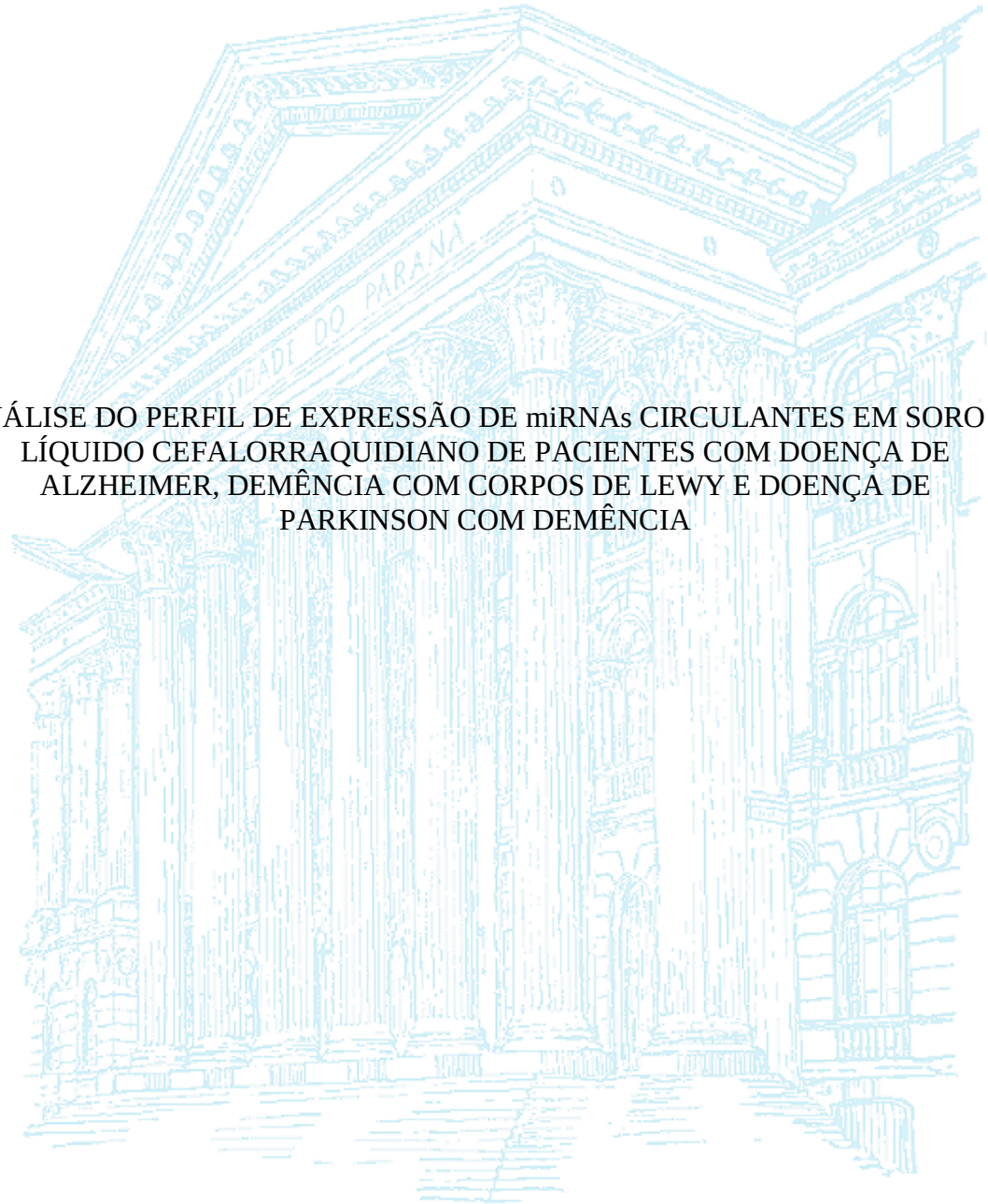
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MEIRE SILVA BATISTELA



ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs CIRCULANTES EM SORO E LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER, DEMÊNCIA COM CORPOS DE LEWY E DOENÇA DE PARKINSON COM DEMÊNCIA

CURITIBA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MEIRE SILVA BATISTELA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs CIRCULANTES EM SORO E LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER, DEMÊNCIA COM CORPOS DE LEWY E DOENÇA DE PARKINSON COM DEMÊNCIA

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof º. Dr. Ricardo L.R. de Souza.

