolvidos na biogênese ou função dos mesmos miRNAs (KROL et al., 2010). A regulação e maturação dos miRNA ocorre por meio de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no DNA e do controle epigenético da transcrição

por meio de mecanismos clássicos de acetilação e metilação (OTA et al., 2013).

Importante salientar que um único miRNA pode controlar diferentes RNA mensageiros, e um miRNA mensageiro pode ser alvo de diversos miRNAs, dessa maneira, eles podem participar de diferentes redes de proteínas (CORREIA DE SOUSA et al., 2019). Devido a isso, vários miRNAs e outros fatores podem competir pelo mesmo alvo. Além disso, a interação entre o alvo e miRNA sofre influência de fatores como estequiometria e localização do alvo (CORREIA DE SOUSA et al., 2019).

Os miRNAs podem ainda trafegar em diferentes compartimentos celulares, por exemplo, núcleo, citoplasma e mitocôndrias dentro das células, e assim desempenham papéis na comunicação celular (CORREIA DE SOUSA et al., 2019; HO et al., 2022). Os miRNAs que migram para fora da célula podem entrar em fluidos corporais como sangue, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano, urina, entre outros (CORREIA DE SOUSA et al., 2019; BACKES et al., 2016; SZETO et al., 2014; BURGOS et al., 2014; HO et al., 2022). A maioria dos miRNAs circulantes formam complexos com proteínas e a outra parte se funde com exossomos. Assim, essas duas situações ajudam a proteger os miRNAs da digestão por RNAases dos fluidos corporais (HO et al., 2022).

### ***miRNAs como biomarcadores***

Os miRNAs circulantes são considerados promissores biomarcadores, uma vez que possuem alta especificidade, sensibilidade, são de fácil acesso e sua obtenção é minimamente invasiva (HO et al., 2022). A molécula vem sendo usada como um biomarcador de diversos cânceres como pulmão, próstata, mama, colorretal, gástrico e hepático uma vez que, muitas vezes, níveis diferencialmente expressos de miRNAs específicos são registrados nos pacientes (VALIHRACH et al., 2020; USUBA et al., 2019). Outro fator importante é que existem muitos miRNAs que apresentam padrões de expressão diferentes de acordo com o tipo da doença, por exemplo, um miRNA

que estaria elevado no câncer de pulmão poderia não ter diferença significativa no câncer de mama. Além disso, nem sempre um único miRNA pode ser suficiente para a análise da doença, sendo necessário a sobreposição de mais de um para determinada patologia (HO et al., 2022). Sendo assim, na maioria das vezes um painel de miRNAs circulantes pode ser mais viável para o prognóstico ou diagnóstico de uma condição clínica, além de serem relatados como modificadores da terapia (PEREIRA et al., 2020).

As técnicas biomoleculares usadas para a identificação e quantificação dos miRNAs já são bem conhecidas e caracterizadas, e incluem *Northern blot*, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), *Polymerase Chain Reaction Digital* (PCR digital), microarray de microRNA e sequenciamento de próxima geração (HO et al., 2022). Além disso, um campo que cresce para a análise dessas moléculas é o da bioinformática, seja para a identificação de miRNAs, predição dos alvos dos miRNAs, ou análise de perfil de expressão das moléculas em diferentes situações (CHEN et al., 2019).

### ***miRNA e DA***

Diversos estudos foram conduzidos até o momento relacionando os miRNAs com a DA. Foi relatado que os miRNAs miR-29c-3p e miR-19b-3p estariam em níveis séricos menores em pacientes com DA, o que reforça o achado em animais que mostrou que a superexpressão desses miRNAs estaria relacionada com a melhora em testes de avaliação de aprendizado e memória (WU et al., 2019). Um estudo desenvolvido por Cao et al., 2021 mostrou que a inibição do miR-29c-3p atenuou a redução da viabilidade celular e aumentou a apoptose celular induzida pelo A $\beta$ , em contrapartida a sua superexpressão diminuiu os efeitos causados por A $\beta$ , isso porque ocorreu a diminuição do conteúdo de caspase-9, caspase-3, Bax e o aumento do conteúdo de Bcl-2, por consequência ocorreu o aumento da atividade proliferativa. Outro achado postulado pelo grupo foi que a supreexpressão de miR-29c-3p aliviou a fosforilação anormal da proteína tau (CAO et al., 2021).

Em células do sangue periférico foi registrado que os pacientes com DA tiveram os miRNAs miR-3614-5p, miR-193A-5p, miR-2115-5p, miR-143-3p regulados positivamente e miR-484, miR-708-5p, miR-205-5p, miR-31-5p regulados negativamente (WU et al., 2017). Alguns dos miRNAs tiveram parte de suas vias parcialmente elucidadas, por exemplo, em experimentos realizados com culturas de células, um possível mecanismo relacionado ao miRNA-143-3p e a DA é descrito por Wang et al., 2022, que descrevem que ao se ligar na região 3' não traduzida do mRNA de DAPK1, há a inibição da sua tradução, com isso o miRNA-143-3p diminui a fosforilação da proteína tau e promove o crescimento de neuritos e a montagem de microtúbulos, além disso, ele também atenuou a fosforilação da APP e reduziu a geração de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 (WANG et al., 2022). Outro trabalho, também realizado em modelo celular, postulou que a inibição do miRNA-143-3p estaria relacionado com a promoção da sobrevivência neural, e que ocorreu a diminuição dos níveis de caspase-3 clivada e caspase-9 clivada (SUN et al., 2020).

Um método importante para eliminação de A $\beta$  é através da transcitose de A $\beta$ , conduzida pela proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1) em células endoteliais capilares (SHIBATA et al., 2020). Em pacientes com DA, há uma redução significativa do LRP1 nas células endoteliais, o que prejudica a remoção de A $\beta$ . Recentemente, foi observado que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  têm um impacto negativo na LRP1 em células endoteliais microvasculares primárias humanas. Foi observado também que a LRP1 e seu RNA mensageiro foram reduzidos até 24 horas após exposição à IL-1 $\beta$  e essa diminuição foi parcialmente mediada pelos microRNAs-205-5p, -200b-3p e -200c-3p, que foram aumentados nas células endoteliais microvasculares primárias humanas expostas à IL-1 $\beta$  (HSU et al., 2020).

Possíveis biomarcadores sanguíneos também foram identificados por Satoh et al. (2015), os quais mostraram dois grupos de miRNAs diferencialmente expressos em DA por meio de dados de RNA-Seq disponíveis *online*: miR-26b-3p, miR-28-3p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-148b-5p, miR-151a-3p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-550a-5p, miR-1468, miR-4781-3p,

miR-5001-3p e miR-6513-3p regulados positivamente; e let-7a-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, miR-15a-5p, miR-17-3p, miR-29b-3p, miR-98-5p, miR-144-5p, miR-148a-3p, miR-502-3p, miR-660-5p, miR-1294 e miR-3200-3p regulados negativamente em comparação com o grupo controle (SATOH et al., 2015).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral:

Identificar principais miRNAs em LCR envolvidos na fisiopatologia da DA e propor vias biológicas por eles regulados por meio de dados de repositório público integrados a uma revisão sistemática.

### 4.2. Objetivos específicos:

- Realizar uma busca por conjuntos de dados públicos no *Gene Expression Omnibus* (GEO) que tenham avaliado miRNAs no LCR de pacientes com DA e controles.
- Aplicar um algoritmo de *machine learning* (ML) para selecionar miRNAs expressos diferencialmente que possam estar associados à DA.
- Realizar uma revisão sistemática (RS) da literatura para caracterizar os miRNAs envolvidos na DA em LCR.
- Realizar uma análise integrativa utilizando os dados da RS para validar os miRNAs indicados na pesquisa de ML.
- Realizar o enriquecimento, análise e caracterização das vias relacionadas aos miRNAs encontrados.
- Caracterizar essas vias em termos de função biológica e associações conhecidas com a DA.

## 5. ARTIGO

### **miRNAs in Cerebrospinal Fluid Associated with Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Pathway Analysis using a Machine Learning Approach**

Jessica Diniz Pereira<sup>1</sup>, Lívia Cristina Ribeiro Teixeira<sup>2</sup>, Izabela Mamede Costa Andrade da Conceição<sup>3</sup>, Michelle Teodoro Alves<sup>4</sup>, Paulo Caramelli<sup>1</sup>, Marcelo Rizzatti Luizon<sup>3</sup>, Adriano Alonso Veloso<sup>5</sup>, Karina Braga Gomes<sup>1,2</sup>

1 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

4 – HEMOMINAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

5 – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Karina Braga Gomes

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais,  
Brazil.

Zip Code: 31270-901. Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabgb@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6870-2063

**ABSTRACT**

**Background:** Alzheimer's disease (AD) is the most common type and accounts for 60% - 70% of reported cases of dementia. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play a crucial role in gene expression regulation. Although diagnosis of AD is primarily clinical, several miRNAs have been associated with AD and considered as potential markers for diagnosis and progression of AD.

**Aim:** We sought to match AD-related miRNAs in cerebrospinal fluid found in the GeoDataSets database with miRNAs listed in a systematic review.

**Methods:** Using machine learning approaches, we identified most differentially expressed miRNAs in Gene Expression Omnibus (GEO), which were validated by the systematic review. Additionally, pathway enrichment analysis was performed to identify the main pathways involving at least four miRNAs selected.

**Results:** Seven miRNAs were identified for differentiating patients with and without AD: miRNA-1274a, miRNA-193a-5p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-145, miRNA-19b, miRNA-110, and miRNA-143. The pathways epidermal growth factor, MAPK, TGF-beta and ATM-dependent DNA damage response pathway were regulated by these miRNAs.

**Conclusions:** These findings have the potential to assist in the development of early diagnostic tests for AD using miRNAs as biomarkers, as well as define new pathophysiological mechanisms of AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid biomarkers, miRNAs, Machine Learning

## 1. INTRODUCTION

There are over 55 million people living with dementia worldwide and around 10 million new cases diagnosed each year, according to the World Health Organization (World Health Organization (WHO), 2022). Alzheimer's disease (AD) is the most common type and accounts for 60% - 70% of all reported cases of dementia (WHO), 2022). Between 2000 and 2019, AD ranked among the 10 most disabling diseases, and the ones that cause more deaths worldwide (Pan American Health Organization (PAHO), 2020).

In the vast majority of patients with AD, the initial clinical symptom is the inability to form new memories and in its late stage, it is characterized by dementia (Jagust, 2018). For a long time, AD confirmation was made exclusively by clinical criteria, with definite diagnosis being based on neuropathological evaluation or on genetic testing in cases with autosomal dominant forms of the disease (Tecalco-Cruz *et al.*, 2021). In 2011, the diagnostic guidelines were updated by the National Institute of Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA), describing that the pathophysiological processes underlying AD can begin decades before any clinical symptom. Moreover, the presence of amyloid-beta ( $A\beta$ ) plaques on the extracellular space, which leads to the formation of oligomers and fibrils in the brain, and hyperphosphorylated tau protein, which accumulates in the microtubules of neurons and forms neurofibrillary tangles (NFT), are related to disease development (McKhann *et al.*, 1984; Neugroschl *et al.*, 2011).

Consequently, the neural cells are exposed to cytotoxic agents, which lead to the destruction of the brain structure and to cognitive decline (Yang, 2019). Other mechanisms related to the development and worsening of AD are neuroinflammation, mutations in the APOE gene, neurofibrillary degeneration, synaptic dysfunction and neurotransmitter imbalance, disruption of the intestinal microbiome, presence of infectious diseases, oxidative stress, and autophagy (Bucholc *et al.* 2019). The conclusive diagnosis of AD is performed by neuropathological examination, to verify the presence of the disease or another type of dementia, or it is based on genetic testing in the rare cases with

autosomal dominant forms of the disease. However, in recent years the investigation of new biomarkers has significantly improved the diagnosis in vivo.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs between 21 and 25 nucleotides, which act in gene expression regulation by binding to the 3' UTR of messenger RNAs and marking them for degradation or inhibiting their translation (Saliminejad *et al.*, 2019). Notably, miRNAs are also found in several biologic fluids and can be used as potential biomarkers associated with DA pathophysiologies (LUKIW, 2007; Takousis *et al.*, 2019). Several studies have related the differential expression of miRNAs to AD, such as miR-9, miR-125b and miR-128, induced by the production of reactive oxygen species (ROS) in AD, and miR-29a/b/c, miR-107 miR- 181c, miR-101. miR-15, miR-125b, miR-128 and miR-146a, which had altered expression in the brains of patients with AD (LUKIW, 2007; Takousis *et al.*, 2019).

In this study, our aim was to identify miRNAs present in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients diagnosed with AD. Our findings provide for several differentially expressed miRNAs identified in the CSF of patients with AD, and suggest their potential as biomarkers for diagnosis and progression of AD.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Ethical aspects**

Ethics committee approval was not required since no human subjects were enrolled in the study, and all data analyzed was retrieved from publicly available databases. The schematic diagram of the study workflow is shown in **Figure 1**.

### **2.2 Selection and extraction of data from GEO DataBase**

We searched for data regarding patients with AD and matched cognitively healthy individuals (controls) using the terms “Alzheimer disease”, “miRNAs” and “cerebrospinal fluid” at GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), which is an online platform containing publicly available genomic, transcriptomic and proteomic datasets (Barrett *et al.*, 2013). We extracted the miRNAs

expressed and the respective fold changes between each comparison, and then used GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) for differential expression between cases and controls per sample using the cutoffs adjusted P value < 0.05 and log<sub>2</sub>-fold change >0.09.

### 2.3 Machine learning analysis

The fold-change expression of miRNAs (features) from GEO datasets of AD and controls was then used for iterative training and testing. The Light Gradient Boosting Machine (LightGBM) algorithm was applied to predict individuals who presented AD, which 90% of the dataset was selected randomly as a training and the remaining 10% was used for testing set (Bucholc *et al.*, 2019). Moreover, an internal model validation was applied through the cross-validation k-fold (k=10). The dataset was subdivided into k folds and, at each time, k-1 folds were used for training and the rest for validation.

A feature selection was implemented to identify the most relevant subset of miRNAs for predicting AD, based on the number of times that a variable was assessed by the algorithm decision. The information about the variables used by the model was stated by the Shapley Additive Explanations (SHAP) (Lundberg *et al.*, 2017), an effective model interpretation that helps to better understand the relationship between variables. The effect of each feature was calculated by the distance from the original prediction. A mean of absolute distances for each individual was used to generate a ranked list of variables according to the effect on outcome predictions for all subjects (AD *versus* healthy individuals). A negative distance was obtained if the individual had higher probability to be healthy, while a positive distance was obtained when the risk in favor of AD was higher. An average of absolute distances between variables was used to generate a ranking list. This prediction performance was measured using the area under the ROC curve (AUROC), in which the value is a number between 0.5 and one - values closer to 0.5 tend towards randomness and numbers closer to one have a greater ability to differentiate AD patients among all individuals. The miRNAs were selected based on highest AUROC model at each iteration. For the application of the models, Python software version 3.6.9 (Wilmington, DE, USA) was used.

## 2.4 Systematic review

The systematic review was planned and conducted in accordance with the Joanna Briggs Institute (JBI) Manual for Evidence Synthesis (Aromataris *et al.*, 2020)(15). The research protocol was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>), under the number CRD42022370492. We selected observational case/control studies that reported the expression of miRNAs in patients with AD compared to a healthy group.

### 2.4.1 Search strategy

The search strategy aimed to retrieve the largest number of articles on the subject published in any language and without establishing the period. The search strategy was defined by the acronym PECO – Population (P): elderly individuals, Exposure (E): Alzheimer's disease, Control (C): cognitively healthy individuals, Outcome (O): differentially expressed miRNAs in CSF. The search strategy used allowed us to formulate the following research question: “Is there a significant difference between the expression of miRNAs in the CSF of patients with AD and cognitively healthy individuals?”. Bibliographic search was carried out in the following electronic databases: MEDLINE/PubMed (Medical Literature Analysis and Retrieve System Online), Scopus, Cinahl, Web of Science and Embase. The search was fulfilled on January 26, 2022 and redone on October 24, 2022 for the selection of articles describing the expression of miRNAs in patients with AD. The search strategy was built with controlled vocabularies using Medical Subject Headings (MeSH) terminology with the words “Alzheimer Disease”, “MicroRNAs” and “Adult”. The search strategy is described in detail in **Supplementary Material 1**. In addition, we verified the publications in the gray literature by searching for the same keywords in Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>), in databases of CAPES dissertations, and in the Brazilian Digital Library of Theses and Dissertations. All findings that met the inclusion criteria for this systematic review were considered, regardless of language.

### 2.4.2 Inclusion and exclusion criteria

Observational studies including patients with AD and controls, which had CSF as analysis material and evaluation of miRNA expression were considered eligible. Studies that did not meet the eligibility criteria were excluded, namely: studies with animal models and *in vitro studies*, reviews, systematic reviews and meta-analyses, studies carried out in materials other than CSF, intervention studies and observational studies that did not quantify miRNAs or without control group, studies conducted on patients with familial AD.

Studies were retrieved from each electronic database, included in the EndNote Web reference manager software, and duplicates were excluded. The titles and abstracts of all selected articles were read in accordance with the predefined inclusion and exclusion criteria. The articles chosen for reading in full were also evaluated according to previously established eligibility criteria.

#### **2.4.3 Assessment of the risk of bias in the studies**

The JBI Critical Appraisal Checklist for Case Control Studies (Moola *et al.*, 2017) was used to assess the quality of evidence of observational studies, which classified the included studies according to their score based on 10 evaluation criteria, as follows: low-quality studies or high risk of bias had a score  $\leq 4$ , medium-quality studies or medium risk of bias had a score between 5 and 7, and high-quality studies or low risk of bias had scores  $\geq 8$  (Moola *et al.*, 2017; Munn *et al.*, 2020; Rawal *et al.*, 2022).

### **2.5 Pathway enrichment analysis**

We overlapped the findings between ML and systematic review in order to develop an integrated understanding of the differentially expressed miRNAs in AD and validated the main features identified, and the miRNAs found were followed up using pathway enrichment analysis.

Data on interactions between miRNAs and their gene targets were retrieved from the miRTarBase ([https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase\\_2022/php/index.php](https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php)). Data preprocessing was carried out using R version 4.2.2.

The miRNAs of interest were selected and enriched using the enricher function from CLusterProfiler R package databases used by the GSEA for pathway enrichment. The MSigDB curated gene sets were used, which include KEGG Pathway, Reactome, Gene Ontology, BioCarta, WikiPathways and published article gene-pathway datasets. Pathways present in four or more miRNAs enrichment and that had the p value < 0.05 were considered for the analysis.

### 3. RESULTS

#### 3.1 GEO datasets and machine learning algorithm

Two datasets from GEO were included: the TLDA miRNA Screen study for Candidate AD Biomarkers in CSF from Living Donors (Accession: GSE212558, ID:200212558), which included 50 patients with AD and 49 neurologically healthy individuals matched by age and sex; and the Validation Study for Candidate AD miRNA Biomarkers in Human CSF (Accession: GSE212623, ID:200212623), which compared 47 patients with AD and 71 neurologically healthy controls matched for age and sex. Both studies performed the identification of miRNAs using RT-PCR TaqMan Array Human MicroRNA from Thermo Fisher Scientific®. In the first study, 50 AD patients and 49 cognitively healthy individuals matched by age and sex were included. In the second, 47 patients with AD and 71 cognitively healthy controls matched for age and sex were compared. The results obtained by GEO2R showed a total of 59 miRNAs that were differentially regulated in patients with AD compared to control (**Supplementary material 2**).

The fold-change expression of 21 miRNAs for each study were analyzed by the LightGBM algorithm. No single miRNA showed an AUROC value different from the randomness value, consequently the algorithm combined more than one miRNA. The best set of miRNAs with higher AD predictive value defined by the AUROC is shown in **Table 1**.

The SHAP values for GSE212558 and GSE212623 studies are shown in **Figure 2A and 2B**, respectively, databases. Each line represents a miRNA that was selected by model, and each dot is a representation of one individual. The

blue dots represent lower fold-change value for that miRNAs, and red dots represent higher fold-change value.

### 3.2 Selection of studies from systematic review

**Figure 3** shows the flowchart for the selection of studies included in the systematic review. The initial search identified 2060 studies, 913 articles were excluded through the EndNote Online reference manager for being duplicates. The remaining 1147 articles were further evaluated, and 968 were excluded because 145 were studies with animal models or *in vitro*; 197 reviews, systematic reviews, meta-analyses or editorials; 87 interventional studies and observational studies that did not quantify miRNAs or bioinformatics studies; 156 were studies with no control group or not performed with CSF; 247 did not have full text or were studies unrelated to the population with AD (n=247); and 136 duplicates were identified later. Subsequently, the remaining 179 articles were evaluated by reading the full text, where 25 articles met the inclusion criteria (Alexandrov *Et al.*, 2012; Burgos *Et al.*, 2014; L. Cheng *Et al.*, 2018; Dangla-Valls *Et al.*, 2017; Denk *Et al.*, 2015, 2018; Derkow *Et al.*, 2018; Frigerio *Et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015; Jia *Et Al.*, 2022; Kiko *Et Al.*, 2014; Kim *Et Al.*, 2021; C. Liu *Et Al.*, 2014; C. G. Liu *Et Al.*, 2021; C.-G. Liu *Et Al.*, 2014, 2021; Lusardi *Et Al.*, 2017; Mckeever *Et Al.*, 2018; Müller *Et Al.*, 2014, 2016; Pang *Et Al.*, 2022; Riancho *Et Al.*, 2017; Sandau *Et Al.*, 2020, 2022; R. Wang *Et Al.*, 2020), however one of the articles (Pang *et al.*, 2022) was excluded before the end of the work due to a public retraction process involved. Finally, 24 articles were included in systematic review (**Table 2**). The articles were evaluated by two researchers (JDP and LCT), and the third researcher solved any doubt (KBG).

### 3.3 Studies characteristics and assessment of the bias risk

Of the reported studies, five studies were conducted in the United States (Alexandrov *et al.*, 2012; Burgos *et al.*, 2014; Lusardi *Et Al.*, 2017; sandau *et al.*, 2020, 2022), two in Spain (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Riancho *et al.*, 2017) , three in Germany (Denk *et al.*, 2015, 2018; Derkow *et al.*, 2018), seven in China (Gui *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2022; C. Liu *et al.*, 2014; C. G. Liu *et al.*, 2021; C.-G.

Liu *et al.*, 2014, 2021; R. Wang *et al.*, 2020), two in the Netherlands, one in Japan, one in Canada, one in Korea and one in Sweden (Frigerio *et al.*, 2013; Kiko *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021; Mckeever *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2014, 2016). One article did not report the participants' country of origin (L. Cheng *et al.*, 2018).

In the 24 eligible studies, 1389 patients were enrolled - 328 women and 311 men among controls; 386 women and 352 men among AD patients. The mean age of controls was  $68.79 \pm 5.55$  years and  $71.85 \pm 3.97$  years for the AD group. Among the studies, two did not present information about sex distribution (Derkow *et al.*, 2018; Gui *et al.*, 2015), and one did not present the age of controls and AD patients (L. Cheng *et al.*, 2018). The studies conducted by Liu in China involve patients from the same hospital. However, Liu does not mention in the methods whether they are the same patients in all studies. Contact was made with Liu, but without success in obtaining a response. Therefore, for calculation purposes, the studies were considered independent.

Patients with AD were diagnosed through clinical evaluation, with the aid of defined scales for the assessment of cognitive impairment, imaging tests or by evaluating brain tissue. One of the articles (Alexandrov *et al.*, 2012) used the CERAD, NIH criteria for tissue categorization, and all tissues already had a CDR classification between 2 and 3. Burgos *et al.*, 2014 used two neuropathological assessment scales for the diagnosis of the condition, being National Institute of Aging Reagan criteria (NIA-R) and Braak Stage (Burgos *et al.*, 2014) (20). Dangla-Valls *et al.*, 2017 (Dangla-Valls *et al.*, 2017) reported that all patients met the National Institute on Aging - Alzheimer's Association (NIA-AA) clinical criteria for AD (Kiko *et al.*, 2014) (28). Twelve articles used the NINCDS-ADRDA criteria (L. Cheng *et al.*, 2018; Denk *et al.*, 2015; Frigerio *et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015; Kiko *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021; Lusardi *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2014, 2016; Sandau *et al.*, 2020; R. Wang *et al.*, 2020), among them, four used the Mini Mental State Examination (MMSE) to complete the screening (L. Cheng *et al.*, 2018; Lusardi *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2014; Sandau *et al.*, 2020). The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders III, IV and V (DSM) was reported in three articles (L. Cheng *et al.*, 2018; Derkow

*et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013); MMSE was reported in seven studies (L. Cheng *et al.*, 2018; Derkow *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2022; Lusardi *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2014; Sandau *et al.*, 2020, 2022); and Montreal Cognitive Assessment (MoCA) used in one study (Lusardi *et al.*, 2017). Three articles reported that patients were also evaluated using brain magnetic resonance (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Derkow *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2016) and two using brain amyloid PET (Kiko *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021). Five studies did not report which tools were used for diagnosing patients, but all reported that the process was performed by a neurologist following guidelines for classifying cognitive decline (C. Liu *et al.*, 2014; C. G. Liu *et al.*, 2021; C.-G. Liu *et al.*, 2014, 2021; Riancho *et al.*, 2017).

Regarding biochemical markers, eight studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2018; Derkow *et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015; Riancho *et al.*, 2017; Sandau *et al.*, 2020) reported total tau protein levels with a mean value of  $437.55 \pm 255.92$  pg/mL among subjects without AD, and 10 studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2018; Derkow *et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015; Kiko *et al.*, 2014; Mckeever *et al.*, 2018; Riancho *et al.*, 2017; Sandau *et al.*, 2020) reported a mean value of  $621.10 \pm 308.35$  pg/mL for patients with AD. Phosphorylated tau protein was reported among controls in five studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2021), with a mean value of  $59.074 \pm 21.05507$  pg/mL, and among AD patients in six studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Mckeever *et al.*, 2018; Riancho *et al.*, 2017) with a mean value of  $209.255 \pm 251.2498$  pg/mL. Amyloid beta peptide values were quantified among those subjects without AD in eight studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2015; Derkow *et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Kiko *et al.*, 2014; Riancho *et al.*, 2017; Sandau *et al.*, 2020) with a mean value of  $666.13 \pm 264.30$  pg/mL, and nine studies (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Denk *et al.*, 2015, 2018; Derkow *et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015; Mckeever *et al.*, 2018; Riancho *et al.*, 2017; Sandau *et al.*, 2020) reported a mean value of  $499.0344 \pm 267.54$  pg/mL in patients with AD.

Seven articles reported the genotyping of the APOE  $\epsilon$ 4 variant. Ninety-seven control individuals had at least one  $\epsilon$ 4 allele, and 172 individuals with Alzheimer's disease (AD) had at least one  $\epsilon$ 4 allele (Burgos *et al.*, 2014; Dangla-Valls *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2022; Lusardi *et al.*, 2017; Mckeever *et al.*, 2018; Sandau *et al.*, 2020, 2022).

### 3.4 Assessment of the bias risk

Two studies had a high risk of bias (L. Cheng *et al.*, 2018; Frigerio *et al.*, 2013), ten medium risk (Dangla-Valls *et al.*, 2017; Gui *et al.*, 2015; Kiko *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021; C. Liu *et al.*, 2014; C. G. Liu *et al.*, 2021; C.-G. Liu *et al.*, 2021; Lusardi *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2016; Sandau *et al.*, 2020) and 12 studies presented low risk of bias (Alexandrov *et al.*, 2012; Burgos *et al.*, 2014; Denk *et al.*, 2015, 2018; Derkow *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2022; C.-G. Liu *et al.*, 2014; Mckeever *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2014; Riancho *et al.*, 2017; Sandau *et al.*, 2022; R. Wang *et al.*, 2020). The evaluation of the articles was presented in Figure 1S and in **Supplementary material 3**.

### 3.5 Differentially expressed miRNAs in patients with AD in the systematic review

The data showed that the miRNAs were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) method in 24 studies, and one group used next-generation sequencing (NGS) for quantification (Alexandrov *et al.*, 2012). We identified a total of 126 miRNAs found to be differentially expressed in patients with AD compared to controls (**Supplementary material 4**).

### 3.6 Integrated analysis of miRNA targets and pathways analysis

We further combined the analysis of differentially expressed set of miRNAs in ML results with systematic review (**Table 3**). The miRNAs set found in this overlap was then followed up using pathways analysis.

Thus, the pathways enrichment was performed with the miRNAs: 1274a; 193a-5p; 28-3p; 30a-3p; 145; 19b-3p; and 143. Although miRNA-100 is included in the general list of miRNAs, it was not present in the GEO2R analysis bank. This occurred because this miRNA was not detected in all samples and/or

its expression was very low. Therefore, it was not possible to perform the enrichment analysis of the pathway associated with it.

Pathways enrichment was performed individually for the predicted gene-targets of each miRNA identified in the previous step, and all results are shown in **Supplementary material 5**. Only pathways which appeared enriched in four or more results and that had a p-value lower than 0.05 were included. **Table 4** presents the identified pathways and their genes regulated. The **Figure 4** represents network analysis was performed on miRnet using the ForceAtlas algorithm and marking relevant genes according to the pathway analysis.

#### 4. DISCUSSION

The present study identified several miRNAs as possible biomarkers for AD, namely miRNA-19b-3p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA143-3p, miRNA-145-3p, miRNA-193a-5p and miRNA-1274a. They concurrently appear as possible regulators of five biological pathways: the ATM-only DNA damage response, ERBB signaling, MAPK signaling and TGF-BETA signaling.

##### 4.1 miRNAs differentially expressed

miRNA-19b was found to be downregulated in AD compared to controls (Lusardi *et al.*, 2017), and it is the central miRNA identified in the present study. It has been previously associated with the activation of macrophages in kidney damage, to the stimulus of apoptosis during myocarditis, and to several cancers (Chen *et al.*, 2021; K. Li *et al.*, 2021; Lv *et al.*, 2020). miRNA-19b was shown to be involved in the proliferation, apoptosis and cell cycle of SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line (MA *et al.*, 2016). Wu *et al.* 2017 reported that miRNA-19b could contribute to cognitive function, because the molecule participates in the regulation of STAT3 activation, an important protein in the inflammatory response in AD (WU *et al.*, 2017). Finally, miRNA-19b-3p was reported to alleviate  $\beta$ -amyloid-induced injury, and suggested to be used as a protective agent in the treatment of AD (Zhang *et al.*, 2020).

miRNA-28 is a key miRNA involved in a wide variety of cancers, and it can act as an oncogene or tumor suppressor, by modulating the expression of several genes and downstream signaling networks (Hosseini *et al.*, 2023).

However, the regulation of miRNA-28 is controversial in patients with AD. Treatment for AD with donepezil was shown to decrease the concentration of miRNA-28 and improved the symptoms of patients (Zhao *et al.*, 2020), which is in agreement with other findings in an animal model study of AD (Hong *et al.*, 2017). Conversely, other cohort study reported a decrease in miRNA-28 in patients with AD compared to cognitively healthy controls (Lusardi *et al.*, 2017), which was confirmed by the data retrieved from GEO and our ML analysis.

miRNA-30a-3p belongs to the miRNA-30a family, which also includes miRNA-30a-5p, and this miRNA family was reported to be involved in fine-tuning the expression of brain-derived neurotrophic protective factor (BDNF) (Croce *et al.*, 2013). miRNA-30a-5p decrease was reported to be a neuroprotective fact for cortical neurons of exposed rats in *in vitro* and *in vivo* models (Croce *et al.*, 2013). Notably, the neurological roles of miRNA-30a-5p have been well detailed in the literature, including that it is up-regulated in human gliomas and that its elevated expression inhibits the expression of BDNF, which suggests that its effects are harmful to the brain (Mellios *et al.*, 2008; K. Wang *et al.*, 2013). MiRNA-30a-3p has also been associated to metastasis and cell proliferation in several studies of cancers (H. Wang *et al.*, 2020; Y. Wang *et al.*, 2019). One of the regulatory target genes of miRNA-30a is the *Beclin-1*, which plays a key role in regulating cell death and survival of various cell types and it is involved in several diseases, including AD (Salminen *et al.*, 2013; H. Zhu *et al.*, 2009).

miRNA-143-3p is highly expressed in skeletal muscle tissue, and its concentration was shown to decrease during aging and it targets components of insulin signaling (Soriano-Arroquia *et al.*, 2016). In addition, it plays an important role in cancer cell events as part of anti-oncogenic processes (Akao *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2017). In vascular smooth muscle cells, it was seen that the miRNA-143 and miRNA-145 cluster is upregulated and that the cluster is necessary for cell differentiation and functioning after vascular injury (Christensen *et al.*, 2019). Moreover, miRNA-143-3p showed higher expression in the blood of patients with AD compared to controls, and its concentration was associated with the neuropsychological and imaging results (Cheng *et al.*,

2015). In the studies included in the systematic review, miRNA-143-3p was elevated in patients with AD in two cohorts from the same study, and negatively regulated in another one (Jia *et al.*, 2022; Lusardi *et al.*, 2017).

As previously mentioned, the miRNA-143 and miRNA-145 cluster was found to be upregulated and to be essential for cell differentiation and functioning after vascular injury (Christensen *et al.*, 2019). miRNA-145 is also involved in several cancers as a poor prognosis (L. Xu *et al.*, 2019). After traumatic brain injury, miRNA-145 was reported to be decreased in mice (P. Wang *et al.*, 2020) and its overexpression improved astrocyte injury in a cellular model of cerebral ischemic stroke (Zheng *et al.*, 2017), and it was also found to be dysregulated in epilepsy (Martinez *et al.*, 2023). Notably, it's the relationship with interleukin 16 (IL-16) is the main point linking miRNA-145 to AD (Huang *et al.*, 2019). Anvar *et al.* (2015) identified a positive relationship between IL-16 gene polymorphism and increased risk of AD (Anvar *et al.*, 2015). Moreover, IL-16 levels were found to be elevated in patients with AD, in blood and CSF, and a relationship was observed between the cytokine levels and the different stages of AD (Motta *et al.*, 2007).

miRNA-193a-5p is part of the miRNA-193 family (Khordadmehr *et al.*, 2019), and it is involved in several types of cancer, where it is observed the inhibition of the AKT/mTOR pathway signaling (Khordadmehr *et al.*, 2019; H. Xu *et al.*, 2020). Notably, miRNA-193a-5p levels were found to be lower in mononuclear cells from patients with AD than in cells from control individuals (D. Li *et al.*, 2023).

miRNA-1274a was also involved in carcinogenic processes, including colon and lung cancers (Ren *et al.*, 2020; S. Zhu *et al.*, 2022). While the upregulation of miRNA-1274a has been related to survival, cell proliferation, migration and invasion of colon and lung cancer, few studies associate it to neurodegenerative conditions (Ren *et al.*, 2020; S. ZHU *et al.*, 2022).

## **4.2 Epidermal growth factor (EGFR) pathway**

The epidermal growth factor receptor (EGFR), also known as ERBB1, is part of the ERBB receptor family, which also comprises the HER2/neu receptor

(ERBB2), the HER3 receptor (ERBB3) and the HER4 receptor (ERBB4) (Wong *et al.*, 2004). Epidermal growth factor (EGF) is a mitogenic factor that stimulates the proliferation of different cell types by activating the EGFR receptor, which in turn initiates cell signaling. The EGFR family of receptors is also expressed in neurons of the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex, and EGF increases differentiation, maturation and survival of these neurons (Wong *et al.*, 2004)(75). EGFR expression is also involved with several neurodegenerative conditions, including AD (Murphrey *et al.*, 2018).

EGFR linkers are cleaved in the extracellular domain by members of the disintegrin metalloprotease (ADAM10) family (Jayaswamy *et al.*, 2022). ADAM10 is an important protease observed in AD and responsible for the breakdown of APP, the increase of the  $\beta$ -secretase expression, and consequently the release of A $\beta$  oligomer. In addition, preformed A $\beta$  activates GSK-3  $\beta$  in an EGFR-dependent manner and causes tau hyperphosphorylation at specific sites (Jayaswamy *et al.*, 2022). In AD, the activation of GSK-3 has been related to increased tyrosine phosphorylation in response to external stimulation and neurite contraction (Jayaswamy *et al.*, 2022). Therefore, the EGFR-mediated signaling axis, which include ERBB family as receptors, plays an important role in the formation of A $\beta$  aggregates and NFTs (Jayaswamy *et al.*, 2022).

Additional expression of EGFRs was shown to increase memory impairment, while inhibition of receptor activities rescued memory impairment (L. Wang *et al.*, 2012). Moreover, the inhibition of EGFR pathway was suggested to prevent or delay A $\beta$ 42-induced memory loss, since its activation, mediated by oligomer peptides, could lead to tau hyperphosphorylation (Jayaswamy *et al.*, 2022; L. Wang *et al.*, 2012). Other evidence also suggests that the EGFR pathway may regulate neural plasticity by altering intracellular calcium concentration or by releasing glutamate (Abe *et al.*, 1992; Barrie *et al.*, 1996). In addition, downregulation of the hippocampal ERBB4 receptor also improved learning and memory (Tian *et al.*, 2017). Therefore, ERBB4 receptor and its fosforylated form were shown to be increased in neurons from brains with AD (Woo *et al.*, 2011).

### 4.3 MAPK signaling pathway

Mitogen-activated protein kinase P38 (MAPK) is associated to several inflammatory diseases, including AD (Lee *et al.*, 2017). MAPKs are serine/threonine-type proteins responsible for processing and regulating cellular properties in response to various extracellular stimuli (Lee *et al.*, 2017). These enzymes phosphorylate the serine or threonine hydroxyl group in proteins, and are responsible for controlling cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis (Lee *et al.*, 2017). In mammals, the main MAPKs are p38 MAPK, c - jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and ERK 5/BMK-1 (Lee *et al.*, 2017). p38 MAPK is involved in several signaling processes, and it plays an important role in the regulation of pro-inflammatory signaling networks and biosynthesis of cytokines, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Yasuda *et al.*, 2011).

p38 MAPK is expressed abundantly in regions crucial for learning and memory and it is also involved in inhibiting the differentiation of embryonic stem cells into neurons, regulation of synaptic plasticity and modulation of neuronal excitability (Aouadi *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2008). *In vivo* and *in vitro* evaluation using neurological disorder models has shown that p38 MAPK inhibition is most often effective for the treatment of neurological disorders (Lee *et al.*, 2017).

Neuroinflammation is involved in the pathology of AD due to the activation of astrocytes and microglia, and increased expression of cytokines or chemokines (Holmes *et al.*, 2009; Y. Li *et al.*, 2003; Tanji *et al.*, 2003). The pathophysiological mechanism involves the stimulation of p38 MAPK that triggers tau protein hyperphosphorylation (Kitagawa *et al.*, 2005). Moreover, elevated levels of A $\beta$  in the brain of AD patients can lead to stimulation of microglia and thus cause the release of pro-inflammatory cytokines due to pathway activation (Yasuda *et al.*, 2011). Consequently, activation of MAPK p38 pathway can also lead to destabilization of the cytoskeletal structure through tau hyperphosphorylation and decreased synaptophysin expression (Yasuda *et al.*, 2011).

The relationship between the MAPK pathway and AD has been studied for some years, because p38 MAPK levels showed higher values in the brains of patients with AD compared to healthy controls. Moreover, this increase was reported to occur in the early stages of AD, and it has also been found that MAPK kinase 6 (MKK6), an upstream activator of p38 MAPK, is up-regulated in brains of diseased individuals (Pei *et al.*, 2001; X. Zhu *et al.*, 2001). Additionally, phosphorylated p38 MAPK in the blood of patients with AD have been reported to be positively correlated with disease duration (S. Wang *et al.*, 2014). Animal model studies have also characterized the relationship between hyperphosphorylated tau and p38 MAPK activation, showing that p38 MARK activation is positively correlated with the amount of aggregated tau (S. Wang *et al.*, 2014). Therefore, the MAPK pathway is an important pathway for AD and p38 MAPK inhibition could be a neuroprotective output for these patients, as it would reduce neuroinflammation in microglia and astrocytes and improve synaptic plasticity (Lee *et al.*, 2017).

#### **4.4 TGF-BETA signaling pathway**

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is an important anti-inflammatory cytokine for the inflammation pathway, which regulates cell proliferation, differentiation, extracellular matrix formation, response to brain injury, brain inflammatory response, amyloid distribution, and inhibition of cell death (Chao *et al.*, 1994a; Norgaard *et al.*, 1995). In AD, compromised TGF- $\beta$  signaling is suggested to lead to cellular degeneration, tissue fibrosis, inflammation, decreased regenerative capacity and metabolic malfunction in neuroinflammatory diseases (Tominaga *et al.*, 2019).

Notably, TGF- $\beta$  is an injury-responsive factor, which is increased acutely after brain injury, including trauma, ischemia, and neurodegenerative diseases, such as AD (Tominaga *et al.*, 2019). TGF- $\beta$  inhibits the proliferation and differentiation of immune cells and plays an important role in the growth and survival of neurons. Inhibition of TGF- $\beta$ 1 signaling promotes neuritic degeneration and A $\beta$  production in neuroblastoma cells. Taken together, these findings indicate that impaired TGF- $\beta$  neuroprotective activity contributes to the pathology of AD (Lippa *et al.*, 1995; Tominaga *et al.*, 2019).