Co-orientador: Dr. Sérgio Monteiro de Almeida

CURITIBA
2016

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de doutorado de MEIRE SILVA BATISTELA, intitulada: "Análise do perfil de expressão de miRNAs circulantes em soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com doença de Alzheimer, demência com corpos de Lewy e doença de Parkinson com demência", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 27 de setembro de 2016

Dr.º Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Dep. Genética/UFPR – presidente

Dr.ª Liya Regina Mikami
Unibrasil

Dr.ª Daiane Priscila Simão-Silva
PUC/PR

Dr.ª Angelica Beate Winter Boldt
Dep. Genética/ UFPR

Dr.ª Daniela Fiori Gradia
Dep. Genética/ UFPR

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a concretizar este trabalho. Primeiramente aos meus pais Valentim e Inês, por sempre investirem na minha formação e me darem a oportunidade que eles nunca tiveram. A vocês dois, meu eterno amor e gratidão. À minha irmã Leticia, por sempre estar disposta a ouvir meus desabafos, fazer o possível e impossível para me ajudar, e por sempre sentir orgulho de mim. Ao meu amigo, marido e parceiro Rafael, que esteve comigo desde o início da minha jornada acadêmica me apoiando e me fazendo acreditar que eu era capaz e que tudo daria certo no final. Seu apoio foi e sempre será fundamental na minha vida.

Gostaria de agradecer também às minhas queridas "Polimórficas" que sempre fizeram meu ambiente de trabalho mais alegre e acolhedor.

Um agradecimento especial aos Professores do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Profa Lupe e principalmente ao Prof. Ricardo que me orientou desde a iniciação científica e sempre acreditou nas minhas ideias e no meu trabalho. Devo muito da minha formação a você Prof, muito obrigada.