During inflammation, A $\beta$ 42 oligomer was also observed to stimulate microglia to increase the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , thereby interfering with the synthesis of anti-inflammatory cytokines, such as TGF- $\beta$  (Hampel *et al.*, 2020; Tominaga *et al.*, 2019). TNF- $\alpha$  inhibits A $\beta$  phagocytosis by microglia, stimulates  $\gamma$ -secretase activity, which consequently leads to increased A $\beta$  accumulation and worsens neuroinflammation. Furthermore, inflammation impairs neurotrophin signaling because it decreases TGF- $\beta$ 1 synthesis (Hampel *et al.*, 2020). However, overstimulation can lead to brain damage (Saad *et al.*, 1991; Van Der Wal *et al.*, 1993), and increase of TGF- $\beta$  followed by the increase in  $\beta$ -amyloid load was observed in a rat model study, suggesting that this fact may increase the pathogenesis of the formation of A $\beta$  (Wyss-Coray *et al.*, 1997).

Notably, patients with AD were shown to have significantly higher levels of TGF- $\beta$  compared to control group and the mild cognitive impairment (MCI) group, and the MCI group had significantly higher levels than the control group (Park *et al.*, 2021). These results are supported by previous findings who reported that patients with AD had higher expression of TGF- $\beta$  concentration in CSF and blood compared to cognitively healthy patients (Chao *et al.*, 1994b; Malaguarnera *et al.*, 2006).

#### **4.5 ATM-dependent DNA damage response pathway**

Aging is among the several main risk factors for the development of AD. DNA damage accumulates throughout life, and this process is observed as one of the causes of AD (Sedelnikova *et al.*, 2004). ATM (Ataxia-Telangiectasia) is a protein kinase that is a central mediator of responses to DNA double-strand breaks in cells (Kitagawa *et al.*, 2005). Notably, neurons show evidence for a loss of ATM in ATM-deficient mice and AD mouse models (Shen *et al.*, 2016). In human AD, the neurons also show reduced ATM protein levels (Shen *et al.*, 2016). Although they represent only a fraction of the total neurons in each affected region, their numbers significantly correlate with disease stage, suggesting that failure of ATM function may be an important contributor to the death of neurons in AD individuals (Shen *et al.*, 2016).

Neural cells are extremely susceptible to accumulation of DNA damage because they have high metabolic demands, high transcriptional activity, and have a long lifespan (Welch *et al.*, 2022). Dysfunctions in the DNA response can result in toxic gene rearrangements, transcriptional dysregulation and damage accumulation and, as a result, cell is exposed to increased apoptotic activity and senescence or uncontrolled cell division (Hoeijmakers, 2009; Madabhushi *et al.*, 2014; Welch *et al.*, 2022).

DNA damage might be one of the first indicators of neurotoxicity (Welch *et al.*, 2022). An increase in DNA damage markers was frequently observed in the brains of patients with MCI and AD (Kirova *et al.*, 2015; Myung *et al.*, 2008). Increased damage of astrocytes and neurons in the hippocampus and frontal cortex was reported in patients with AD in different stages (Pruunsild *et al.*, 2017).

Detection of DNA damage in AD brains provides evidence for the role of reactive oxygen species (ROS) in AD (Canugovi *et al.*, 2013). Part of the accumulation of DNA damage is due to the decrease in DNA repair, since it begins with the recognition and removal of an oxidized base by a DNA glycosylase, which is reduced in neurons of the hippocampus and other brain regions of AD patients (Lovell *et al.*, 2000; Weissman *et al.*, 2007). Other risk factors that affect DNA repair may also be seen in AD, such as neuroinflammation, CDK5 abnormalities, sirtuin 6 (SIRT6) downregulation, chromosomal instability, and DNA damage that affects neurogenesis (Lin *et al.*, 2020).

## **5. CONCLUSIONS**

In summary, seven miRNAs (miRNA-19b-3p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-145-3p, miRNA-193a-5p, and miRNA-1274a) have been identified to play important roles in various signalling pathways related to AD, including ATM-mediated DNA damage response, ERBB signaling, MAPK signaling, and TGF-BETA signaling. The novel findings reported here have the potential to assist in the development of early diagnostic tests for AD, as well as monitoring progression of AD. Additionally, to further explore these signalling

pathways also contribute to improving the understanding of pathophysiology of AD, thereby providing novel data that can be prioritized to guide future experimental validations.

## 6. REFERENCES

- Abe, K., & Saito, H. (1992). Epidermal growth factor selectively enhances NMDA receptor-mediated increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat hippocampal neurons. *Brain Research*, *587*(1), 102–108.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., & Naoe, T. (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncology Reports*, *16*(4), 845–850.
- Alexandrov, P. N., Dua, P., Hill, J. M., Bhattacharjee, S., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2012). microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *International journal of biochemistry and molecular biology*, *3*(4), 365.
- Anvar, N. E., Saliminejad, K., Ohadi, M., Kamali, K., Daneshmand, P., & Khorshid, H. R. K. (2015). Association between polymorphisms in Interleukin-16 gene and risk of late-onset Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *358*(1–2), 324–327. doi: 10.1016/j.jns.2015.09.344
- Aouadi, M., Bost, F., Caron, L., Laurent, K., Le Marchand Brustel, Y., & Binétruy, B. (2006). p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. *Stem Cells*, *24*(5), 1399-1406.
- Moola, S., Munn, Z., Tufanaru, C., Aromataris, E., Sears, K., Sfetcu, R., ... & Mu, P. F. (2017). Chapter 7: Systematic reviews of etiology and risk. *Joanna briggs institute reviewer's manual. The Joanna Briggs Institute*, *5*, 217-269.
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data

- sets--update. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D991-995. doi: 10.1093/nar/gks1193
- Barrie, A., Chierigatti, E., Miloso, M., Benfenati, F., & Valtorta, F. (1996). Epidermal growth factor-mediated inhibition of neurotransmitter glutamate release from rat forebrain synaptosomes. *Molecular pharmacology*, 49(3), 399-403.
- Bucholc, M., Ding, X., Wang, H., Glass, D. H., Wang, H., Prasad, G., ... & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). A practical computerized decision support system for predicting the severity of Alzheimer's disease of an individual. *Expert systems with applications*, 130, 157-171.
- Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., ... & Van Keuren-Jensen, K. (2014). Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PloS one*, 9(5), e94839.
- Canugovi, C. (2013). The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair*, 12(8), 578–587.
- Chao, C. C., Ala, T. A., Hu, S., Crossley, K. B., Sherman, R. E., Peterson, P. K., & Frey 2nd, W. H. (1994). Serum cytokine levels in patients with Alzheimer's disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1(4), 433.
- Chao, C. C., Hu, S., Frey 2nd, W. H., Ala, T. A., Tourtellotte, W. W., & Peterson, P. K. (1994). Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(1), 109-110.
- Chen, J., Zhang, K., Zhi, Y., Wu, Y., Chen, B., Bai, J., & Wang, X. (2021). Tumor-derived exosomal miR-19b-3p facilitates M2 macrophage polarization and exosomal LINC00273 secretion to promote lung adenocarcinoma metastasis via Hippo pathway. *Clinical and Translational Medicine*, 11(9), e478.
- Cheng, Á., Doeckel, J. D., Sharples, R. A., Villemagne, V. L., Fowler, C. J., Rembach, A., ... & Hill, A. F. (2015). Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with

- neuropsychological and neuroimaging assessment. *Molecular psychiatry*, 20(10), 1188-1196.
- Cheng, L., Zhang, P., & Zhang, W. (2018). Recognition of Alzheimer's Disease Related miRNAs Based on Genome-Wide Association Study Data. *NeuroQuantology*, 16(6).
- Christensen, S. T., Johansson, S. E., Warfvinge, K., Braun, T., Boettger, T., Edvinsson, L., & Haanes, K. A. (2019). Exploration of physiological and pathophysiological implications of miRNA-143 and miRNA-145 in cerebral arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74(5), 409-419.
- Croce, N., Gelfo, F., Ciotti, M. T., Federici, G., Caltagirone, C., Bernardini, S., & Angelucci, F. (2013). NPY modulates miR-30a-5p and BDNF in opposite direction in an in vitro model of Alzheimer disease: a possible role in neuroprotection?. *Molecular and cellular biochemistry*, 376, 189-195.
- Dangla-Valls, A., Molinuevo, J. L., Alirriba, J., Sánchez-Valle, R., Alcolea, D., Fortea, J., ... & Antonell, A. (2017). CSF microRNA profiling in Alzheimer's disease: a screening and validation study. *Molecular neurobiology*, 54, 6647-6654.
- Denk, J., Boelmans, K., Siegismund, C., Lassner, D., Arlt, S., & Jahn, H. (2015). MicroRNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect Alzheimers disease. *PloS one*, 10(5), e0126423.
- Denk, J., Oberhauser, F., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Fassbender, K., Schroeter, M. L., ... & FTLDc study group. (2018). Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls. *PloS one*, 13(5), e0197329.
- Derkow, K., Rössling, R., Schipke, C., Krüger, C., Bauer, J., Fähling, M., ... & Lehnardt, S. (2018). Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *PloS one*, 13(7), e0200602.
- Frigerio, C. S., Lau, P., Salta, E., Tournoy, J., Bossers, K., Vandenberghe, R., ... & De Strooper, B. (2013). Reduced expression of hsa-miR-27a-3p in CSF of patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 81(24), 2103-2106.

- Gui, Y., Liu, H., Zhang, L., Lv, W., & Hu, X. (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, *6*(35), 37043.
- Hampel, H., Caraci, F., Cuello, A. C., Caruso, G., Nisticò, R., Corbo, M., ... & Lista, S. (2020). A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Frontiers in immunology*, *11*, 456.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, *361*(15), 1475–1485. doi: 10.1056/NEJMra0804615
- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S. U., ... & Perry, V. H. (2009). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*, *73*(10), 768-774.
- Hong, H., Li, Y., & Su, B. (2017). Identification of circulating miR-125b as a potential biomarker of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mouse. *Journal of Alzheimer's Disease*, *59*(4), 1449–1458.
- Hosseini, S. F., Javanshir-Giv, S., Soleimani, H., Mollaei, H., Sadri, F., & Rezaei, Z. (2023). The importance of hsa-miR-28 in human malignancies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *161*, 114453.
- Huang, Y., Du, K. L., Guo, P. Y., Zhao, R. M., Wang, B., Zhao, X. L., & Zhang, C. Q. (2019). IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. *Molecular Immunology*, *107*, 1-9.
- Jagust, W. (2018). Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(11), 687-700.
- Jayaswamy, P. K., Vijaykrishnaraj, M., Patil, P., Alexander, L. M., Kellarai, A., & Shetty, P. (2022). Implicative Role of Epidermal Growth Factor Receptor and Its Associated Signaling Partners in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Ageing Research Reviews*, 101791.
- Jia, L., Zhu, M., Yang, J., Pang, Y., Wang, Q., Li, T., ... & Wei, Y. (2022). Exosomal microRNA-based predictive model for preclinical Alzheimer's disease: A multicenter study. *Biological Psychiatry*, *92*(1), 44-53.
- Karimi, L., Mansoori, B., Mohammadi, A., Aghapour, M., & Baradaran, B. (2017). Function of microRNA-143 in different signal pathways in cancer:

- New insights into cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 121-131.
- Khordadmehr, M., Shahbazi, R., Sadreddini, S., & Baradaran, B. (2019). miR-193: a new weapon against cancer. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 16861-16872.
- Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., & Miyazawa, T. (2014). MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 39(2), 253-259.
- Kim, S. H., Choi, K. Y., Park, Y., McLean, C., Park, J., Lee, J. H., ... & Song, W. K. (2021). Enhanced expression of microRNA-1273g-3p contributes to Alzheimer's disease pathogenesis by regulating the expression of mitochondrial genes. *Cells*, 10(10), 2697.
- Kirova, B., & Bays, R. B. (2015). RB, and Lagalwar, S.(2015). Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, 748212.
- Kitagawa, R., & Kastan, M. B. (2005, January). The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 70, pp. 99-109). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lee, J. K., & Kim, N. J. (2017). Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22(8), 1287.
- Li, D., Chen, Y., Zhang, T., Lv, Z., Zhang, L., Li, X., & Zhang, A. (2023). Profiling microRNA from peripheral blood mononuclear cells in early-onset familial Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 34(3), 178-183.
- Li, K., Ya, X., Duan, X., Li, Y., & Lin, X. (2021). miRNA-19b-3p Stimulates Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia Reperfusion via Downregulating PTEN. *Disease markers*, 2021.
- Li, Y., Liu, L., Barger, S. W., & Griffin, W. S. T. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *Journal of Neuroscience*, 23(5), 1605-1611.

- Lippa, C. F., SMITH, T. W., & FLANDERS, K. C. (1995). Transforming growth factor- $\beta$ : Neuronal and glial expression in CNS degenerative diseases. *Neurodegeneration*, 4(4), 425–432.
- Liu, C. G., Wang, J. L., Li, L., Xue, L. X., Zhang, Y. Q., & Wang, P. C. (b) (2014). MicroRNA-135a and-200b, potential Biomarkers for Alzheimer' s disease, regulate  $\beta$  secretase and amyloid precursor protein. *Brain research*, 1583, 55-64.
- Liu, C. G., Shuang, M. E. N. G., Ying, L. I., Yao, L. U., Yue, Z. H. A. O., & Wang, P. C. (b)(2021). MicroRNA-135a in ABCA1-labeled exosome is a serum biomarker candidate for Alzheimer's disease. *Biomedical and Environmental Sciences*, 34(1), 19-28.
- Liu, C. G., Song, J., Zhang, Y. Q., & Wang, P. C. (a) (2014). MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease. *Molecular medicine reports*, 10(5), 2395-2400.
- Liu, C. G., Zhao, Y., Lu, Y., & Wang, P. C. (a) (2021). ABCA1-labeled exosomes in serum contain higher microRNA-193b levels in Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2021, 1-10.
- Lovell, M. A., Xie, C., & Markesbery, W. R. (2000). Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain research*, 855(1), 116-123.
- Lukiw, W. J. (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*, 18(3), 297–300.
- Lundberg, S. M., & Lee, S. I. (2017). A unified approach to interpreting model predictions. *Advances in neural information processing systems*, 30.
- Lusardi, T. A., Phillips, J. I., Wiedrick, J. T., Harrington, C. A., Lind, B., Lapidus, J. A., ... & Saugstad, J. A. (2017). MicroRNAs in human cerebrospinal fluid as biomarkers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(3), 1223-1233.
- Lv, L. L., Feng, Y., Wu, M., Wang, B., Li, Z. L., Zhong, X., ... & Liu, B. C. (2020). Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury. *Cell Death & Differentiation*, 27(1), 210-226.

- Ma, Y., Tian, S., He, S., Chen, Q., Wang, Z., Xiao, X., ... & Lei, X. (2016). The mechanism of action of FXR1P-related miR-19b-3p in SH-SY5Y. *Gene*, *588*(1), 62-68.
- Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L. H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*, *83*(2), 266-282.
- Malaguarnera, L., Motta, M., Di Rosa, M., Anzaldi, M., & Malaguarnera, M. (2006). Interleukin-18 and transforming growth factor-beta 1 plasma levels in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neuropathology*, *26*(4), 307-312.
- Martinez, B., & Peplow, P. V. (2023). MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. *Neural Regeneration Research*, *18*(4), 716.
- McKeever, P. M., Schneider, R., Taghdiri, F., Weichert, A., Multani, N., Brown, R. A., ... & Tartaglia, M. C. (2018). MicroRNA expression levels are altered in the cerebrospinal fluid of patients with young-onset Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, *55*, 8826-8841.
- Mckhann, G. (1984). Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human service task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, *34*, 939-944.
- Mellios, N., Huang, H. S., Grigorenko, A., Rogaeve, E., & Akbarian, S. (2008). A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Human molecular genetics*, *17*(19), 3030-3042.
- Moola, S., Munn, Z., Tufanaru, C., Aromataris, E., Sears, K., Sfetcu, R., ... & Mu, P. F. (2017). Chapter 7: Systematic reviews of etiology and risk. *Joanna briggs institute reviewer's manual. The Joanna Briggs Institute*, *5*, 217-269.
- Motta, M., Imbesi, R., Di Rosa, M., Stivala, F., & Malaguarnera, L. (2007). Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunology letters*, *114*(1), 46-51.
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A., Küsters, B., & Verbeek, M. M. (2014). MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in

- hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiology of aging*, 35(1), 152-158.
- Müller, M., Jäkel, L., Bruinsma, I. B., Claassen, J. A., Kuiperij, H. B., & Verbeek, M. M. (2016). MicroRNA-29a is a candidate biomarker for Alzheimer's disease in cell-free cerebrospinal fluid. *Molecular neurobiology*, 53, 2894-2899.
- Munn, Z., Barker, T. H., Moola, S., Tufanaru, C., Stern, C., McArthur, A., ... & Aromataris, E. (2020). Methodological quality of case series studies: an introduction to the JBI critical appraisal tool. *JBI evidence synthesis*, 18(10), 2127-2133.
- Murphrey, M. B., QUAIM, L., & VARACALLO, M. (2018). *Biochemistry, Epidermal Growth Factor Receptor*.
- Myung, N.-H., Zhu, X., Kruman, I. I., Castellani, R. J., Petersen, R. B., Siedlak, S. L., Perry, G., Smith, M. A., & Lee, H. (2008). Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 30(4), 209–215. doi: 10.1007/s11357-008-9050-7
- Neugroschl, J., & Wang, S. (2011). Alzheimer's disease: diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 78(4), 596–612. doi: 10.1002/msj.20279
- Norgaard, P., Hougaard, S., Poulsen, H. S., & Spang-Thomsen, M. (1995). Transforming growth factor  $\beta$  and cancer. *Cancer treatment reviews*, 21(4), 367-403.
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., ... & Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *International journal of surgery*, 88, 105906.
- Pan American Health Organization (PAHO). (2020). WHO reveals leading causes of death and disability worldwide between 2000 and 2019. *Washington, D.C.: PAHO*. Retrieved from <https://www.paho.org/en/news/9-12-2020-who-reveals-leading-causes-death-and-disability-worldwide-between-2000-and-2019>

- Pang, Y., Lin, W., Zhan, L., Zhang, J., Zhang, S., Jin, H., ... & Li, X. (2022). Inhibiting autophagy pathway of PI3K/AKT/mTOR promotes apoptosis in SK-N-SH cell model of Alzheimer's disease. *Journal of Healthcare Engineering, 2022*.
- Park, J. K., Lee, K. J., Kim, J. Y., & Kim, H. (2021). The association of blood-based inflammatory factors IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and CRP with cognitive function in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Psychiatry investigation, 18*(1), 11.
- Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., & Cowburn, R. F. (2001). Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease, 3*(1), 41-48.
- Pruunsild, P., Bengtson, C. P., & Bading, H. (2017). Networks of Cultured iPSC-Derived Neurons Reveal the Human Synaptic Activity-Regulated Adaptive Gene Program. *Cell Reports, 18*(1), 122–135. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.018
- Rawal, S., Tackett, R. L., Stone, R. H., & Young, H. N. (2022). COVID-19 vaccination among pregnant people in the United States: a systematic review. *American journal of obstetrics & gynecology MFM, 4*(4), 100616.
- Ren, B., Yang, B., Li, P., & Ge, L. (2020). Upregulation of MiR-1274a is correlated with survival outcomes and promotes cell proliferation, migration, and invasion of colon cancer. *OncoTargets and therapy, 6*957-6966.
- Riancho, J., Vázquez-Higuera, J. L., Pozueta, A., Lage, C., Kazimierczak, M., Bravo, M., ... & Sánchez-Juan, P. (2017). MicroRNA profile in patients with Alzheimer's disease: analysis of miR-9-5p and miR-598 in raw and exosome enriched cerebrospinal fluid samples. *Journal of Alzheimer's Disease, 57*(2), 483-491.
- Saad, B., Constam, D. B., Ortmann, R., Moos, M., Fontana, A., & Schachner, M. (1991). Astrocyte-derived TGF-beta 2 and NGF differentially regulate neural recognition molecule expression by cultured astrocytes. *The Journal of cell biology, 115*(2), 473-484.

- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465. doi: 10.1002/jcp.27486
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Ojala, J., Haapasalo, A., Soininen, H., & Hiltunen, M. (2013). Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Progress in neurobiology*, 106, 33-54.
- Sandau, U. S., Wiedrick, J. T., Smith, S. J., McFarland, T. J., Lusardi, T. A., Lind, B., ... & Saugstad, J. A. (2020). Performance of validated microRNA biomarkers for Alzheimer's disease in mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 78(1), 245-263.
- Sandau, U. S., McFarland, T. J., Smith, S. J., Galasko, D. R., Quinn, J. F., & Saugstad, J. A. (2022). Differential effects of APOE genotype on MicroRNA cargo of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in females with Alzheimer's disease compared to males. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 864022.
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature cell biology*, 6(2), 168-170.
- Shen, X., Chen, J., Li, J., Kofler, J., & Herrup, K. (2016). Neurons in vulnerable regions of the Alzheimer's disease brain display reduced ATM signaling. *Eneuro*, 3(1).
- Soriano-Arroquia, A., McCormick, R., Molloy, A. P., McArdle, A., & Goljanek-Whysall, K. (2016). Age-related changes in miR-143-3p: Igfbp5 interactions affect muscle regeneration. *Aging cell*, 15(2), 361-369.
- Takousis, P., Sadlon, A., Schulz, J., Wohlers, I., Dobricic, V., Middleton, L., Lill, C. M., Perneczky, R., & Bertram, L. (2019). Differential expression of microRNAs in Alzheimer's disease brain, blood, and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 15(11), 1468–1477. doi: 10.1016/j.jalz.2019.06.4952

- Tanji, K., Mori, F., Imaizumi, T., Yoshida, H., Satoh, K., & Wakabayashi, K. (2003). Interleukin-1 induces tau phosphorylation and morphological changes in cultured human astrocytes. *Neuroreport*, *14*(3), 413-417.
- Tecalco-Cruz, A. C., Zepeda-Cervantes, J., & Ortega-Domínguez, B. (2021). Estrogenic hormones receptors in Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, *48*(11), 7517–7526. doi: 10.1007/s11033-021-06792-1
- Tian, J., Geng, F., Gao, F., Chen, Y. H., Liu, J. H., Wu, J. L., ... & Gao, T. M. (2017). Down-regulation of neuregulin1/ErbB4 signaling in the hippocampus is critical for learning and memory. *Molecular neurobiology*, *54*, 3976-3987.
- Tominaga, K., & Suzuki, H. I. (2019). TGF- $\beta$  signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *International journal of molecular sciences*, *20*(20), 5002.
- Trejo-Lopez, J. A., Yachnis, A. T., & Prokop, S. (2022). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *19*(1), 173–185. doi: 10.1007/s13311-021-01146-y
- Van Der Wal, E. A., GÓMEZ-PINILLA, F., & COTMAN, C. W. (1993). Transforming growth factor  $\beta$  1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*, *4*(1), 69–72.
- Wang, H., Kanmangne, D., Li, R., Qian, Z., Xia, X., Wang, X., & Wang, T. (2020). miR-30a-3p suppresses the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by downregulating CNPY2. *Oncology Reports*, *43*(2), 646-654.
- Wang, K., Jia, Z., Zou, J., Zhang, A., Wang, G., Hao, J., ... & Pu, P. (2013). Analysis of hsa-miR-30a-5p expression in human gliomas. *Pathology & Oncology Research*, *19*, 405-411.
- Wang, L., Chiang, H. C., Wu, W., Liang, B., Xie, Z., Yao, X., ... & Zhong, Y. (2012). Epidermal growth factor receptor is a preferred target for treating Amyloid- $\beta$ -induced memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(41), 16743-16748.

- Wang, P., Ma, H., Zhang, Y., Zeng, R., Yu, J., Liu, R., ... & Zhao, Y. (2020). Plasma exosome-derived microRNAs as novel biomarkers of traumatic brain injury in rats. *International journal of medical sciences*, 17(4), 437.
- Wang, R., & Zhang, J. (2020). Clinical significance of miR-433 in the diagnosis of Alzheimer's disease and its effect on A $\beta$ -induced neurotoxicity by regulating JAK2. *Experimental gerontology*, 141, 111080.
- Wang, S., Zhang, C., Sheng, X., Zhang, X., Wang, B., & Zhang, G. (2014). Peripheral expression of MAPK pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(5), 810-814.
- Wang, Y., Wang, F., He, J., Du, J., Zhang, H., Shi, H., ... & Zhang, J. (2019). miR-30a-3p targets MAD2L1 and regulates proliferation of gastric cancer cells. *OncoTargets and therapy*, 11313-11324.
- Weissman, L. (2007). Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Research*, 35(16), 5545–5555.
- Welch, G., & Tsai, L. (2022). Mechanisms of DNA damage-mediated neurotoxicity in neurodegenerative disease. *EMBO Reports*, 23(6), e54217.
- Wong, R. W. C., & Guillaud, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15(2–3), 147–156.
- Woo, R. S., Lee, J. H., Yu, H. N., Song, D. Y., & Baik, T. K. (2011). Expression of ErbB4 in the neurons of Alzheimer's disease brain and APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Anatomy & cell biology*, 44(2), 116-127.
- World Health Organization (WHO). (2022). Dementia. Geneva: WHO. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, Y., Xu, J., Xu, J., Cheng, J., Jiao, D., Zhou, C., ... & Chen, Q. (2017). Lower serum levels of miR-29c-3p and miR-19b-3p as biomarkers for Alzheimer's disease. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 242(2), 129-136.
- Wyss-Coray, T., Masliah, E., Mallory, M., McConlogue, L., Johnson-Wood, K., Lin, C., & Mucke, L. (1997). Amyloidogenic role of cytokine TGF- $\beta$ 1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. *Nature*, 389(6651), 603-606.

- Xu, H., Liu, Y., Cheng, P., Wang, C., Liu, Y., Zhou, W., ... & Ji, G. (2020). CircRNA\_0000392 promotes colorectal cancer progression through the miR-193a-5p/PIK3R3/AKT axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 1-17.
- Xu, L., Zhang, Y., Tang, J., Wang, P., Li, L., Yan, X., ... & Xu, M. (2019). The prognostic value and regulatory mechanisms of microRNA-145 in various tumors: a systematic review and meta-analysis of 50 studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28(5), 867-881.
- Yang, S.-H. (2019). Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in Alzheimer disease. *International Neuropsychology Journal*, 23(Suppl 2), S54.
- Yasuda, S., Sugiura, H., Tanaka, H., Takigami, S., & Yamagata, K. (2011). p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 11(1), 45-59.
- Zhang, N., Li, W. W., Lv, C. M., Gao, Y. W., Liu, X. L., & Zhao, L. (2020). miR-16-5p and miR-19b-3p prevent amyloid  $\beta$ -induced injury by targeting BACE1 in SH-SY5Y cells. *Neuroreport*, 31(3), 205-212.
- ZHAO, X., WANG, S., & SUN, W. (2020). Expression of miR 28 3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(3), 2218–2226.
- Zheng, L., Cheng, W., Wang, X., Yang, Z., Zhou, X., & Pan, C. (2017). Overexpression of MicroRNA-145 ameliorates astrocyte injury by targeting aquaporin 4 in cerebral ischemic stroke. *BioMed research international*, 2017.
- Zhong, P., Liu, W., Gu, Z., & Yan, Z. (2008). Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *The Journal of physiology*, 586(18), 4465-4479.
- Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., ... & Yang, J. M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, 5(6), 816-823.

- Zhu, S. J., Wang, X., Hu, S. L., Fang, Y., Guan, B. X., Li, J., ... & Xu, J. Y. (2022). Clinical Significance and Biological Function of miR-1274a in Non-small Cell Lung Cancer. *Molecular Biotechnology*, 64(1), 9-16.
- Zhu, X., Rottkamp, C. A., Hartzler, A., Sun, Z., Takeda, A., Boux, H., ... & Smith, M. A. (2001). Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 79(2), 311-318.

**Table 1:** Set of miRNAs for each data from GEO, evaluated by LightGBM algorithm.

<b>Dataset</b>	<b>DA patients (N)</b>	<b>Healthy controls (N)</b>	<b>miRNAs (features) selected by the model</b>	<b>AUROC</b>
<b>GSE212558</b>	50	49	miRNA-1227; miRNA-126; miRNA-1276; miRNA-100 e miRNA1274a	0.6665
<b>GSE212623</b>	47	71	miRNA-193a-5p; miRNA-28-3p; miRNA-204; miRNA30a-3p; miRNA-145; miRNA-19b; miRNA 143	0.685

**Table 2:** Data from articles included in the systematic review.

Identification	AD diagnostic criteria	Sample number	Country of origin	Age		Frequency sex	Statistical difference between		Biomarkers	Imaging exams
				Control	AD		ages	sexes		
<b>Alexandrov et al., 2012</b>	CERAD/NIH	Healthy patients: 6; AD: 6	United States	72.4±6.5	72.5±7.5	NI	No	No	NI	NI
<b>Burgos et al., 2014</b>	Braak stage, NIA-R	Healthy patients:78 ; AD: 69	United States	82.1±10	81.3±7.7	Healthy patients: 43M/35F. AD:33 M/37F	No	No	NI	NI
<b>Cheng et al., 2018</b>	MMSE, DSM-IV and NINCDS-ADRDA	Healthy patients: 10; AD: 10	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<b>Dangla-Valls et al., 2017</b>	NIA-AA	Healthy patients: 32; AD: 37	Spain	70.28 ± 3.87	72.97 ± 4.87	Healthy patients: 15M e 16F AD: 14M e 23F	No	NI	LCR Aβ42, t-tau and p-tau	Magnetic resonance
<b>Denk et al., 2015</b>	NINCDS-ADRDA and CID10	Healthy patients: 28; AD: 22	Germany	61.0 ± 12.7	72.1 ± 8.5	Healthy patients: 14M e 14F AD: 9M e 13F	Yes	No	LCR Aβ42, t-tau and p-tau	NI

<b>Denk <i>et al.</i>, 2018</b>	NINCDS	Healthy patients: 44; AD: 48	Germany	64 ± 11.3	65 ± 9.3	Healthy patients: 20M e 24F AD: 22M e 26F	No	No	LCR Aβ42, t-tau and p- tau	NI
<b>Derkow <i>et al.</i>, 2018</b>	DSM-V; MMSE	Healthy patients: 10; AD: 12	Germany	58.3 ± 11	71.5 ± 8.5	Healthy patients: 7M e 3F AD: 2M e 10F	NI	NI	LCR Aβ42, t-tau and p- tau	Magnetic resonance
<b>Frigerio <i>et al.</i>, 2013</b>	DSM-III-R criteria, NINCDS- ADRDA and ICD-10	Estudo 1 Healthy patients: 19; AD: 20 Estudo 2 Healthy patients:18 ; AD: 15	NI	Estudo 1 Healthy patients : 67.3±6. 2 Estudo 2 Healthy patients : 73±8.9	Estudo 1 AD:66. 6± 6.9 Estudo 2 AD:75. 8±8.6	Estudo 1 Healthy patients: 10M e 9F AD:10M e 10F Estudo 2 Healthy patients: 10M e 8F AD: 6M e 9F	NI	NI	LCR Aβ42, t-tau and p- tau	NI
<b>Gui <i>et al.</i>, 2015</b>	NINDS- ADRDA	Healthy patients:27 ; AD:28	China	60±13	65±12	Healthy patients: 9M e 8F AD: 15M e 13F	NI	NI	t-tau	NI

<b>Kiko <i>et al.</i>, 2014</b>	NINCDS- ADRD	Healthy patients: 10; AD: 10	Japan	73.0 ± 5.2	80.7 ± 5.8	Healthy patients: 4M e 6F AD: 3M e 7F	NI	NI	CSF-A (1- 42) CSF-tau (pg/ml)	NI
<b>Kim <i>et al.</i>, 2021</b>	NINCDS- ADRD	Healthy patients: 13; AD:14	Korea	74.46 ± 4.66	70.39 ± 4.82	Healthy patients: 7M e 6F AD: 7M e 7F	NI	NI	LCR Aβ42, t-tau and p- tau	PET- amiloide cerebral usando18 F- florbetaben
<b>Liu <i>et al.</i>, 2021 (a)</b>	AD diagnoses were made by neurologists at Xuanwu Hospital and Guangwai Hospital, according to relevant diagnostic guidelines.	Healthy patients: 6; AD: 11	China	69:4±3: 3	72:1±4: 3	Healthy patients: 4M e 2F AD: 6M e 5F	NI	NI	Creatinine, homocysteine	NI

<b>Liu <i>et al.</i>, 2021 (b)</b>	All diagnoses were conducted by the doctors at the Neurology Department, Xuanwu Hospital of Capital Medical University	Healthy patients:7; AD: 13	China	69.4 ± 3.3	72.1 ± 4.3	Líquor Healthy patients: 4M e 3F AD: 7M e 5F	NI	NI	Creatinine, homocysteine	NI
<b>Liu <i>et al.</i>, 2014 (a)</b>	NI	Healthy patients: 7; AD: 51	China	AD: 64.2±6.5 Age-matched controls	AD: 64.2±6.5 Age-matched controls	AD: 23M e 28F Sex-matched controls	Não	Não	NI	NI

<b>Liu <i>et al.</i>, 2014 (a)</b>	The diagnoses were made by the doctors of neurology department	Healthy patients:5; AD: 5	China	74.1±3.5	74.2±4.1	Healthy patients: 4M e 1F AD: 4M e 1F	NI	NI	Creatinine, homocysteine	NI
<b>Lusardi <i>et al.</i>, 2017</b>	MMSE; ADRDA- NINDS	Healthy patients: 49; AD: 50	United States	67.78±9.43	69.52±7.27	Healthy patients: 23M e 26F AD: 30M e 20F	NI	NI	NI	No

<b>McKeever et al., 2018</b>	A clinical AD diagnosis was confirmed using the CSF protein biomarkers: CSF A $\beta$ 42, p-tau, and t-tau levels. Montreal Cognitive Assessment or the modified Behavioral Neurological Assessment.	Healthy patients: 12; AD: 13	Canada	66.5 $\pm$ 7.7	75.5 $\pm$ 4.6	Healthy patients: 5M e 7F DA: 8M e 5F	sim	NI	A $\beta$ 42niveis de , p-tau and t-tau.	NI
<b>Müller et al., 2016</b>	NINCDS/AD RDA	Healthy patients: 20; AD: 18	Netherlands	63.2 $\pm$ 12.3	70.4 $\pm$ 9.1	Healthy patients: 8M e 12F AD: 8M e 10F	NI	NI	t-tau, p-tau and A $\beta$ 42	Magnetic resonance
<b>Muller et al., 2014</b>	NINCDS/AD RDA; MMSE	Healthy patients: 20; AD: 20	Netherlands	63.7 $\pm$ 9.8	69.7 $\pm$ 9.6	Healthy patients: 10M e 10F AD: 10M e 10F	NI	NI	NI	NI

<b>Riancho et al., 2017</b>	NI	Healthy patients: 18; AD: 18	Spain	71,64±10.7	68,9±9.6	Healthy patients: 6M e 12F AD: 3M e 15F			Aβ40/42, pTau and 181 /Tau	
<b>Sandau et al., 2020</b>	o ADRDA541 NINDS	Healthy patients: 65; AD: 37	United States	73.0±4.9	71.8 ± 10.1	Healthy patients: 27M e 38F AD: 23M e 14F	NI	NI	Aβ 42 and T-Tau;	NI
<b>Wang et al., 2020</b>	NINCDSADR DA	Healthy patients: 12; AD:32	China	72.53±7.60	72.92 ± 6.87	Healthy patients: 28M e 34F AD: 55M e 63F. Essa frequencia considera todos os pacientes, incluindo os pacientes que tiveram só o serum analisado	No	No	NI	NI

<b>Sandau et al., 2022</b>	MMSE	14 Healthy patients: (-3.3 e -3.9): 14; e AD (-3.3 e -3.9): 14	Estados Unidos	Healthy patients : (-3.3) 71.8 ± 7.0; Healthy patients : (-3.9) 72.1 ± 7.0;	AD (-3.3) 72.9 ± 10.0; AD (-3.9) 73.2 ± 4.6	14M/14F	No	No	NI	NI
<b>Jia et al., 2022</b>	MMSE	Coorte 2: Healthy patients: 93; AD: 95 DA / Coorte 3: Healthy patients: 102, DA 101	China	Coorte 2: Healthy patients : 68.7 ± 6.9/ Coorte 3: Healthy patients : 69.5 ± 6.4,	Coorte 2: : AD: 67.8 ±6.4/C oorte 3 AD:68.5 ± 6.6	Coorte 3: 50M/52F; Coorte 2: 52F/49M	No	No	NI	NI

Y: Yes, N: No, NI: Not identified, F: female, M: Male

**Table 3:** Final overlapping of miRNAs differentially expressed in Alzheimer's Disease compared to controls from GEO datasets and systematic review.

miRNA	GSE2125581 GEO	SR	miRNA	GSE212623 GEO	SR
<b>miRNA-100</b>	-	Up	miRNA-193a-5p	Down	Down
			miRNA-28-3p		
			miRNA-30a-3p		
<b>miRNA-1274a</b>	Down	Down	miRNA-145-3p	Down	2 Up 1 Down
			miRNA-19b-3p		
			miRNA-143-3p		

*SR: systematic review result; Up: upregulated in AD x control; Down: downregulated in AD x control.*

**Table 4:** Pathways identified for the resulting miRNAs and the genes involved.

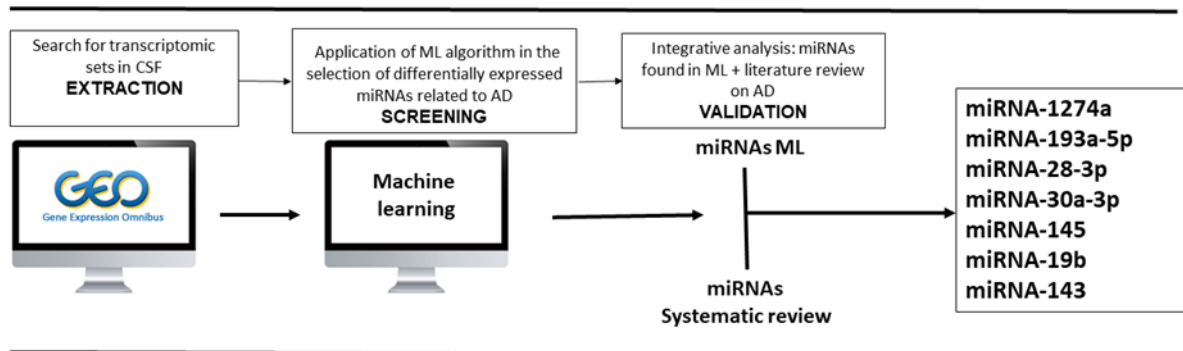
<b>Pathway*</b>	<b>miRNA</b>	<b>Genes involved</b>
<b>DNA damage response only ATM dependent</b>	-19b	PTEN, BCL2L11, PPP2R5E, ATM, SMAD4, LDLR,
	-30a	CCND2, PLAU, MAP3K1, TGFB1, TP53, WNT7B,
	-143	MAPK1, WNT10A, PIK3R3, SCP2, MYC, CDKN1B,
	-145	KRAS, WNT4, SOS2, BCL2L11, KRAS, HRAS, AKT1,
	-193	MDM2, BCL2, MAP3K7, MAPK1, SMAD3, PPP2R5E, BBC3, PIK3R1, AKT2, NFKB2, PIK3R2, CDKN1A, IRS1, MYC, NRAS, MDM2, SMAD3, SMAD4, CCND1, CCND2, SOD2, TP73, ERBB2, PIK3R3
<b>ERBB signaling pathway</b>	-30a	MYC, CDKN1B, CRK, KRAS, SOS2, HBEGF,
	-143	BCL2L11, KRAS, HRAS, AKT1, MDM2, BRAF,
	-145	MAPK1, ERBB3, CRKL, ABL2, ELK1, PIK3R1, AKT2,
	-193	PIK3R2, CDKN1A, EGFR, MYC, PAK4, NRAS, MDM2, BRAF, MAP2K4, ERBB4, RPS6KB1, CCND1, HBEGF, ELK1, ERBB2, PIK3R3, MTOR
<b>MAPK signaling pathway</b>	-19b	TGFBR2, PRKACB, RRAS2, ATF2, RASA1, FAS,
	-30a	MAP2K3, NF1, RAPGEF2, MAP3K1, MAPK14,
	-143	RAP1B, TGFB1, TP53, MAPK1, RAP1A, STK4,
	-145	RAF1, MAP3K14, MYC, STMN1, CRK, KRAS, HSPA6, SOS2, RASGRP3, CACNA1E, NFATC3, KRAS, MAPK7, HRAS, AKT1, BRAF, MAP3K7, MAPK1, TNF, CRKL, RPS6KA5, ELK1, DUSP3, NFATC1, AKT2, NFKB2, CDC25B, MAP3K2, MAPK8IP3, PDGFB, CACNG8, PPP3CA, EGFR, MYC, NRAS, MAP2K6, BRAF, TGFBR2, MAP2K4, MAP4K2, MAP3K11, NFATC1, NTRK2, RPS6KA3, DUSP6, TGFB2, ELK1, RASA1
<b>TGF-BETA signaling pathway</b>	-19b	TGFBR2, SMAD4, ATF2, RNF111, KLF10, ZFYVE9,
	-30a	TGIF1, MAP2K3, MAPK14, SKIL, ITGA2, TGFB1,
	-143	TP53, THBS1, MAPK1, RAF1, MEF2A, THBS1,