E a todos aqueles que em algum momento me ajudaram com seu trabalho, com ideias e, acima de tudo aos idosos que cederam um pouquinho de si para eu pudesse realizar meu trabalho. Espero poder retribuir de alguma forma.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA), Demência com Corpos de Lewy (DCL) e Doença de Parkinson com Demência (DPD) estão entre as causas mais comuns de demências neurodegenerativas em idosos e impactam diretamente na vida dos indivíduos acometidos e na de seus familiares. Devido a sua etiologia complexa, a DA, DCL e DPD muitas vezes apresentam sobreposição de sintomas dificultando o diagnóstico clinico e, até o momento, não existem marcadores biológicos capazes de estabelecer o diagnóstico diferencial. Além da importância em vias regulatórias, os miRNAs circulantes têm se mostrado promissores no diagnóstico e prognóstico de várias doenças, incluindo as neurodegenerativas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar os perfis de miRNAs diferencialmente expressos em DA, DCL e DPD a partir da coleta de amostras de soro e Líquido Cefalorraquidiano (LCR) por meio da técnica miRNA-Seq. Foram utilizadas para o sequenciamento 14 amostras de soro e LCR de pacientes com DA, DCL e DPD, 5 amostras de soro de idosos cognitivamente saudáveis e 5 amostras de LCR de indivíduos com Hidrocefalia de Pressão Normal (HPN). As amostras de soro de idosos cognitivamente saudáveis e as de indivíduos com HPN foram utilizadas como controles para o soro e LCR, respectivamente. As análises de expressão diferencial identificaram perfis de miRNAs distintos para soro e LCR em todas as síndromes demenciais em relação aos grupos controles, sendo 7 miRNAs desregulados no soro do grupo DA, 10 em DCL e 6 em DPD; 2 miRNAs diferencialmente expressos em LCR do grupo DA, 8 em DCL e 4 em DPD. A análise de enriquecimento de vias sugeriu a participação de todos os perfis de miRNAs em mecanismos moleculares descritos como previamente desregulados em doenças neurodegenerativas. Os miRNAs miR-342-3p e miR-708-5p foram vistos como diferencialmente expressos em todos os grupos de pacientes em relação aos controles e foram sugeridos como potenciais marcadores da neurodegeneração no soro. A partir das comparações realizadas entre os grupos de pacientes, os miRNAs miR-125a-5p, miR-380-5p e miR-29b-2-5p foram apontados como possíveis marcadores para o diagnóstico diferencial da DA, por meio da coleta de soro. Similarmente, os miRNAs miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-106b-5p, miR-152-3p e miR-31-5p no soro e miR−423−5p, miR-193b-5p e miR-221-5p no LCR foram considerados como potenciais marcadores para o diagnóstico diferencial da DCL. Apesar de promissores, os miRNAs vistos como diferencialmente expressos ainda necessitam de validação com maior número amostral e técnica mais sensível.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Demência com Corpos de Lewy; Doença de Parkinson com Demência; miRNAs circulantes; biomarcadores.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD), Lewy Bodies Dementia (LBD) and Parkinson's Disease with Dementia (PDD) are some of the most common causes of neurodegenerative diseases in elderly people and impact directly on the affected individuals and their families. Due to its complex etiology; AD, LBD and PDD often show overlapped symptoms which may complicate clinical diagnosis and, so far, there are no biomarkers capable of stablishing the differential diagnosis. Besides its importance in molecular pathways, the circulating miRNAs have been considered as putative biomarkers in prognosis and diagnosis of various diseases, including neurodegenerative ones. Therefore, the present study aims to investigate differentially expressed miRNAs profiles in AD, LBD and PDD by collecting serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples using miRNA-Seq. Fourteen serum and CSF samples of AD, LBD and PDD individuals, 5 serum samples of cognitively normal elderly individuals and 5 CSF samples of patients with Normal Pressure Hydrocephalus (NPH) have been used for sequencing. Serum samples of cognitively normal elderly individuals and the CSF samples of patients with NPH have been assigned as serum and CSF control groups, respectively. Differential expression analysis has identified distinct miRNAs profiles for serum and CSF in all dementias compared to control groups, being 7 dysregulated miRNAs in AD, 10 in LBD and 6 in PDD for serum samples; 2 differentially expressed miRNAs in AD, 8 in LBD and 4 in PDD for CSF samples. Enrichment pathways analysis suggests involvement of all miRNAs profiles in molecular mechanisms previously described as dysregulated in neurodegenerative diseases. The miRNAs miR-342-3p and miR-708-5p are differentially expressed in all patient's groups compared to the controls and have been suggested as potential markers of neurodegeneration in the serum. Based on comparison between the patient's groups, the miRNAs miR-125a-5p, miR-380-5p and miR-29b-2-5p have been appointed as potential markers for AD differential diagnosis by serum sampling. Similarly, the miRNAs miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-106b-5p, miR-152-3p and miR-31-5p in serum and miR−423−5p, miR-193b-5p and miR-221-5p in CSF have been appointed as potential markers for LBD differential diagnosis. Despite promising, the miRNAs seen as differentially expressed in this study still need validation with larger cohort and more sensible technique.