---

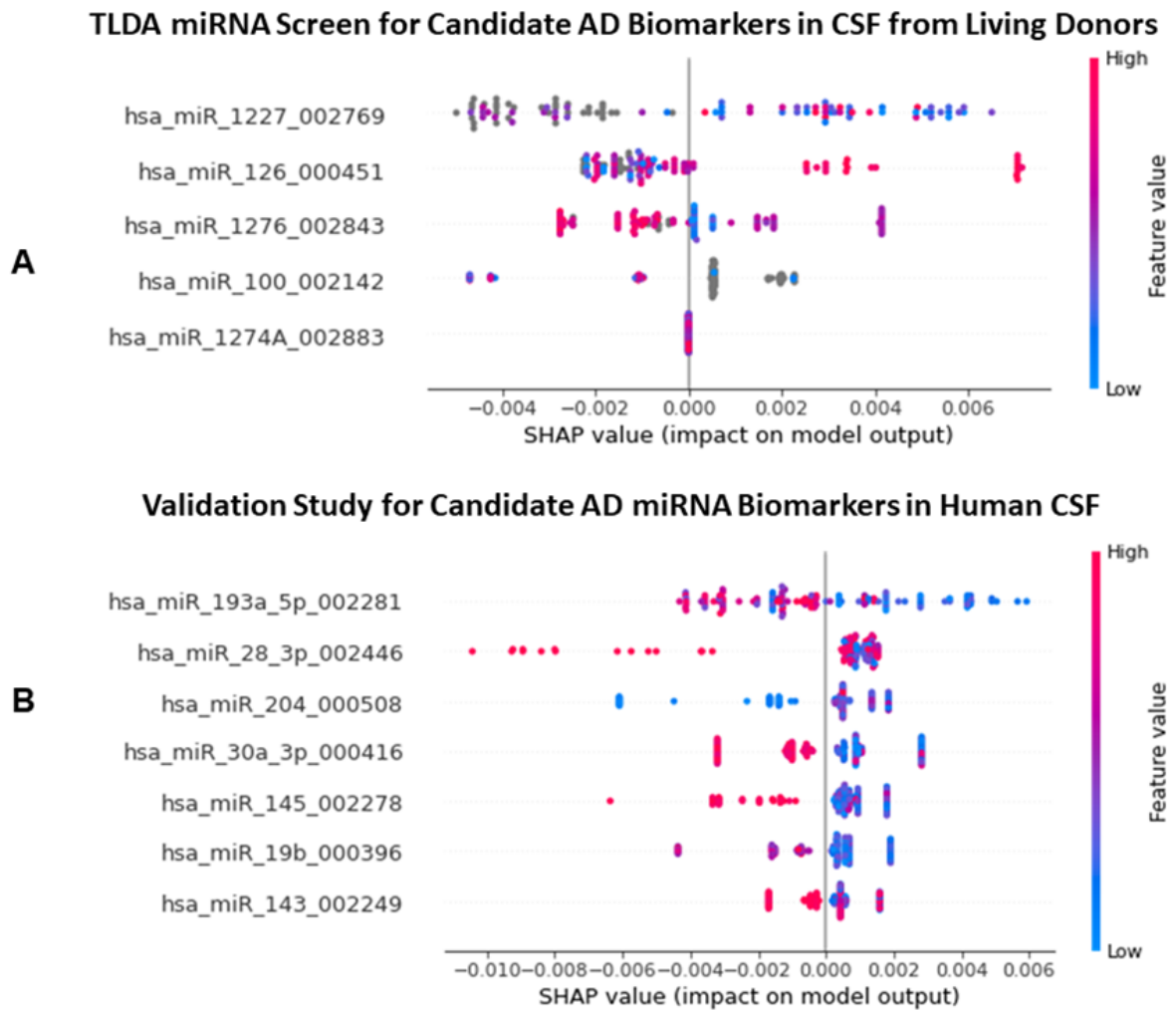
-145 MEF2A, EP300, MYC, ATF3, SUMO1, RUNX2, AKT1, MAP3K7, MAPK1, SMAD3, TFDP1, RBL1, KLF10, PIK3R1, ITGB1, ITGB4, TERT, DCP1A, PIK3R2, CDKN1A, MYC, NEDD9, MAP2K6, MMP1, MMP12, ETS1, SMAD3, TGFBR2, SMAD4, MAP2K4, SP1, ZFYVE9, ROCK1, CCND1, SPTBN1, SMAD2

---

\*All p value  $\leq$  0.048

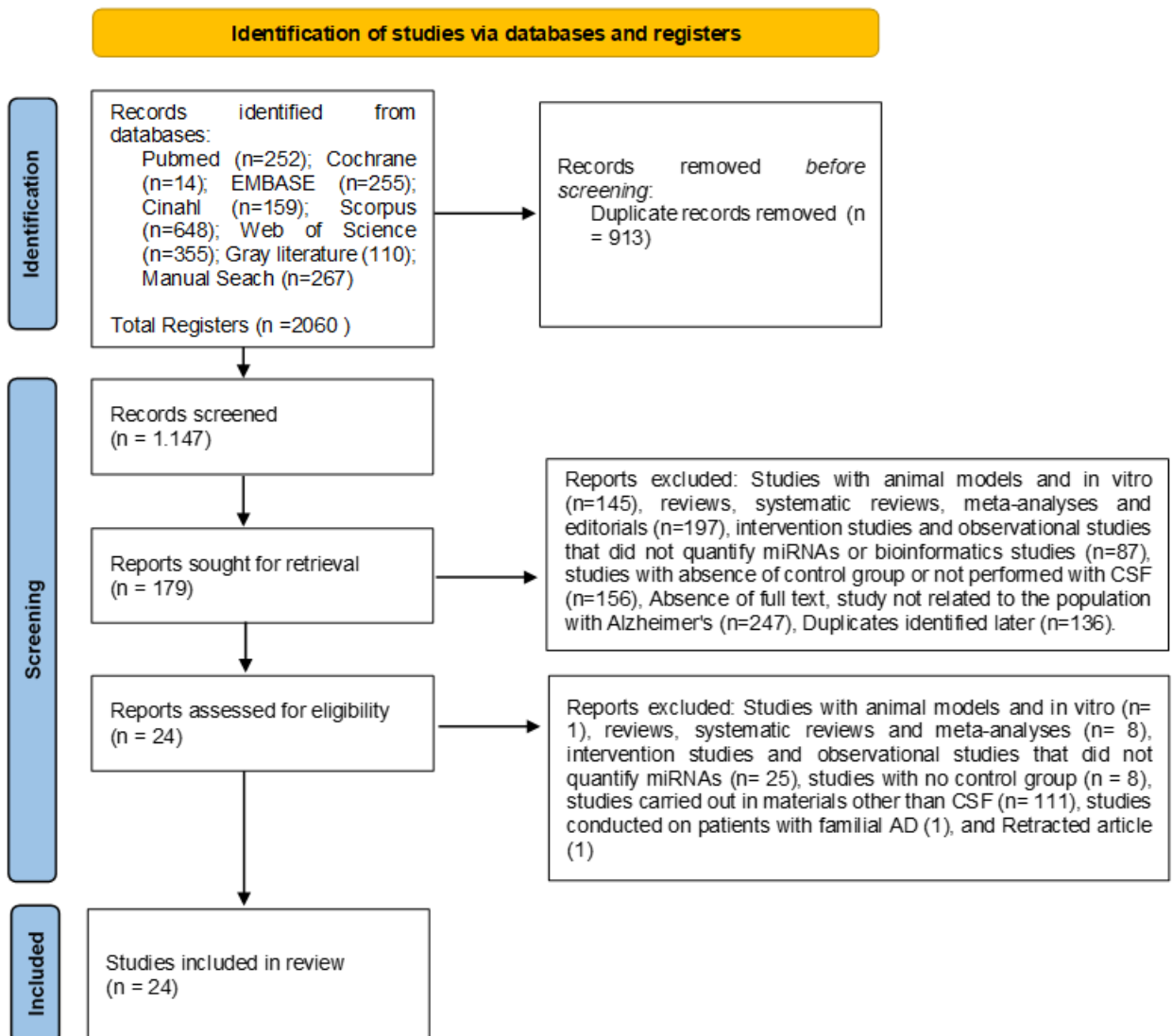


**Figure 1:** Study workflow. Schematic diagram representing the screening and validation steps of selected miRNAs. We performed a search of the Gene Expression Omnibus (GEO) for publicly available transcriptomic datasets which measured miRNAs. Next, a Machine Learning (ML) algorithm was applied in order to systematically select differentially expressed miRNAs which could be associated with AD. An integrative analysis was then performed using a systematic review in order to validate the miRNAs indicated in the ML search. Overlap between ML and systematic review showed differential expression of miRNAs 1274a, 193a-5p, 28-3p, 30a-3p, 145, 19b, and 143, which were followed up using pathway analysis.



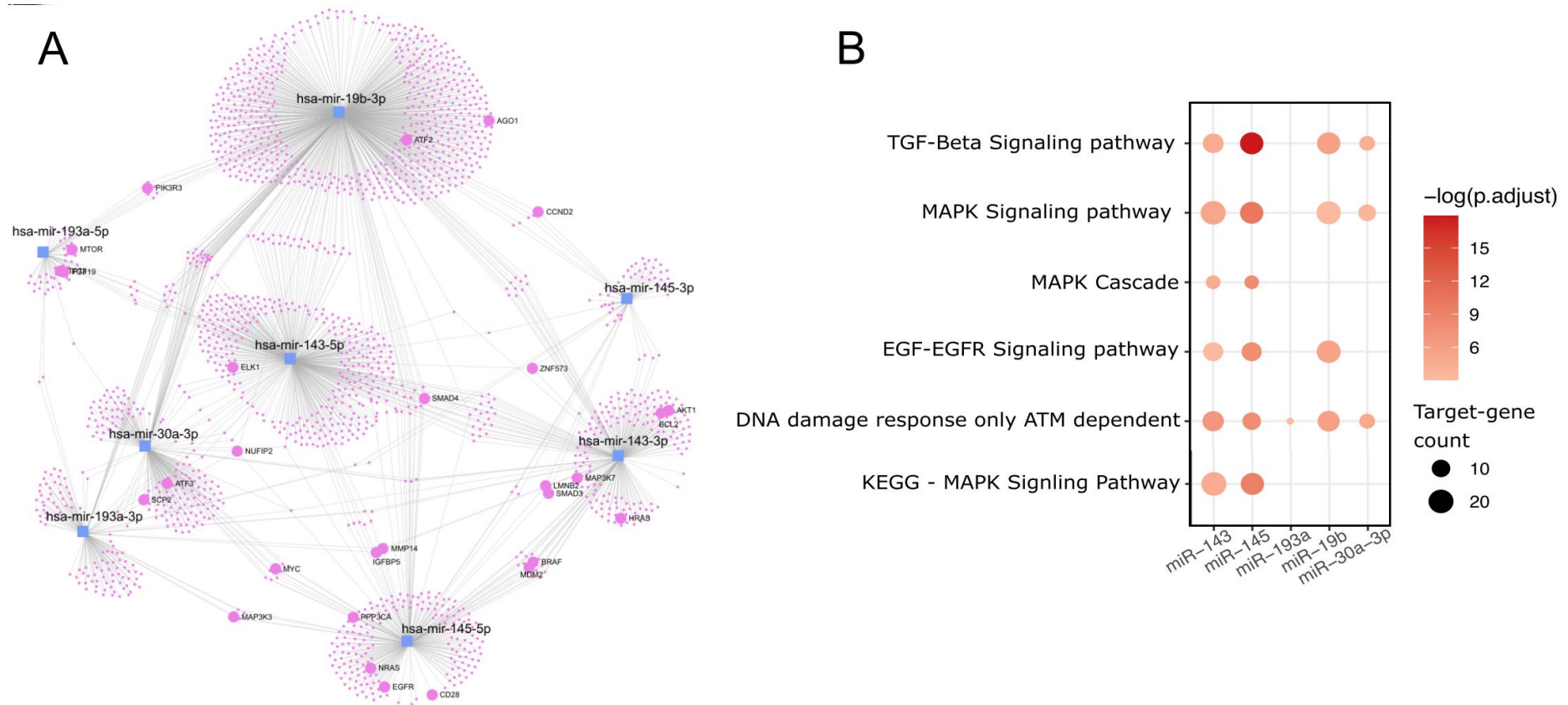
**Figure 2:** SHAP value for the LightGBM model.

Values below 0 on the X axis tend to be healthy individual, and values above 0 tend to be AD individual. The red color indicates the higher fold-change value of the miRNA and the blue color indicates the lower value. The features are presented in decrescent order of importance for the model. A) Dataset GSE212558, ID:200212558 (GEO); B) Dataset GSE212623, ID:200212623 (GEO).



**Figure 3:** Flowchart of the literature search and the study selection process.

According to *The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews* (Page et al., 2021).



**Figure 4:** Network of transcript gene interactions and lolipop of enriched pathways between the microRNA targets. A. In blue the microRNAs and in pink all their possible targets, genes which also appear on the enriched pathways are highlighted. B. Lolipop of groups of enrichment pathways present in at least four miRNA enrichments. Intensity of red represents  $-\log$  of the adjusted p value and circle radius represents the number of target genes present in that pathway.

Study ID	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Alexandrov et al., 2012	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
Burgos et al., 2014	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
Cheng et al., 2018	UN	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	UN
Dangla-Valls et al., 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Denk et al., 2015	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
Denk et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
Derkow et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
Frigerio et al., 2013	UN	UN	UN	Y	Y	Y	N	N	UN	Y
Gui et al., 2015	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Kiko et al., 2014	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Kim et al., 2021	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Liu et al., 2021 (a)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Liu et al., 2021 (b)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	UN	Y	Y
Liu et al., 2014 (a)	Y	Y	UN	Y	Y	N	Y	UN	Y	Y
Liu et al., 2014 (b)	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	UN	Y	Y
Lusardi et al., 2017	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y
McKeever et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
Müller et al., 2016	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Müller et al., 2014	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
Riancho et al., 2017	Y	Y	UN	Y	Y	N	Y	UN	Y	Y
Sandau et al., 2020	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y
Wang and Zhang, 2020	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
Sandau et al., 2022	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
Jia et al., 2022	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y

- D1 Comparison between groups
- D2 Combination between groups
- D3 Case and control identification criteria
- D4 Exposure factor measured in a standard, valid and reliable way
- D5 Exposure factor measured in the same way between groups
- D6 Identification of confounding factors
- D7 Strategies for dealing with confounders
- D8 Outcomes evaluated in a standard, valid and reliable way for cases and controls
- D9 Long exposure period to be significant
- D10 Use of appropriate statistical analysis

Y Yes  
 N No  
 UN Unclear

**Figure 1S:** Evaluation of studies through the JBI Critical Appraisal Checklist for Case Control Studies.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DA é uma condição que afeta a memória, o pensamento e o comportamento. Para melhorar o diagnóstico, tratamento e monitoramento da doença, é importante caracterizar e compreender sua fisiopatologia. Os miRNAs têm sido objeto de estudo devido ao seu papel como reguladores da expressão gênica, e têm sido associados a diversas condições fisiológicas e patológicas específicas. Sabe-se que os miRNAs podem ser detectados em fluidos corporais como o plasma, soro e LCR e têm sido considerados como biomarcadores sensíveis. Dessa forma, os miRNAs poderiam identificar pacientes no estágio inicial da DA.

Nossa revisão sistemática e análise de vias usando a abordagem de aprendizado de máquina demonstrou sete miRNAs (miRNA-19b-3p, miRNA-28-3p, miRNA-30a-3p, miRNA143-3p, miRNA-145-3p, miRNA-193a-5p and miRNA-1274a) diferencialmente expressos no LCR de pacientes diagnosticados com DA quando comparados ao grupo controle. Além disso, foram identificadas quatro vias de sinalização associadas a esses miRNAs: resposta ao dano de DNA dependente de ATM, sinalização ERBB, sinalização MAPK e sinalização TGF-BETA.

Esses miRNAs estão envolvidos em processos celulares relacionados à neuroproteção, regulação da resposta inflamatória e modificação de vias de sinalização. O miRNA-19b-3p está associado ao desempenho cognitivo e pode ter um efeito protetor contra a lesão induzida por  $\beta$ -amiloide na DA. O miRNA-30a-3p, por sua vez, atua como um neuroprotetor e regula o gene *BECLIN-1*, desempenhando um papel importante na regulação da morte celular e na sobrevivência de células relacionadas à DA. Além disso, observou-se uma maior expressão do miRNA-143-3p no sangue de pacientes com DA em comparação com indivíduos do grupo controle. No entanto, não está bem estabelecido seu papel na DA.

Foi demonstrada menor expressão do miRNA-28 com pacientes com DA quando comparado com pacientes saudáveis. Entretanto outro estudo demonstrou que níveis diminuídos de miRNA-28 estavam associados a melhora dos sintomas de pacientes com DA. A expressão do miRNA-28 na DA é controversa, foi demonstrada menor expressão do miRNA-28 em pacientes com DA quando comparado com

pacientes saudáveis. Entretanto, outro estudo demonstrou que níveis diminuídos de miRNA-28 estavam associados a melhora dos sintomas de pacientes com DA. Na DA, o miRNA-145 foi associado à interleucina 16 (IL-16). A DA é uma doença inflamatória e estudos mostram uma relação entre polimorfismos genéticos relacionados à IL-16 e o aumento do risco de DA. Existem poucas informações disponíveis sobre o miRNA-193a-5p na DA, entretanto, um estudo com células mononucleares de pacientes com DA revelou níveis mais baixos desse miRNA em comparação aos pacientes controle. Da mesma forma, o miRNA-1274a possui pouca relação documentada com a doença. Sendo assim, são necessários outros estudos para compreender o papel desses miRNAs na fisiopatologia da DA. No entanto, conforme sugerido no modelo de algoritmo proposto no presente estudo, esses miRNAs podem ser bons marcadores quando combinados.

Uma das vias identificadas foi a do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o qual desempenha um papel importante na formação de agregados de A $\beta$  e emaranhados neurofibrilares na DA. A ativação do EGFR está relacionada à hiperfosforilação da proteína tau e à perda de memória. A inibição dessa via pode prevenir esses efeitos e melhorar a plasticidade neural. Já a via de sinalização MAPK, especialmente a proteína quinase ativada por mitógeno P38 (MAPK P38), está envolvida em processos inflamatórios, neurotoxicidade, neuroinflamação e disfunção sináptica relacionados à DA. A ativação da via leva à hiperfosforilação da proteína tau e à liberação de citocinas pró-inflamatórias, que causa neuroinflamação e desestabilização do citoesqueleto. Estudos mostram que os níveis de MAPK P38 estão aumentados em cérebros de pacientes com DA, especialmente em estágios iniciais, e sua ativação está correlacionada com a progressão da doença. A inibição da MAPK P38 pode ser uma abordagem neuroprotetora para o tratamento da DA, reduzindo a neuroinflamação e melhorando a plasticidade sináptica.

O TGF- $\beta$  é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante na regulação da inflamação e na saúde do cérebro. Na DA, a função do TGF- $\beta$  pode ser comprometida, levando a problemas como degeneração celular, inflamação e disfunção metabólica. Estudos mostraram que pacientes com DA têm níveis mais altos de TGF- $\beta$  em comparação com indivíduos saudáveis. Essas descobertas destacam a importância do TGF- $\beta$  na patologia da DA. A via de

resposta ao dano do DNA dependente de ATM desempenha papel importante na regulação do estresse celular, integridade genômica, inflamação e homeostase celular. Vários genes nessa via estão associados à progressão da DA, deposição neurofibrilar e modulação de processos neurodegenerativos.

Em síntese, os miRNAs diferencialmente expressos e suas vias de sinalização associadas apresentam-se como promissores candidatos para entender e abordar a DA. No entanto, o papel específico de cada miRNA requer investigações adicionais para esclarecer seus mecanismos e potenciais terapêuticos. A função exata desses miRNAs e vias identificadas no trabalho na fisiopatologia da DA carece de elucidação e demanda estudos adicionais. A complexidade dessas moléculas é evidenciada pelas associações contraditórias, como observado com o miRNA-28. Apesar disso, como sugerido pelo modelo de algoritmo proposto, a combinação desses miRNAs pode representar uma abordagem promissora. Ademais, a identificação de vias de sinalização cruciais, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a sinalização MAPK e o papel do TGF- $\beta$ , oferece direções concretas para terapias neuroprotetoras e intervenções mais eficazes no tratamento da DA. A abordagem combinada desses biomarcadores e vias de sinalização pode oferecer uma visão mais completa da fisiopatologia da DA e, conseqüentemente, abrir caminhos para estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realização de estudos similares com a população de risco para o desenvolvimento da DA.
- Realização de estudos similares em diferentes estágios da DA, como o grupo com comprometimento cognitivo leve (CCL), e/ou com grupos que possuem diferentes tipos de demências.
- Validação dos miRNAs encontrados como biomarcadores de DA.
- Embasamento para a exploração das intervenções terapêuticas que visam melhorar o funcionamento das vias que estão desreguladas na DA.
- Inclusão e investigação de novas vias que estão relacionadas com a doença, além das que são tradicionalmente relacionadas.
- Realização de estudos longitudinais, com finalidade de acompanhar a expressão dos miRNAs em pacientes com risco elevado de DA e/ou pacientes com DA que foram submetidos a algum tipo de intervenção.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-RODRIGUEZ, Jose et al. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. **The Journal of cell biology**, v. 167, n. 5, p. 953-960, 2004.

ALZHEIMER DISEASE INTERNATIONAL. **Dementia facts & figures**. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/>. Acesso em: 1 fev. 2023.

ALZHEIMER DISEASE INTERNATIONAL. **Dementia facts & figures**. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/>. Acesso em: 1 fev. 2023.

ALZHEIMER, Alois et al. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". **Clinical anatomy (New York, NY)**, v. 8, n. 6, p. 429-431, 1995.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.*, 19: 1598-1695.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Alzheimer e demência no Brasil**. Disponível em: <https://www.alz.org/br/demencia-alzheimer-brasil.asp> . Acesso em: 12 abr. 2023.

ASHRAFIAN, Hossein; ZADEH, Elaheh Hadi; KHAN, Rizwan Hasan. Review on Alzheimer's disease: inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. **International journal of biological macromolecules**, v. 167, p. 382-394, 2021.

AUGUSTINACK, Jean C. et al. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 103, p. 26-35, 2002.

BACKES, Christina; MEESE, Eckart; KELLER, Andreas. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 20, p. 509-518, 2016.

BATEMAN, Randall J.; BARTHELEMY, Nicolas R.; HORIE, Kanta. Another step forward in blood-based diagnostics for Alzheimer's disease. **Nature medicine**, v. 26, n. 3, p. 314-316, 2020.

BAYER, T. A. et al. It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. **Molecular psychiatry**, v. 4, n. 6, p. 524-528, 1999.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **Conhecer a demência, conhecer o Alzheimer: o poder do conhecimento – Setembro, Mês Mundial do Alzheimer**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/conhecer-a-demencia-conhecer-o-alzheimer-o-poder-do-conhecimento-setembro-mes-mundial-do-alzheimer/#:~:text=No%20Brasil%2C%20cerca%20de%201,a%2050%20milh%C3%B5es%20de%20pessoas..> Acesso em: 14 abr. 2023.

BRADSHAW, Elizabeth M. et al. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 848-850, 2013.

BREIJYEH, Zeinab; KARAMAN, Rafik. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5789, 2020.

BURGOS, Kasandra et al. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e94839, 2014.

BUTTERFIELD, D. Allan; HALLIWELL, Barry. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148-160, 2019.

CAO, Yanqun et al. MiR-29c-3p May Promote the Progression of Alzheimer's Disease through BACE1. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2021, 2021.

CHANDRA, Avinash et al. Magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Journal of neurology**, v. 266, p. 1293-1302, 2019.

CHEIGNON, Clémence et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox biology**, v. 14, p. 450-464, 2018.

CHEN, Liang et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1836-1852, 2019.

CHEN, Peng; ZHILEI, Guo; ZHOU, Benhong. Insight into the role of adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, p. 101828, 2022.

CHOW, Vivian W. et al. An overview of APP processing enzymes and products. **Neuromolecular medicine**, v. 12, p. 1-12, 2010.

CONGDON, Erin E.; SIGURDSSON, Einar M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 7, p. 399-415, 2018.

CORDER, Elizabeth H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921-923, 1993.

CORREIA DE SOUSA, Marta et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 24, p. 6249, 2019.

DE SOUSA MARTA, C. et al. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing [J]. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 24, p. 6249, 2019.

DE STROOPER, Bart; KARRAN, Eric. The cellular phase of Alzheimer's disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603-615, 2016.

DINIZ PEREIRA, Jessica et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: A systematic review of proteomic studies. **Journal of neurochemistry**, v. 156, n. 6, p. 753-776, 2021.

DISABATO, Damon J.; QUAN, Ning; GODBOUT, Jonathan P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of neurochemistry**, v. 139, p. 136-153, 2016.

DUBOIS, Bruno et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1118-1127, 2010.

DUMITRESCU, Logan et al. Sex differences in the genetic predictors of Alzheimer's pathology. **Brain**, v. 142, n. 9, p. 2581-2589, 2019.

FAN, Ling-Yun et al. Marital status, lifestyle and dementia: a nationwide survey in Taiwan. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0139154, 2015.

GALVÃO JR, Fernando et al. The amyloid precursor protein (APP) processing as a biological link between Alzheimer's disease and cancer. **Ageing Research Reviews**, v. 49, p. 83-91, 2019.

GALVIN, James E.; SADOWSKY, Carl H. Practical guidelines for the recognition and diagnosis of dementia. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 25, n. 3, p. 367-382, 2012.

GLENNER, George G.; WONG, Caine W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 120, n. 3, p. 885-890, 1984.

GONG, C.-X.; IQBAL, Khalid. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 23, p. 2321-2328, 2008.

GONNEAUD, Julie et al. Relative effect of APOE  $\epsilon$ 4 on neuroimaging biomarker changes across the lifespan. **Neurology**, v. 87, n. 16, p. 1696-1703, 2016.

GRIFFITHS-JONES, Sam et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl\_1, p. D140-D144, 2006.

GUERREIRO, Rita et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 2, p. 117-127, 2013.

GUERREIRO, Rita; HARDY, John. Genetics of Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 11, p. 732-737, 2014.

HÅKANSSON, Krister et al. Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. **Bmj**, v. 339, 2009.

HAYASHI, Hideki et al. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 1933-1941, 2007.

HENEKA, Michael T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

HENSLEY, K. et al. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 8, p. 3270-3274, 1994.

HEPPNER, Frank L.; RANSOHOFF, Richard M.; BECHER, Burkhard. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358-372, 2015.

HICKMAN, Suzanne E.; ALLISON, Elizabeth K.; EL KHOURY, Joseph. Microglial dysfunction and defective  $\beta$ -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8354-8360, 2008.

HO, Phuong TB; CLARK, Ian M.; LE, Linh TT. MicroRNA-based diagnosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7167, 2022.

HOE, Hyang-Sook et al. Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3425-3431, 2006.

HSU, Heng-Wei et al. Inflammatory Cytokine IL-1 $\beta$  Downregulates Endothelial LRP1 via MicroRNA-mediated Gene Silencing. **Neuroscience**, v. 453, p. 69-80, 2021.

INSEL, Philip S. et al. Determining clinically meaningful decline in preclinical Alzheimer disease. **Neurology**, v. 93, n. 4, p. e322-e333, 2019.

IONESCU-TUCKER, Andra; COTMAN, Carl W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 107, p. 86-95, 2021.

JACK JR, Clifford R. et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 4, p. 535-562, 2018.

JAGUST, William. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 687-700, 2018.

JIN, Ming et al. Soluble amyloid  $\beta$ -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5819-5824, 2011.

JONSSON, Thorlakur et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 2, p. 107-116, 2013.

KABIR, Md Tanvir et al. Exploring the role of PSEN mutations in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 38, p. 833-849, 2020.

KANG, Jie et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, n. 6106, p. 733-736, 1987.

KHAN, Sahil; BARVE, Kalyani H.; KUMAR, Maushmi S. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 11, p. 1106-1125, 2020.

KIM, Tae-Suk et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International journal of geriatric psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 344-348, 2006.

KJERSEM, J. B. et al. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment. **Molecular oncology**, v. 8, n. 1, p. 59-67, 2014.

KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010.

LARSSON, Susanna C.; MARKUS, Hugh S. Does treating vascular risk factors prevent dementia and Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 64, n. 2, p. 657-668, 2018.

LEDUC, Valérie; JASMIN-BÉLANGER, Stéphanie; POIRIER, Judes. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 10, p. 469-477, 2010.

LEE, Chang Youn et al. miRNAs as therapeutic tools in Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13012, 2021.

LEE, Ho Young et al. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 13, p. 6568-6576, 2013.

LENG, Fangda; EDISON, Paul. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157-172, 2021.

LOGOTHETIS, Nikos K. et al. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. **nature**, v. 412, n. 6843, p. 150-157, 2001.

LOTTA, Luca A. et al. Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. **Nature genetics**, v. 49, n. 1, p. 17-26, 2017.

LUCIN, Kurt M. et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 79, n. 5, p. 873-886, 2013.

LUKIW, Walter J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. **Neuroreport**, v. 18, n. 3, p. 297-300, 2007.

LUNA-MUNOZ, Jose et al. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 12, n. 4, p. 365-375, 2007.

MA, May-Thu et al. Effects of cholesterol oxidation products on exocytosis. **Neuroscience letters**, v. 476, n. 1, p. 36-41, 2010.

Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2014.

MARTENS, Yuka A. et al. ApoE Cascade Hypothesis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related dementias. **Neuron**, 2022.

MATYI, Joshua et al. Sex differences in risk for Alzheimer's disease related to neurotrophin gene polymorphisms: the cache county memory study. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 72, n. 12, p. 1607-1613, 2017.

MCGRATH, Emer R. et al. Blood pressure from mid-to late life and risk of incident dementia. **Neurology**, v. 89, n. 24, p. 2447-2454, 2017.

MCINTOSH, Elissa C.; NATION, Daniel A.; ALZHEIMER'S DISEASE NEUROIMAGING INITIATIVE. Importance of treatment status in links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Diabetes care**, v. 42, n. 5, p. 972-979, 2019.

MCKHANN, Guy et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group\* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939-939, 1984.

MCKHANN, Guy M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia**, v. 7, n. 3, p. 263-269, 2011.

MCLAURIN, J.; DARABIE, A. A.; MORRISON, M. R. Cholesterol, a Modulator of Membrane-Associated A $\beta$ -Fibrillogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 977, n. 1, p. 376-383, 2002.

MIECH, R. A. et al. Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study. **Neurology**, v. 58, n. 2, p. 209-218, 2002.

MONTINE, Thomas J. et al. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. **Acta neuropathologica**, v. 123, p. 1-11, 2012.

MURPHY, Kelly R. et al. Mapping the effects of ApoE4, age and cognitive status on 18F-florbetapir PET measured regional cortical patterns of beta-amyloid density and growth. **Neuroimage**, v. 78, p. 474-480, 2013.

NAKAJIMA, Chikako et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 30, p. 21909-21923, 2013.

NEUGROSCHL, Judith; WANG, Sophia. Alzheimer's disease: diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. **Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 78, n. 4, p. 596-612, 2011.

NUZZO, Domenico et al. A natural dietary supplement with a combination of nutrients prevents neurodegeneration induced by a high fat diet in mice. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1130, 2018.

O'BRIEN, Richard J.; WONG, Philip C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annual review of neuroscience**, v. 34, p. 185-204, 2011.

OISHI, Emi et al. Day-to-day blood pressure variability and risk of dementia in a general Japanese elderly population: the Hisayama Study. **Circulation**, v. 136, n. 6, p. 516-525, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>. Acesso em: 14 abr. 2023.

OTA, Hiromitsu et al. ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 575-589, 2013.

PANCHAL, Maï et al. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 3, p. 598-605, 2010.

PEREIRA, Jessica Diniz et al. microRNAs associated to anthracycline-induced cardiotoxicity in women with breast cancer: A systematic review and pathway analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110709, 2020.

PIKE, Christian J.; CUMMINGS, Brian J.; COTMAN, Carl W. beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. **Neuroreport**, v. 3, n. 9, p. 769-772, 1992.

PINTO, Tiago CC et al. Is the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) screening superior to the Mini-Mental State Examination (MMSE) in the detection of mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) in the elderly?. **International psychogeriatrics**, v. 31, n. 4, p. 491-504, 2019.

PROKOP, Stefan; MILLER, Kelly R.; HEPPNER, Frank L. Microglia actions in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 126, p. 461-477, 2013.

RIEDEL, Brandalyn C.; THOMPSON, Paul M.; BRINTON, Roberta Diaz. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 160, p. 134-147, 2016.

SATOH, Jun-ichi; KINO, Yoshihiro; NIIDA, Shumpei. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. **Biomarker insights**, v. 10, p. BMI. S25132, 2015.

SCHELTENS, Philip et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10284, p. 1577-1590, 2021.

SCHOONENBOOM, N. S. M. et al. Amyloid  $\beta$  (1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. **Neurology**, v. 62, n. 9, p. 1580-1584, 2004.

SEN, Abhik; ALKON, Daniel L.; NELSON, Thomas J. Apolipoprotein E3 (apoE3) but not apoE4 protects against synaptic loss through increased expression of protein kinase C $\epsilon$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15947-15958, 2012.

SERRANO-POZO, Alberto; DAS, Sudeshna; HYMAN, Bradley T. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 1, p. 68-80, 2021.

SILVA, Marcos Vinícius Ferreira et al. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. **Journal of biomedical science**, v. 26, p. 1-11, 2019.

SIMARD, Alain R. et al. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 489-502, 2006.

SUN, Chengyan et al. miR-143-3p inhibition promotes neuronal survival in an Alzheimer's disease cell model by targeting neuregulin-1. **Folia Neuropathologica**, v. 58, n. 1, p. 10-21, 2020.

SHIBATA, Masayoshi et al. Clearance of Alzheimer's amyloid- $\beta$  1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 12, p. 1489-1499, 2000.

SMALL, Scott A. et al. Differential regional dysfunction of the hippocampal formation among elderly with memory decline and Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, v. 45, n. 4, p. 466-472, 1999.

SOBÓW, Tomasz; FLIRSKI, Marcin; LIBERSKI, Paweł. Amyloid-beta and tau proteins as biochemical markers of Alzheimer's disease. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 64, n. 1, p. 53-70, 2004.

SWARBRICK, Samantha et al. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 56, p. 6156-6167, 2019.

SZETO, Cheuk-Chun. Urine miRNA in nephrotic syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 308-313, 2014.

TAKOUSIS, Petros et al. Differential expression of microRNAs in Alzheimer's disease brain, blood, and cerebrospinal fluid. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 11, p. 1468-1477, 2019.

TERZO, Simona; AMATO, Antonella; MULÈ, Flavia. From obesity to Alzheimer's disease through insulin resistance. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 35, n. 11, p. 108026, 2021.

THAL, Dietmar Rudolf et al. Neuropathology and biochemistry of A $\beta$  and its aggregates in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 129, p. 167-182, 2015.

TIWARI, Sneham et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International journal of nanomedicine**, p. 5541-5554, 2019.

TOLBERT, Sierra et al. Financial management skills in aging, MCI and dementia: cross sectional relationship to 18F-florbetapir PET cortical  $\beta$ -amyloid deposition. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 6, p. 274-282, 2019.

TÖNNIES, Eric; TRUSHINA, Eugenia. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.

TREJO-LOPEZ, Jorge A.; YACHNIS, Anthony T.; PROKOP, Stefan. Neuropathology of Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, p. 1-13, 2021.

USUBA, Wataru et al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. **Cancer science**, v. 110, n. 1, p. 408-419, 2019.

VALIHRACH, Lukas; ANDROVIC, Peter; KUBISTA, Mikael. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 72, p. 100825, 2020.

VALOTASSIOU, Varvara et al. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease. **Annals of nuclear medicine**, v. 32, p. 583-593, 2018.

VERMUNT, Lisa et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 7, p. 888-898, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em: 15 fev. 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on the public health response to dementia**. Geneva. 2021.

WRIGHT, Ashleigh EH; HARRELL, Heather E. Physical Examination in the Evaluation of Dementia. **Medical Clinics**, v. 106, n. 3, p. 471-482, 2022.

WU, Yuquan et al. Lower serum levels of miR-29c-3p and miR-19b-3p as biomarkers for Alzheimer's disease. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 242, n. 2, p. 129-136, 2017.

XUE, Mei et al. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. **Ageing research reviews**, v. 55, p. 100944, 2019.

YANG, Seung-Hoon. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in Alzheimer disease. **International Neurology Journal**, v. 23, n. Suppl 2, p. S54, 2019.

YE, Haiqiong et al. The role of post-translational modifications on the structure and function of tau protein. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 8, p. 1557-1571, 2022.

YE, Shiming et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid  $\beta$  peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18700-18705, 2005.

ZHANG, Nan et al. miR-16-5p and miR-19b-3p prevent amyloid  $\beta$ -induced injury by targeting BACE1 in SH-SY5Y cells. **Neuroreport**, v. 31, n. 3, p. 205-212, 2020.

ZHANG, X.-X. et al. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 8, p. 313-321, 2021.

ZHANG, Yun-wu et al. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular brain**, v. 4, p. 1-13, 2011.

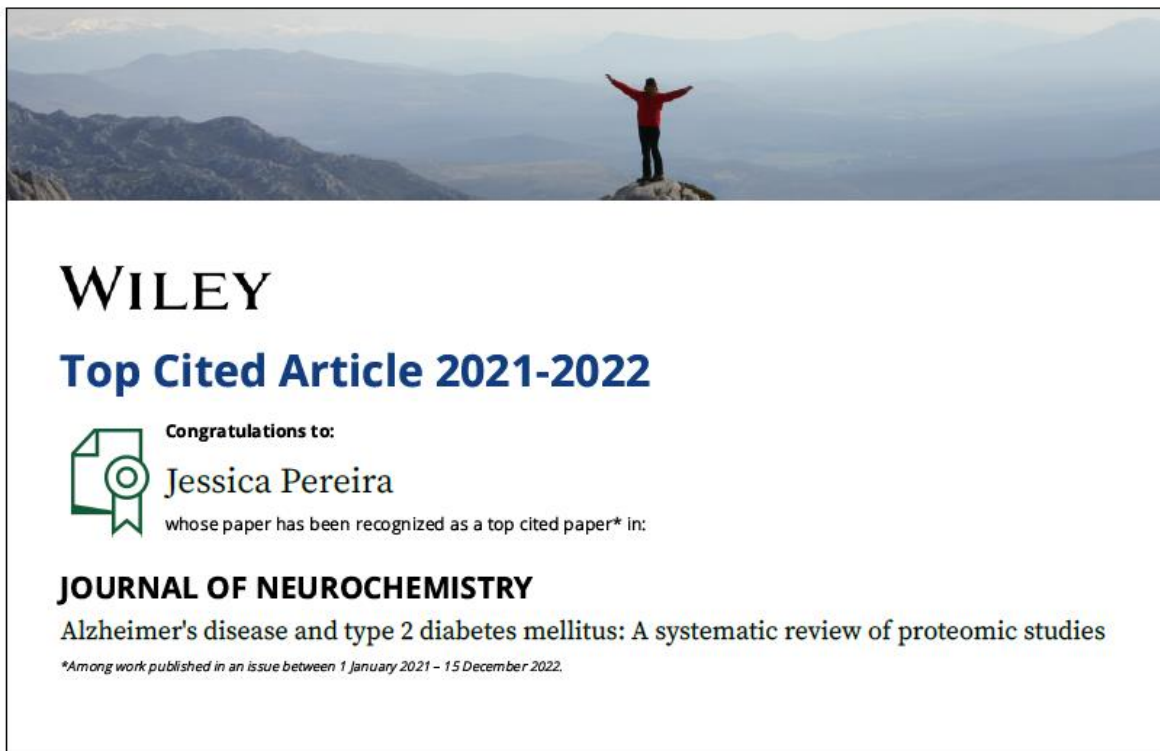
ZHAO, Na et al. Apolipoprotein E, receptors, and modulation of Alzheimer's disease. **Biological psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 347-357, 2018.

ZHU, Donghui; MONTAGNE, Axel; ZHAO, Zhen. Alzheimer's pathogenic mechanisms and underlying sex difference. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 4907-4920, 2021.

ZIMMER, J. A. et al. Lanabecestat: Neuroimaging results in early symptomatic Alzheimer's disease. **Alzheimer's Dement Transl. Res. Clin. Inter.** 7, 1–11. 2021.

WANG, Long et al. miR-143-3p inhibits aberrant tau phosphorylation and amyloidogenic processing of APP by directly targeting DAPK1 in Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7992, 2022.

**APÊNDICE A – Comprovante de prêmio e de participação em evento científico.**







## CERTIFICATE POSTER PRESENTATION

This hereby certifies that **Jessica Diniz Pereira** presented the poster **EXPRESSION OF MIRNAS RELATED TO INFLAMMATORY RESPONSE IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS**, authored by **Jessica Diniz Pereira, Michelle Teodoro Alves, Karina Talita de Oliveira Santana Jorge, Kathryn Fontana Rodrigues, Frederico Marianetti Soriani and Karina Braga Gomes**, in **GeneTime Conference 2022**, promoted by the Graduated Program in Genetics of the Federal University of Minas Gerais, in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, August 25 and 26 of 2022.