Keywords: Alzheimer's Disease; Lewy Bodies Dementia; Parkinson's Disease with Dementia; circulating miRNAs; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Região do hipocampo.....6
Figura 2 – Placas senis e NFTs.....8
Figura 3 – Representação das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica da APP.....9
Figura 4 – Identificação de corpos de Lewy.....14
Figura 5 – Imagem de ressonância magnética mostrando ventriculomegalia em um paciente com HPN e cérebro normal.....21
Figura 6 – Biogênese dos miRNAs. 26
Figura 7 – Modelos de repressão da tradução pelo complexo miRISC.....28
Figura 8 – Distribuição da contagem normalizada dos reads para as comparações do soro 44
Figura 9 – Distribuição da contagem normalizada dos reads para as comparações do LCR.....44
Figura 10 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DA comparado ao grupo controle (CTRL_CS).....47
Figura 11 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DCL comparado ao grupo controle (CTRL_CS).....48
Figura 12 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DPD comparado ao grupo controle (CTRL_CS)......49
Figura 13 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DA comparado ao grupo controle (CTRL_HPN).....51
Figura 14 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DCL comparado ao grupo controle (CTRL_HPN).....52
Figura 15 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DPD comparado ao grupo controle (CTRL_HPN).....53
Figura 16 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos de cada síndrome demencial. 58
Figura 17 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos no soro e LCR na DA. 59
Figura 18 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DA e DCL.....62
Figura 19 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DA e DPD.....62
Figura 20 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DCL e DPD.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios diagnósticos de demência (transtorno neurocognitivo maior) de acordo com o DSM-V..... 4
Tabela 2 – Critérios para diagnóstico clínico de DCL possível e provável 15
Tabela 3 – Características clínicas da Doença de Parkinson com Demência (DPD), Demência com corpos de Lewy (DCL) e Doença de Alzheimer (DA). 19
Tabela 4 – Informações dos pacientes cujas amostras foram utilizadas neste estudo... 38
Tabela 5 – Comparações realizadas para verificação da expressão diferencial dos miRNAs em cada um dos grupos. 43
Tabela 6 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no soro nos diferentes grupos de pacientes, comparados ao grupo controle cognitivamente saudável (CTRL_CS)..... 45
Tabela 7 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no LCR nos diferentes grupos de pacientes, comparados ao grupo controle (CTRL_HPN). 50
Tabela 8 – Vias KEGG, valores de p e número de genes controlados pelos miRNAs diferentemente expressos em soro de pacientes DA, DCL e DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_CS). 54
Tabela 9 – Vias KEGG, valores de p e número de genes controlados pelos miRNAs diferentemente expressos em LCR de pacientes DA, DCL e DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_HPN). 55
Tabela 10 – miRNAs diferencialmente expressos no soro para as comparações DA x DCL; DA x DPD e DCL x DPD..... 60
Tabela 11 – miRNAs diferencialmente expressos no LCR para as comparações DA x DCL; DA x DPD e DCL x DPD..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	acetilcolina
AchE	acetilcolinesterase
APOE	apolipoproteina E
APP	proteína precursora do amiloide
APPs	proteína precursora do amiloide secretada
Aβ	peptídeo β-amiloide
BHE	barreira hemato encefálica
CDR	*clinical dementia rating*
CL	corpos de Lewy
CNS	conselho nacional de saúde
CTRL_CS	controle idoso cognitivamente saudável
CTRL_HPN	controle HPN
DA	doença de Alzheimer
DCL	demência com Corpos de Lewy
DFT	demência fronto temporal
DGCR8	*DiGeorge critical region 8*
DM	demência mista
DP	doença de Parkinson
DPD	doença de Parkinson com Demência
DSM-V	5ª edição do manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais
DV	demência vascular
FC	*fold change*
GDS	*geriatric depression scale*
GSK3β	*glycogen synthase kinase 3β*
hNPCs	células progenitoras neurais humanas
HPN	hidrocefalia de pressão normal
IRM	imagem por ressonância magnética
KEGG	k*yoto encyclopedia of genes and genomes*
LCR	líquido cefalorraquidiano
MEC	matriz extra celular
MEEM	mini exame do estado mental

miRNA	microRNA
ncRNAs	RNAs não codificadores
NFTs	*neurofibrillary tangles*
NGS	*next generation sequencing*
NL	neuritos de Lewy
nt	nucleotídeos
pb	pares de bases
PHFs	*paired helical filaments*
pri-miRNA	transcrito primário do miRNA
PSEN1	presenilina 1
PSEN2	presenilina 2
p-tau	proteína tau fosforilada
RNA Pol	RNA Polimerase
RNA-Seq	RNA *sequencing*
SNC	sistema nervoso central
TC	tomografia computadorizada
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
t-tau	proteína tau total