Frederico Marianetti Soriani  
Coordinator of the Graduate Program in Genetics

Fernanda Antunes Carvalho  
Coordinator of GeneTime Conference 2022



A PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL COMO PROTAGONISTA NO APOIO À DECISÃO NO DIAGNÓSTICO

4 a 7 de outubro 2022 • FLORIANÓPOLIS • SC



**54°**  
**CONGRESSO BRASILEIRO**  
**DE PATOLOGIA CLÍNICA**  
**MEDICINA LABORATORIAL**  
 • EXPOSIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA •

**CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO**

**Certificamos que**  
**Jessica Diniz Pereira**

Concluiu com sucesso na qualidade de congressista  
 o 2022 - 54º Congresso Brasileiro de Patologia -  
 Florianópolis realizado no dia de 04/10/2022 até  
 07/10/2022 totalizando uma carga horária  
 de #TOTAL\_HORAS\_EVENTO# horas.

  
 Marínes Dalla Valle Marino  
 Presidente do 54º Congresso Brasileiro de  
 Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

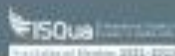
  
 Leonardo Vasconcelos  
 Coordenador da Comissão Científica do 54º Congresso  
 Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

  
 Fábio Vasconcelos Brazão  
 Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia  
 Clínica/Medicina Laboratorial - Brasil (2017-2022)

REALIZAÇÃO



PARCERIA



A PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL COMO PROTAGONISTA NO APOIO À DECISÃO NO DIAGNÓSTICO

4 a 7 de outubro 2022 • FLORIANÓPOLIS • SC



**54°**  
**CONGRESSO BRASILEIRO**  
**DE PATOLOGIA CLÍNICA**  
**MEDICINA LABORATORIAL**  
 • EXPOSIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA •

**CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO**

**Jessica Diniz Pereira**

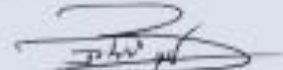
Participou na qualidade de autor responsável do tema livre:

**Expressão de miRNAs relacionados à resposta  
 inflamatória em pacientes com diabetes mellitus tipo 2  
 tendo como co-autores:**

**Karina Braga Gomes Borges; Michelle Teodoro Alves  
 Vieira; Kathryn Fontana Rodrigues; Karina Talita de Oliveira  
 Santana Jorge; Frederico Marianetti Soriani**

  
 Marlene Dalla Valle Martino  
 Presidente do 54º Congresso Brasileiro de  
 Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

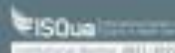
  
 Legião Vinconcellos  
 Coordenador de Contribuição Científica do SBPC  
 Presidente de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

  
 Fábio Vinconcellos Brazão  
 Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia  
 Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2021/2022

REALIZAÇÃO



AFLIÇÃO



A PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL COMO PROTAGONISTA NO APOIO À DECISÃO NO DIAGNÓSTICO

4 a 7 de outubro 2022 • FLORIANÓPOLIS • SC



**54°**  
**CONGRESSO BRASILEIRO**  
**DE PATOLOGIA CLÍNICA**  
**MEDICINA LABORATORIAL**  
 • EXPOSIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA •

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

**Livia Cristina Ribeiro Teixeira**

Participou na qualidade de autor responsável do tema livre:

**ALZHEIMER'S DISEASE AND TYPE 2 DIABETES  
 MELLITUS: COMMON miRNAs, GENES AND  
 REGULATORY BIOLOGICAL PATHWAYS**

tendo como co-autores:

**Jéssica Diniz Pereira; Izabela Mamede Costa Andrade  
 da Conceição; Paulo Caramelli; Marcelo Rizzatti  
 Luizon; Karina Braga Gomes**

  
 Marlene Dalla Valle Martins  
 Presidente do 54º Congresso Brasileiro de  
 Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

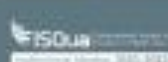
  
 Fabiano Vasconcelos  
 Presidente do Conselho Científico do 54º Congresso  
 Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

  
 Fábio Vasconcelos Brazão  
 Presidente do Conselho Acadêmico de Patologia  
 Clínica/Medicina Laboratorial - Símbolo 50113233

REALIZAÇÃO



PARCERIA



# CERTIFICADO



A Fundação Médica do Rio Grande do Sul certifica que  
**Daiane Oliveira Simão, Fernanda Medeiros Vale Magalhães, Jéssica  
 Diniz Pereira, Ana Lúcia Cândido, Fabio Vasconcellos Comim,  
 Fernando Marcos dos Reis, Jéssica Abdo Gonçalves Tosatti, Karina  
 Braga Gomes**

apresentaram o Poster e Apresentação Oral intitulado Escala de ansiedade e depressão em  
 mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos: um estudo caso-controlado no **Congresso  
 ENDOFEMININA – Encontro de Endocrinologia Feminina**, que ocorreu nos dias 31 de março e 1º  
 de abril de 2023.

  
 Coordenadora  
 Poli Mara Spritzer

  
 Presidente FundMed  
 Ana Luiza Maia

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Sala 177 - Bom Fim - Porto Alegre, RS - CEP 90035-003 - Fundação Médica do RS - CNPJ nº 94.391.901/0001-03 | [www.fundmed.org.br](http://www.fundmed.org.br)



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

The participant receiving this certificate has successfully attended the AAIC  
 Advancements: Immunity conference.

*Jessica Diniz Pereira*

**March 23-24, 2023**

## APÊNDICE B – Material suplementar do artigo.

### Supplementary material 1 – Search strategy

#### CENTRAL or COCHRANE

Alzheimer Disease OR Alzheimer Dementia OR Alzheimer Dementias OR Dementia, Alzheimer OR Alzheimer's Disease OR Dementia, Senile OR Senile Dementia OR Dementia, Alzheimer Type OR Alzheimer Type Dementia OR Alzheimer-Type Dementia (ATD) OR Alzheimer Type Dementia (ATD) OR Dementia, Alzheimer-Type (ATD) OR Alzheimer Type Senile Dementia OR Primary Senile Degenerative Dementia OR Dementia, Primary Senile Degenerative OR Alzheimer Sclerosis OR Sclerosis, Alzheimer OR Alzheimer Syndrome OR Alzheimer's Diseases OR Alzheimer Diseases OR Alzheimers Diseases OR Senile Dementia, Alzheimer Type OR Acute Confusional Senile Dementia OR Senile Dementia, Acute Confusional OR Dementia, Presenile OR Presenile Dementia OR Alzheimer Disease, Late Onset OR Late Onset Alzheimer Disease OR Alzheimer's Disease, Focal Onset OR Focal Onset Alzheimer's Disease OR Familial Alzheimer Disease (FAD) OR Alzheimer Disease, Familial (FAD) OR Familial Alzheimer Diseases (FAD) OR Alzheimer Disease, Early Onset OR Early Onset Alzheimer Disease OR Presenile Alzheimer Dementia in Title Abstract Keyword AND MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR RNA, Micro OR miRNA OR Primary MicroRNA OR MicroRNA, Primary OR Primary miRNA OR miRNA, Primary OR pri-miRNA OR pri miRNA OR RNA, Small Temporal OR Temporal RNA, Small OR stRNA OR Small Temporal RNA OR pre-miRNA OR pre miRNA in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)

#### PUBMED/MEDLINE

((("Adult"[Mesh]) OR (Adult[Title/Abstract] OR Adults[Title/Abstract])) OR (("Aged"[Mesh]) OR (Aged[Title/Abstract] OR Elderly[Title/Abstract]))) AND (("Alzheimer Disease"[Mesh]) OR (Alzheimer Disease[Title/Abstract] OR Alzheimer Dementia[Title/Abstract] OR Alzheimer Dementias[Title/Abstract] OR Dementia, Alzheimer[Title/Abstract] OR Alzheimer's Disease[Title/Abstract] OR Dementia, Senile[Title/Abstract] OR Senile Dementia[Title/Abstract] OR Dementia, Alzheimer Type[Title/Abstract] OR Alzheimer Type Dementia[Title/Abstract] OR Alzheimer-Type Dementia (ATD[Title/Abstract]) OR Alzheimer Type Dementia (ATD[Title/Abstract]) OR Dementia, Alzheimer-Type (ATD[Title/Abstract]) OR Alzheimer Type Senile Dementia[Title/Abstract] OR Primary Senile Degenerative Dementia[Title/Abstract] OR Dementia, Primary Senile

Degenerative[Title/Abstract] OR Alzheimer Sclerosis[Title/Abstract] OR Sclerosis, Alzheimer[Title/Abstract] OR Alzheimer Syndrome[Title/Abstract] OR Alzheimer's Diseases[Title/Abstract] OR Alzheimer Diseases[Title/Abstract] OR Alzheimers Diseases[Title/Abstract] OR Senile Dementia, Alzheimer Type[Title/Abstract] OR Acute Confusional Senile Dementia[Title/Abstract] OR Senile Dementia, Acute Confusional[Title/Abstract] OR Dementia, Presenile[Title/Abstract] OR Presenile Dementia[Title/Abstract] OR Alzheimer Disease, Late Onset[Title/Abstract] OR Late Onset Alzheimer Disease[Title/Abstract] OR Alzheimer's Disease, Focal Onset[Title/Abstract] OR Focal Onset Alzheimer's Disease[Title/Abstract] OR Familial Alzheimer Disease (FAD[Title/Abstract]) OR Alzheimer Disease, Familial (FAD[Title/Abstract]) OR Familial Alzheimer Diseases (FAD[Title/Abstract]) OR Alzheimer Disease, Early Onset[Title/Abstract] OR Early Onset Alzheimer Disease[Title/Abstract] OR Presenile Alzheimer Dementia[Title/Abstract])) AND (("MicroRNAs"[Mesh]) OR (MicroRNAs[Title/Abstract] OR MicroRNA[Title/Abstract] OR miRNAs[Title/Abstract] OR Micro RNA[Title/Abstract] OR RNA, Micro[Title/Abstract] OR miRNA[Title/Abstract] OR Primary MicroRNA[Title/Abstract] OR MicroRNA, Primary[Title/Abstract] OR Primary miRNA[Title/Abstract] OR miRNA, Primary[Title/Abstract] OR pri-miRNA[Title/Abstract] OR pri miRNA[Title/Abstract] OR RNA, Small Temporal[Title/Abstract] OR Temporal RNA, Small[Title/Abstract] OR stRNA[Title/Abstract] OR Small Temporal RNA[Title/Abstract] OR pre-miRNA[Title/Abstract] OR pre miRNA[Title/Abstract]))

## EMBASE

('adult'/exp OR 'adult' OR 'adults'/exp OR 'adults' OR 'grown-ups'/exp OR 'grown-ups' OR 'grownup'/exp OR 'grownup' OR 'aged'/exp OR 'aged' OR 'aged patient' OR 'aged people'/exp OR 'aged people' OR (('aged'/exp OR aged) AND people) OR 'aged subject'/exp OR 'aged subject' OR 'elderly'/exp OR 'elderly' OR 'elderly patient' OR 'elderly people'/exp OR 'elderly people' OR 'elderly person'/exp OR 'elderly person' OR 'elderly subject'/exp OR 'elderly subject' OR 'senior citizen'/exp OR 'senior citizen' OR 'senior') AND ('alzheimer disease' OR 'alzheimer dementia' OR 'alzheimer dementias' OR 'dementia, alzheimer' OR 'alzheimers disease' OR 'dementia, senile' OR 'senile dementia' OR 'dementia, alzheimer type' OR 'alzheimer-type dementia' OR 'alzheimer type dementia' OR 'dementia, alzheimer-type' OR 'alzheimer type senile dementia' OR 'primary senile degenerative dementia' OR 'dementia, primary senile degenerative' OR 'alzheimer sclerosis' OR 'sclerosis, alzheimer' OR 'alzheimer syndrome' OR 'alzheimer diseases' OR 'alzheimers diseases' OR 'senile dementia, alzheimer type' OR 'acute confusional senile dementia' OR 'senile dementia, acute confusional' OR 'dementia, presenile' OR 'presenile dementia' OR 'alzheimer disease, late onset' OR 'late onset alzheimer disease' OR 'alzheimers disease, focal onset' OR 'focal onset alzheimers disease' OR 'familial alzheimer disease' OR 'alzheimer disease, familial' OR 'familial alzheimer diseases' OR 'alzheimer disease, early onset' OR 'early onset alzheimer disease' OR 'presenile alzheimer dementia') AND ('micrnas' OR 'microna' OR 'mirnas' OR 'micro rna' OR 'rna, micro' OR 'mirna' OR 'primary microna' OR 'microna, primary' OR 'primary mirna' OR 'mirna, primary' OR 'pri-mirna' OR 'pri mirna' OR 'rna, small

temporal' OR 'temporal rna, small' OR 'strna' OR 'small temporal rna' OR 'pre-mirna' OR 'pre mirna') AND ([embase]/lim OR [pubmed-not-medline]/lim)

## **CINAHL**

(TX Adult OR Adults OR aged OR elderly) AND (TX Alzheimer Disease OR Alzheimer Dementia OR Alzheimer Dementias OR Dementia, Alzheimer OR Alzheimer's Disease OR Dementia, Senile OR Senile Dementia OR Dementia, Alzheimer Type OR Alzheimer Type Dementia OR Alzheimer-Type Dementia (ATD) OR Alzheimer Type Dementia (ATD) OR Dementia, Alzheimer-Type (ATD) OR Alzheimer Type Senile Dementia OR Primary Senile Degenerative Dementia OR Dementia, Primary Senile Degenerative OR Alzheimer Sclerosis OR Sclerosis, Alzheimer OR Alzheimer Syndrome OR Alzheimer's Diseases OR Alzheimer Diseases OR Alzheimers Diseases OR Senile Dementia, Alzheimer Type OR Acute Confusional Senile Dementia OR Senile Dementia, Acute Confusional OR Dementia, Presenile OR Presenile Dementia OR Alzheimer Disease, Late Onset OR Late Onset Alzheimer Disease OR Alzheimer's Disease, Focal Onset OR Focal Onset Alzheimer's Disease OR Familial Alzheimer Disease (FAD) OR Alzheimer Disease, Familial (FAD) OR Familial Alzheimer Diseases (FAD) OR Alzheimer Disease, Early Onset OR Early Onset Alzheimer Disease OR Presenile Alzheimer Dementia) AND (TX MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR RNA, Micro OR miRNA OR Primary MicroRNA OR MicroRNA, Primary OR Primary miRNA OR miRNA, Primary OR pri-miRNA OR pri miRNA OR RNA, Small Temporal OR Temporal RNA, Small OR stRNA OR Small Temporal RNA OR pre-miRNA OR pre miRNA)

## **SCOPUS**

TITLE-ABS-KEY ( ( "MicroRNAs" ) OR ( "MicroRNA" ) OR ( "miRNAs" ) OR ( "Micro RNA" ) OR ( "RNA, Micro" ) OR ( "miRNA" ) OR ( "Primary MicroRNA" ) OR ( "MicroRNA, Primary" ) OR ( "Primary miRNA" ) OR ( "miRNA, Primary" ) OR ( "pri-miRNA" ) OR ( "pri miRNA" ) OR ( "RNA, Small Temporal" ) OR ( "Temporal RNA, Small" ) OR ( "stRNA" ) OR ( "Small Temporal RNA" ) OR ( "pre-miRNA" ) OR ( "pre miRNA" ) ) TITLE-ABS-KEY ( ( "Alzheimer Disease" ) OR ( "Alzheimer Dementia" ) OR ( "Alzheimer Dementias" ) OR ( "Dementia, Alzheimer" ) OR ( "Alzheimer's Disease" ) OR ( "Dementia, Senile" ) OR ( "Senile Dementia" ) OR ( "Dementia, Alzheimer Type" ) OR ( "Alzheimer Type Dementia" ) OR ( "Alzheimer-Type Dementia " ) OR ( "Alzheimer Type Dementia" ) OR ( "Dementia, Alzheimer-Type " ) OR ( "Alzheimer Type Senile Dementia" ) OR ( "Primary Senile Degenerative Dementia" ) OR ( "Dementia, Primary Senile Degenerative" ) OR ( "Alzheimer Sclerosis" ) OR ( "Sclerosis, Alzheimer" ) OR ( "Alzheimer Syndrome" ) OR ( "Alzheimer's Diseases" ) OR ( "Alzheimer Diseases" ) OR ( "Alzheimers Diseases" ) OR ( "Senile Dementia, Alzheimer Type" ) OR ( "Acute Confusional Senile Dementia" ) OR ( "Senile Dementia, Acute Confusional" ) OR ( "Dementia, Presenile" ) OR ( "Presenile Dementia" ) OR ( "Alzheimer Disease, Late

Onset" ) OR ( "Late Onset Alzheimer Disease" ) OR ( "Alzheimer's Disease, Focal Onset" ) OR ( "Focal Onset Alzheimer's Disease" ) OR ( "Familial Alzheimer Disease " ) OR ( "Alzheimer Disease, Familial " ) OR ( "Familial Alzheimer Diseases " ) OR ( "Alzheimer Disease, Early Onset" ) OR ( "Early Onset Alzheimer Disease" ) OR ( "Presenile Alzheimer Dementia" ) ) AND TITLE-ABS-KEY ( ( "Adult" ) OR ( "Adults" ) OR ( "Aged" ) OR ( "Elderly" ) )

## WEB OF SCIENCE

Alzheimer Disease OR Alzheimer Dementia OR Alzheimer Dementias OR Dementia, Alzheimer OR Alzheimer's Disease OR Dementia, Senile OR Senile Dementia OR Dementia, Alzheimer Type OR Alzheimer Type Dementia OR Alzheimer-Type Dementia (ATD) OR Alzheimer Type Dementia (ATD) OR Dementia, Alzheimer-Type (ATD) OR Alzheimer Type Senile Dementia OR Primary Senile Degenerative Dementia OR Dementia, Primary Senile Degenerative OR Alzheimer Sclerosis OR Sclerosis, Alzheimer OR Alzheimer Syndrome OR Alzheimer's Diseases OR Alzheimer Diseases OR Alzheimers Diseases OR Senile Dementia, Alzheimer Type OR Acute Confusional Senile Dementia OR Senile Dementia, Acute Confusional OR Dementia, Presenile OR Presenile Dementia OR Alzheimer Disease, Late Onset OR Late Onset Alzheimer Disease OR Alzheimer's Disease, Focal Onset OR Focal Onset Alzheimer's Disease OR Familial Alzheimer Disease (FAD) OR Alzheimer Disease, Familial (FAD) OR Familial Alzheimer Diseases (FAD) OR Alzheimer Disease, Early Onset OR Early Onset Alzheimer Disease OR Presenile Alzheimer Dementia in Title Abstract Keyword AND MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR RNA, Micro OR miRNA OR Primary MicroRNA OR MicroRNA, Primary OR Primary miRNA OR miRNA, Primary OR pri-miRNA OR pri miRNA OR RNA, Small Temporal OR Temporal RNA, Small OR stRNA OR Small Temporal RNA OR pre-miRNA OR pre miRNA in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)

## SEARCH MANUAL

Article ID
Differential expression of microRNAs in Alzheimer's disease brain, blood and cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis
Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease
Diagnostic Value of microRNA for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis

## Supplementary material 2 – GeoDataSets

### DA x Healthy

TLDA miRNA Screen for Candidate AD Biomarkers in CSF from Living Donors (1)							Validation Study for Candidate AD miRNA Biomarkers in Human CSF (2)						
GSE212558 (DAXcontrol)							GSE212623 (DAXcontrol)						
ID	adj.P. Val	P.Val ue	t	B	logFC	miRNA_ID	ID	adj.P. Val	P.Val ue	t	B	logFC	miRNA_ID
hsa-miR-106b-000442	0.921	0.67603	-0.4191	-5.62	-0.3689	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-125b-000449	0.912	0.647	-0.45932	-4.62	-0.20073	hsa-miR-125b-5p
hsa-miR-125b-000449	0.264	0.0348	21.383	-3.69	11.713	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-1290-002863	0.99	0.87	-0.16379	-4.63	-0.06282	hsa-miR-1290
hsa-miR-1274A-002883	0.678	0.32104	-0.997	-5.26	-0.4088		hsa-miR-142-3p-000464	0.993	0.993	-0.00838	-4.63	-0.00313	hsa-miR-142-3p
hsa-miR-1274B-002884	0.502	0.18599	-13.312	-4.91	-0.5215		hsa-miR-143-002249	0.971	0.824	-0.2234	-4.63	-0.09429	hsa-miR-143-3p
hsa-miR-1290-002863	0.678	0.32639	-0.986	-5.27	-0.4308	hsa-miR-1290	hsa-miR-145-002278	0.912	0.515	-0.65361	-4.62	-0.25943	hsa-miR-145-5p
hsa-miR-1291-002838	0.153	0.00568	-28.234	-2.26	-12.429	hsa-miR-1291	hsa-miR-146a-000468	0.912	0.449	-0.7586	-4.61	-0.3302	hsa-miR-146a-5p
hsa-miR-133a-	0.432	0.131	-	-	-	hsa-miR-	hsa-miR-146b-	0.993	0.919	-	-	-	hsa-miR-

002246		19	15.21	4.6	0.788	133a-3p	001097			0.101	4.6	0.046	146b-5p
hsa-miR-146a-000468	0.264	0.0489	19.925	-3.95	0.8998	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-15b-000390	0.912	0.382	0.87692	-4.6	0.23411	hsa-miR-15b-5p
hsa-miR-146b-001097	0.316	0.08181	1.757	-4.34	0.9866	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-16-000391	0.912	0.722	-0.35601	-4.63	-0.14928	hsa-miR-16-5p
hsa-miR-151-3p-002254	0.922	0.85342	-0.1852	-5.69	-0.1219	hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-193a-5p-002281	0.788	0.109	-161.288	-4.54	-0.56821	hsa-miR-193a-5p
hsa-miR-152-000475	0.657	0.26757	11.145	-5.15	0.5817	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-195-000494	0.912	0.688	-0.40194	-4.63	-0.09509	hsa-miR-195-5p
hsa-miR-16-000391	0.264	0.04513	20.275	-3.89	0.9981	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-19b-000396	0.788	0.216	-124.247	-4.58	-0.48056	hsa-miR-19b-3p
hsa-miR-19b-1#-002425	0.921	0.7078	0.3758	-5.64	0.17	hsa-miR-19b-1-5p	hsa-miR-204-000508	0.993	0.957	0.05356	-4.63	0.02346	hsa-miR-204-5p
hsa-miR-203-000507	0.921	0.60814	-0.5143	-5.58	-0.2771	hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-223-002295	0.788	0.192	-131.036	-4.57	-0.32436	hsa-miR-223-3p
hsa-miR-204-000508	0.921	0.81023	-0.2407	-5.68	0.1038	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-24-000402	0.993	0.982	0.02247	-4.63	0.0092	hsa-miR-24-3p
hsa-miR-25-000403	0.928	0.8938	-0.1338	-5.69	-0.1724	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-28-3p-002446	0.788	0.263	-112.512	-4.59	-0.43097	hsa-miR-28-3p
hsa-miR-26b-000407	0.242	0.0179	24.052	-3.18	11.651	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-29a-002112	0.912	0.622	-0.49453	-4.62	-0.1968	hsa-miR-29a-3p

hsa-miR-27a-000408	0.921	0.81873	0.2298	-5.68	0.1307	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-30a-3p-000416	0.788	0.219	-123.546	-4.58	-0.46332	hsa-miR-30a-3p
hsa-miR-29a-002112	0.285	0.06328	18.769	-4.15	0.7658	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-30e-3p-000422	0.788	0.174	136.825	-4.57	0.36033	hsa-miR-30e-3p
hsa-miR-30a-5p-000417	0.921	0.67146	0.4253	-5.62	0.1895	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-328-000543	0.912	0.693	-0.39608	-4.63	-0.17265	hsa-miR-328-3p
hsa-miR-30b-000602	0.946	0.94648	-0.0673	-5.7	-0.0314	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-331-000545	0.912	0.669	-0.42886	-4.63	-0.13723	hsa-miR-331-3p
hsa-miR-30c-000419	0.921	0.81581	-0.2335	-5.68	-0.1095	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-365-001020	0.912	0.649	0.4561	-4.62	0.17076	hsa-miR-365a-3p
hsa-miR-335-000546	0.921	0.60025	0.5256	-5.58	0.2632	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-378-002243	0.788	0.21	-126.102	-4.58	-0.55892	hsa-miR-378a-3p
hsa-miR-338-5P-002658	0.921	0.51008	0.661	-5.51	0.3363	hsa-miR-338-5p	hsa-miR-484-001821	0.788	0.263	-112.539	-4.59	-0.43885	hsa-miR-484
hsa-miR-601-001558	0.432	0.14387	14.725	-4.74	0.9222	hsa-miR-601	hsa-miR-532-001518	0.912	0.516	-0.65077	-4.62	-0.26071	hsa-miR-532-5p
hsa-miR-624-001557	0.921	0.77839	-0.2821	-5.67	-0.1489	hsa-miR-624-5p	hsa-miR-574-3p-002349	0.912	0.384	-0.87426	-4.6	-0.38717	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-645-001597	0.921	0.66153	-0.439	-5.61	-0.1941	hsa-miR-645	hsa-miR-584-001624	0.788	0.144	-146.932	-4.56	-0.51876	hsa-miR-584-5p
							hsa-miR-597-001551	0.788	0.201	-128.3	-4.5	-0.412	hsa-miR-597-5p

										99	7	71		
							hsa-miR-638-001582	0.912	0.746	-0.32408	-4.63	-0.10056	hsa-miR-638	
							hsa-miR-92a-000431	0.912	0.744	-0.32673	-4.63	-0.11233	hsa-miR-92a-3p	
							mmu-miR-140-001187	0.912	0.523	0.64054	-4.62	0.24998	hsa-miR-140-5p	
							rno-miR-422b-001314	0.788	0.204	-127.555	-4.57	-0.51523	has-miR-378a-3p	
							U6 snRNA-001973	0.912	0.549	0.60097	-4.62	0.30055		

## Supplementary material 3 – JBI Critical Appraisal Checklist for Case Control Studies

<b>JBI Critical Appraisal Checklist for Case Control Studies</b>		<b>Yes</b>	<b>No</b>
1	Were the groups comparable other than the presence of disease in cases or the absence of disease in controls?	+1	0
2	Were cases and controls matched appropriately?	+1	0
3	Were the same criteria used for identification of cases and controls?	+1	0
4	Was exposure measured in a standard, valid and reliable way?	+1	0
5	Was exposure measured in the same way for cases and controls?	+1	0
6	Were confounding factors identified?	-1	+2
7	Were strategies to deal with confounding factors stated?	If not the previous answer: 0 If yes to previous answer: +2	If not the previous answer: 0 If not the previous answer: -1
8	Were outcomes assessed in a standard, valid and reliable way for cases and controls?	+1	0
9	Was the exposure period of interest long enough to be meaningful?	+1	0
10	Was appropriate statistical analysis used?	+1	0

Study identification	JBI Critical Appraisal Checklist for Case Control Studies										Score
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Alexandrov et al., 2012	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	9
Burgos et al., 2014	Y	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	9
Cheng et al., 2018	NI	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	NI	4
Dangla-Valls et al., 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Denk et al., 2015	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	10
Denk et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	10
Derkow et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	10
Frigerio et al., 2013	NI	NI	NI	Y	Y	Y	N	N	NI	Y	1
Gui et al., 2015	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Kiko et al., 2014	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Kim et al., 2021	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	7
Lusardi et al., 2017	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
McKeever et al., 2018	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	10
Müller et al., 2016	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Muller et al., 2014	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	10
Riancho et al., 2017	Y	Y	NI	Y	Y	N	Y	NI	Y	Y	8
Sandau et al., 2020	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Wang et al., 2020	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	10
Sandau et al., 2022	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	10
Jia et al., 2022	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	10
Liu et al., 2021 (a)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	6
Liu et al., 2021 (b)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	NI	Y	Y	5
Liu et al., 2014 (a)	Y	Y	NI	Y	Y	N	Y	NI	Y	Y	8
Liu et al., 2014 (b)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	NI	Y	Y	5

Y: Yes, N: No, Not applicable: NI

## Supplementary material 4 – miRNAs differentially expressed in AD patients compared to controls.

First author	miRNAs	Up ou down regulated? DA x control	Fold change	Valor de p
Alexandrov et al., 2012	miR-9; miR-125b; miR-146a; miR-155 miR-34a; miR-128	All up	Uninformed	miRNA-9 (<0,01); miRNA-125b (<0,01); miRNA-146a (<0,01); miRNA-155 (<0,01); miRNA-34a (<0,05); miRNA-128 (<0,05)

Burgos, et al., 2014	miR-124-3p; miR-138-5p; miR-127-3p; miR-132-3p; miR-127-5p; miR-136-3p; miR-381; miR-101-5p; miR-199b-5p; miR-136-5p; miR-184; miR-181a-5p; miR-598; miR-218-5p; miR-9-3p; miR-769-5p; miR-95; miR-760; miR-181a-3p; miR-181b-5p; miR-488-3p; miR-495; miR-708-3p; miR-874; miR-873-5p; miR-129-5p; miR-181d; miR-139-5p; miR-3200-3p; miR-431-3p1.3; miR-9-5p; miR-326; miR-377-5p 3; miR-433 1; miR-	All Down	miR-124-3p (-1.56); miR-138-5p (-1.46); miR-127-3p (-1.17); miR-132-3p (-0.89); miR-127-5p (-1.15); miR-136-3p (-1.02); miR-381 (-1.14); miR-101-5p (-0.92); miR-199b-5p (-1.22); miR-136-5p (-0.91); miR-184 (-0.97); miR-181a-5p (-0.71); miR-598 (-0.96); miR-218-5p (-0.79); miR-9-3p (-0.84); miR-769-5p (-0.84); miR-95 (-0.95); miR-760 (-0.88); miR-181a-3p (-0.74); miR-181b-5p (-0.75); miR-488-3p (-0.88); miR-495 (-1.07); miR-708-3p (-0.84); miR-874 (-0.75); miR-873-5p (-0.81); miR-129-5p (-0.84); miR-181d (-0.72); miR-139-5p (-0.84); miR-3200-3p (-0.75); miR-431-3p1.3 (-0.91); miR-9-5p (-0.75); miR-326 (-0.76); miR-377-5p 3 (-0.81); miR-433 1 (-0.85); miR-323a-3p (-0.73); miR-134 (-0.7); miR-329 3 (-0.83); miR-10a-5p 1 (-0.84); miR-33b-5p (-0.74); miR-410 (-0.71); miR-708-5p (-0.78).	miR-124-3p (7.15X10 <sup>-07</sup> ); miR-138-5p (8.54X10 <sup>-07</sup> ); miR-127-3p1.2 (1.92X10 <sup>-05</sup> ); miR-132-3p (1.92X10 <sup>-05</sup> ); miR-127-5p (3.09X10 <sup>-05</sup> ); miR-136-3p 1 (3.96X10 <sup>-05</sup> ); miR-381 (4.94X10 <sup>-05</sup> ); miR-101-5p 3 (6.72X10 <sup>-05</sup> ); miR-199b-5p 3 (6.72X10 <sup>-05</sup> ); miR-136-5p (1.91X10 <sup>-04</sup> ); miR-184 2 (2.69X10 <sup>-04</sup> ); miR-181a-5p (3.57X10 <sup>-04</sup> ); miR-598 (4.15X10 <sup>-04</sup> ); miR-218-5p (4.93X10 <sup>-04</sup> ); miR-9-3p (4.95X10 <sup>-04</sup> ); miR-769-5p (6.20X10 <sup>-04</sup> ); miR-95 3 (6.20X10 <sup>-04</sup> ); miR-760 (8.46X10 <sup>-04</sup> ); miR-181a-3p (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-181b-5p (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-488-3p 3 (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-495 3 (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-708-3p (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-874 (1.01X10 <sup>-03</sup> ); miR-873-5p (1.48X10 <sup>-03</sup> ); miR-129-5p (1.65X10 <sup>-03</sup> ); miR-181d (1.89X10 <sup>-03</sup> ); miR-139-5p (1.96X10 <sup>-03</sup> ); miR-3200-3p (2.77X10 <sup>-03</sup> ); miR-431-3p1.3 (3.72X10 <sup>-03</sup> ); miR-9-5p (4.97X10 <sup>-03</sup> ); miR-326 (5.18X10 <sup>-03</sup> ); miR-377-5p 3 (6.87X10 <sup>-03</sup> ); miR-433 1 (7.77X10 <sup>-03</sup> ); miR-323a-3p (8.53X10 <sup>-03</sup> ); miR-134 (8.98X10 <sup>-03</sup> ); miR-329 3 (8.98X10 <sup>-03</sup> ); miR-10a-5p 1 (1.16X10 <sup>-02</sup> ); miR-33b-5p (1.24X10 <sup>-02</sup> ); miR-410 (1.47X10 <sup>-02</sup> ); miR-708-5p (1.51X10 <sup>-02</sup> )
----------------------	--	----------	--	---

	323a-3p; miR-134; miR-329 3; miR-10a-5p 1; miR-33b-5p; miR-410; miR-708-5p			
Cheng et al., 2018	mi R-125b; mi R-132	Up	Uninformed	Uninformed
Dangla-Valls, et al., 2017	miR-125b; miR-222	All up	miR-125b (1,51); miR-222 (1,52)	miR-125b (0,040); miR-222 (0,006)

Denk et al., 2015	miR-1274a; miR-146a; miR-100; miR-505-5p; miR-4467; miR-766; miR-375; miR-708; miR-3622b-3p; miR-296; miR-219; miR-103	Up: miR-3622b-3p; miR-296; miR-146a; miR-100; miR-505-5p; miR-4467; miR-766: up; Down: miR-375; miR-708; miR-1274A; miR-219; miR-103	Uninformed	p<0,05
Denk et al., 2018	miR-24-3p; miR-99b-5p; miR-124-3p; miR-125a-5p; miR-223-3p; miR-15a-5p; miR-140-3p; miR-30a-5p; miR-30e-5p; miR-22-3p	All up	Uninformed	p<0,001
Derkow et al., 2018	let-7b; let-7e	All up	Uninformed	Uninformed
Frigerio et al., 2013	miR-27a-3p	Down	Uninformed	0,008
Gui et al., 2015	miR-1; miR-103a; miR-22; miR-29; miR-30b; miR-16-2; miR-26a; miR-331-5p; miR-153; miR-374;	Up: miR-132-5p; miR-485-5p; miR-29c; Down: miR-16-2; miR-331-5p; miR-136-3p	miR-16-2 (-0.83); miR-331-5p (-0.61); miR-132-5p (0.12); miR-485-5p (1.39); miR-136-3p (-0.12); miR-29c (-0.47)	miR-16-2 (0.0136); miR-331-5p (0.0404); miR-132-5p (0.0188); miR-485-5p (0.0269); miR-136-3p (0.0133); miR-29c (0.0436)

	miR-132-5p; miR-119a; miR-485-5p; miR-127-3p; miR-126; miR-409-3p; miR-433; miR-370; let-7g-3p; miR-151; miR-28; miR-301a; miR-873-3p; miR-136-3p; miR-19b-3p; miR-10a-5p; miR-29c			
Kiko, et al., 2014	miR-29a; miR-29b; miR-34a; miR-125b; miR-146a	Up: miR-29a; miR-29b; Down: miR-34a, miR125b; miR-146a.	Uninformed	p<0,05
Kim et al., 2021	miR-1273g-3p	Up	Uninformed	0,001
Liu et al., 2021	miR-193b	Up	Uninformed	0.006
Liu and Meng et al., 2021	miR-135a	Up	Uninformed	p<0,05
Liu and Song et al., 2014	miR-193b	Down	Uninformed	p<0,05
Liu and Wang et	miR-135a; miR-200b	All down	Uninformed	miR-135a (0,015); miR-200b (0,001)

al., 2014				
Lusardi et al., 2017	miR-378a-3p; miR-1291; miR-597-5p; miR-143-3p; miR-142-3p; miR-328-3p; miR-193a-5p; miR-30a-3p; miR-196-3p; miR-30d-5p; miR-340-5p; miR-140-5p; miR-125b-5p; miR-125b-5p; miR-26b-5p; miR-16-5p; miR-146a-5p; miR-29a-3p; miR-195-5p; miR-15b-5p; miR-233-3p; miR-520b; miR-603; miR-202-3p; miR-519b-3p; miR-484; miR-584-5p; miR-145-3p; miR-24-3p; miR-532-5p; miR-28-	Up: miR-378a-3p; miR-1291; miR-597-5p; miR-520b; miR-603; miR-202-3p; miR-519b-3p; miR-484 Down: miR-584-5p ; miR-145-3p ; miR-24-3p ; miR-532-5p ; miR-28-3p; miR-146b-5p; miR-27b-3p; miR-331-3p; miR-145-5p; miR-590-5p; miR-365a-3p; miR-143-3p; miR-142-3p; miR-328-3p; miR-193a-5p; miR-30a-3p; miR-19b-3p; miR-30d-5p; miR-340-5p; miR-125b-5p; miR-26b-5p; miR-16-5p; miR-146a-5p; miR-29a-3p; miR-195-5p; miR-15b-5p; miR-223-3p	miR-378a-3p (4.06); miR-1291 (1.24); miR-597-5p (0.93); miR-143-3p (-2.15); miR-142-3p (-2.01); miR-328-3p (-1.72); miR-193a-5p (-1.52); miR-30a-3p (-1.49); miR-19b-3p (-1.34); miR-30d-5p (-1.28); miR-340-5p (-1.26); miR-140-5p (-1.24); miR-125b-5p (-1.17); miR-26b-5p (-1.17); miR-16-5p (-1.00); miR-146a-5p (-0.90); miR-29a-3p (-0.77); miR-195-5p (-0.75); miR-15b-5p (-0.71); miR-223-3p (-0.66); miR-520b (1.86); miR-603 (1.22); miR-202-3p (1.13); miR-519b-3p (1.09); miR-484 (0.48); miR-584-5p (-4.12); miR-145-3p (-1.71); miR-24-3p (-1.54); miR-532-5p (-1.21); miR-28-3p (-0.99); miR-146b-5p (-0.99); miR-27b-3p (-0.85); miR-331-3p (-0.83); miR-145-5p (-0.42); miR-590-5p (-0.33); miR-365a-3p (-0.29)	miR-378a-3p (<0,01); miR-1291 (0.02); miR-597-5p (0.06); miR-520b (0.03); miR-603 (0.06); miR-202-3p (0.07); miR-519b-3p (0.09); miR-484 (0.10); miR-584-5p (0.03); miR-145-3p (0.03); miR-24-3p (<0,01); miR-532-5p (0.03); miR-28-3p (0.09); miR-146b-5p (0.07); miR-27b-3p (0.09); miR-331-3p (0.08); miR-145-5p (0.06); miR-590-5p (0.06); miR-365a-3p (0.04); miR-143-3p (<0,01); miR-142-3p (<0,01); miR-328-3p (0.01); miR-193a-5p (<0,01); miR-30a-3p (0.06); miR-19b-3p(0.03); miR-30d-5p (0.04); miR-340-5p (<0,01); miR-140-5p (0.02); miR-125b-5p (0.02); miR-26b-5p (0.06); miR-16-5p (0.12); miR-146a-5p (0.10); miR-29a-3p (0.07); miR-195-5p (0.05); miR-15b-5p (0.05); miR-223-3p (<0,01)

	3p; miR-146b-5p; miR-27b-3p; miR-331-3p; miR-145-5p; miR-590-5p; miR-365a-3p			
McKeever et al., 2018	miR-144-3p; miR-191-5p; miR-320a; miR-451a; miR-486-5p; miR-619-3p; miR-16-5p; miR-125-5p; miR-451a; miR-605-5p	Up: miR-125-5p; miR-125-5p; Down: miR-605-5p; miR-451a; miR-16-5p; miR-451a; miR-605-5p	Uninformed	p < 0,05
Müller et al., 2016	miR-29a; miR-125b	All up-regulated	Uninformed	miR-29a (0.0001); miR-125b (0,025)
Muller et al., 2014	miR-16; miR-146a	All down-regulated	Uninformed	NI
Riancho et al., 2017	miR-877-5p; miR 264; miR-206; miR-20a-5p; miR-9-5p; miR-491-5p; miR-320a; miR-	All down	Uninformed	miR-9-5p (0.001); miR-598 (p < 0.001)

	126-5p; miR-150-5p; miR-509-3p; miR-26a-5p; miR-141-3p; miR-598; miR-188-5p; miR-134			
Sandau et al., 2020	miR-142-3p; miR-146b-5p; miR-146a-5p; miR-365a-3p; miR-193a-5p	All down	miR-142-3p (0.74); miR-146b-5p (0.67); miR-146a-5p(0.72); miR-365a-3p (0.43); miR193a-5p (0.70)	Uninformed
Wang et al., 2020	miR-433	Down	Uninformed	<0,001
Sandau et al., 2022	let-7d-5p; miR-100-5p; miR-16-5p; miR-331-3p; miR-378a-5p; miR-378e; miR-409-3p; miR-454-3p	All up	let-7d-5p (1,60); miR-100-5p (2,33); miR-16-5p (2,12); miR-331-3p (2,21); miR-378a-5p (1,57); miR-378e (1,65); miR-409-3p (2,55); miR-454-3p (2,70)	let-7d-5p (0,0219); miR-100-5p (0,0351); miR-16-5p (0,0099); miR-331-3p (0,0036); miR-378a-5p (0,0319); miR-378e (0,0394); miR-409-3p (0,0026); miR-454-3p (0,0009)
Jia et al., 2022	miR-29c-5p, miR-143-3p, miR-335-5p; miR-485-5p; miR-138-5p e miR-342-3p	Up: miR-29c-5p; miR-143-3p; miR-335-5p; miR-485-5p; Down: miR-138-5p; miR-342-3p	Uninformed	<0.05

*Up: upregulated in AD x control; Down: downregulated in AD x control.*

## Supplementary material 5 – Pathway enrichment

You can find the table containing the pathway enrichment for each miRNA at the following link: <https://drive.google.com/file/d/1yxgU9IsyRRCGBcpOFUnkrbqCkuFqv-W/view?usp=sharing>