INDICE

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DA LITERATURA 3
2.1 Demências 3
2.1.1 Doença de Alzheimer 6
2.1.2 Demência com Corpos de Lewy 12
2.1.3 Doença de Parkinson com Demência 17
2.1.4 Hidrocefalia de Pressão Normal 20
2.2 MicroRNAs 23
2.2.1 Aspectos gerais 23
2.2.2 Biogênese dos miRNAs 24
2.2.3 Mecanismo de silenciamento por miRNAs 27
2.2.4 Regulação da expressão gênica no cérebro por miRNA 28
2.3 miRNAs em vias neurodegenerativas 30
2.4 miRNAs circulantes como biomarcadores em doenças neurodegenerativas 32
3. JUSTIFICATIVA 33
4. OBJETIVOS 35
4.1 Objetivo Geral 35
4.2 Objetivos Específicos 35
5. MATERIAIS E MÉTODOS 36
5.1 Amostras 36
5.1.1 Caracterização das amostras - LCR 36
5.1.2 Coleta do LCR 36
5.1.3 Caracterização das amostras - soro 37
5.2 Extração do RNA Total e Análise da qualidade 39
5.3 Sequenciamento dos miRNAs 40
5.4 Análises 40
5.4.1 Alinhamento ao genoma de referência 40
5.4.2 Expressão diferencial dos miRNAs nas diferentes demências 41
5.4.3 Enriquecimento de vias relacionadas aos miRNAs diferencialmente expressos 41
6. RESULTADOS 42
6.1 Perfil de miRNAs diferencialmente expressos nos diferentes tipos de demências 45

6.1.1 miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes 45
6.1.2 miRNAs diferencialmente expressos no LCR de pacientes 50
6.2 Enriquecimento de vias para os perfis de miRNAs diferencialmente expressos 54
6.3 Interpolação dos miRNAs diferencialmente expressos nos diferentes tipos de demências..... 57
7. Discussão..... 64
8. Conclusões 72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73
ANEXOS 92
ANEXO 92
APÊNDICES 102

1. INTRODUÇÃO

Milhões de indivíduos são afetados por algum tipo de demência em todo o mundo. As diferentes síndromes demenciais estão associadas com deficiência psiquiátrica, social e física nos pacientes e acarreta significativa carga e aflição para os cuidadores e familiares (Waldemar *et al.*, 2007). A doença de Alzheimer (DA), demência com Corpos de Lewy (DCL) e doença de Parkinson com demência (DPD) estão entre as causas mais comuns de demências neurodegenerativas em idosos e também as doenças com maior sobreposição de sintomas clínicos (Guerreiro *et al.*, 2016).

A DA tem um início insidioso e de deterioração progressiva. O prejuízo de memória é o evento clínico de maior magnitude inicialmente, no entanto a evolução do quadro clínico leva a prejuízos mais sérios em outras funções cognitivas, como o julgamento, raciocínio e habilidades visuo-espaciais (Allegri *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2002). A DCL é caracterizada principalmente por flutuações no déficit cognitivo, alucinações visuais e sintomas parkinsonianos com comprometimento da memória e de outras funções cognitivas no decorrer da evolução do quadro (Carvalho *et al.*, 2002). A DPD ocorre do comprometimento cognitivo, principalmente na esfera executiva, decorrente do avanço da Doença de Parkinson, e é o sintoma não motor que acarreta considerável aumento da morbidade (Melo *et al.*, 2007).

O diagnóstico definitivo para demências neurodegenerativas é feito a partir de análise histopatológica do cérebro, somente após a morte do paciente, e durante a vida, o diagnóstico é baseado principalmente nos sintomas clínicos suportados por testes e exames complementares. O diagnóstico das diferentes etiologias é importante para o prognóstico e para a escolha da terapêutica específica, embora muitas vezes ele seja dificultado devido à sobreposição de sintomas que podem ocorrer somado a subjetividade dos relatos dos sintomas iniciais. Deste modo, é possível destacar a importância da identificação de biomarcadores capazes de diferenciar, com eficácia, os diferentes tipos de síndromes demenciais, preferencialmente no início do quadro neurodegenerativo.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores de aproximadamente 22 nucleotídeos (nt) que possuem importante papel regulatório na expressão gênica de animais e plantas, a partir de seus mecanismos de repressão da tradução ou de degradação dos mRNAs (Bartel, 2004). Estudos sugerem que miRNAs são importantes reguladores de vias no sistema nervoso adulto, principalmente na manutenção de neurônios e na regulação de genes e vias associadas a doenças

neurodegenerativas, entre elas, as síndromes demenciais (Liu *et al.*, 2012, Maciotta *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2015).

Além da importância em vias regulatórias, os miRNAs circulantes têm se mostrado eficazes no diagnóstico e prognóstico de várias doenças, e vários miRNAs já foram descritos em Líquido Cefalorraquidiano (LCR) e soro de pacientes com doenças neurodegenerativas (Cogswell *et al.*, 2008; Alexandrov *et al.*, 2012; Geekiyanage *et al.*, 2012). Sendo assim, a pesquisa de perfis de expressão diferenciais de miRNAs em pacientes com DA, DCL e DPD pela coleta do LCR e sangue é uma abordagem promissora, uma vez que estes miRNAs possuem potencial para atuar como biomarcadores no diagnóstico precoce e diferencial dos diferentes tipos de demências.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Demências

É esperado que até o ano de 2090, a população mundial, hoje perto dos 7 bilhões de habitantes, alcance os 10,1 bilhões e até a metade deste século, este número seja 9,3 bilhões. Em países como o Brasil, cerca de 11% dos habitantes possuem 65 anos ou mais e até 2100 este valor pode alcançar 28% (United-Nations, 2011). Com o envelhecimento crescente da população existe a necessidade de se gerar conhecimento a fim de entender melhor o processo natural de envelhecimento, assim como as doenças mais prevalentes nesta faixa etária e suas consequências (Brucki *et al.*, 2011).

As síndromes demenciais, caracterizadas por declínio cognitivo e funcional progressivos, estão entre as doenças que maior impacto acarretam ao indivíduo idoso e a seus familiares, pelas suas consequências pessoais, sociais e econômicas (Nitrini, 2000).

Um estudo de meta-análise realizado por Prince e colaboradores (2013) estimou que existissem em 2010 cerca de 35 milhões de pessoas acima dos 60 anos com algum tipo de demência e que para o ano de 2030 o número esperado seria 65,69 milhões, já em 2050 estimam-se 115,38 milhões de pessoas com demência, evidenciando um aumento de 225% nos casos de demência, do ano de 2010 até 2050, em todo o mundo (Prince *et al.*, 2013). Além disso, o estudo de Prince e colaboradores (2013) também indicou aumento exponencial de casos de demência com o aumento da idade e maior prevalência em mulheres do que homens, particularmente em idades avançadas (Prince *et al.*, 2013). Existem algumas possíveis explicações para o maior número de mulheres acometidas com demências, entre elas: maior expectativa de vida do sexo feminino, variações genéticas e até mesmo diferenças no estilo de vida (por exemplo: anos e qualidade dos estudos e escolhas ocupacionais) (Alzheimer's Association, 2016).

O estudo de Burlá e colaboradores (2013) encontrou 7,6% de prevalência dos casos de demência no Brasil no ano de 2010, e estimou um aumento de 0,3 pontos percentuais até o ano de 2020, ou seja, cerca de 55 mil novos casos por ano (Burlá *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores estimaram a prevalência das demências em diferentes regiões brasileiras (Veras *et al.*, 1994; Herrera-Junior *et al.*, 1998; Laks *et al.*, 2005; Lebrão *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2007; Benedetti *et al.*, 2008; Bottino *et al.*, 2008; Scazufca *et al.*, 2008). No estado de São Paulo, a prevalência na cidade de Catanduva foi de 7,1% (Herrera-Junior *et al.*, 1998); para a cidade de São Paulo, 6,9%, 5,1% e 16% (Lebrão *et al.*, 2005; Bottino *et al.*, 2008; Scazufca *et al.*, 2008); e em Ribeirão Preto, de

19% (Lopes *et al.*, 2007). Em Florianópolis, Santa Catarina a prevalência foi de 13,8% (Benedetti *et al.*, 2008) e no estado do Rio de Janeiro as prevalências para as cidades Santo Antônio de Pádua e Rio de Janeiro foram de 37,7% e 13,1% respectivamente (Veras *et al.*, 1994; Laks *et al.*, 2005).

De acordo com os critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, da Associação Psiquiátrica Americana, em sua quinta versão (DSM-V) (tabela 1), demência ou assim renomeada para transtorno neurocognitivo maior, pode ser definida como declínio de uma ou mais áreas do domínio cognitivo (atenção complexa, função executiva, aprendizagem e memória, linguagem, perceptomotor ou social) relatado e documentado através de testes padronizados, causando prejuízo na independência do indivíduo para as suas atividades da vida diária (APA, 2013).

Tabela 1 – Critérios diagnósticos de demência (transtorno neurocognitivo maior) de acordo com o DSM-V.

A. Desenvolvimento de déficit em um ou mais domínios cognitivos a seguir: (1) atenção complexa; (2) função executiva; (3) aprendizagem e memória; (4) linguagem; (5) perceptomotor; e (6) social
B. Os déficits cognitivos nos Critérios A devem ser relatados e documentados através de testes padronizados e causar cada qual, prejuízo significativo no funcionamento social ou ocupacional e representam um declínio significativo em relação a um nível anteriormente superior de funcionamento.

FONTE: Adaptado de American Psychiatric Association (2013).

Inúmeras são as causas de demência, cujo diagnóstico específico depende de conhecimento das diferentes manifestações clínicas e de uma sequência específica e obrigatória de exames complementares (Barbosa *et al.*, 2002). Dentre eles é possível citar a avaliação objetiva do funcionamento cognitivo e do desempenho em atividades de vida diária. A avaliação cognitiva pode ser iniciada com testes de rastreio, como o mini exame do estado mental (MEEM), (Folstein *et al.*, 1975) e deve ser complementada por outros testes que auxiliem a detecção de diversos componentes da cognição. Para tanto, alguns testes têm sido muito utilizados pelos clínicos, como os de memória (evocação tardia de listas de palavras ou de figuras, por exemplo), os de fluência verbal (número de animais em um minuto) e o desenho do relógio (Nitrini *et al.*, 1994).

O desempenho em atividades de vida diária pode ser avaliado por escalas ou questionários de avaliação funcional que são aplicados ao familiar ou ao cuidador do paciente (Barbosa *et al.*, 2002). Existe usualmente nas demências uma hierarquia de comprometimento funcional, em que as atividades instrumentais (como usar o telefone, cozinhar ou administrar contas bancárias, por exemplo) são acometidas mais precocemente que as atividades básicas (como higiene pessoal), razão pela qual quando do diagnóstico inicial, deve ser dada preferência para a avaliação das atividades instrumentais (Pfeffer *et al.*, 1982).

Os exames laboratoriais obrigatórios na investigação etiológica de uma síndrome demencial são o hemograma, as provas de função tiroidiana, hepática e renal, as transaminases hepáticas, as reações sorológicas para sífilis e o nível sérico de vitamina B12 (Chaves, 2000; Knopman *et al.*, 2001). Esses exames permitem a identificação de diversas causas potencialmente reversíveis de demência, além de possibilitarem detecção de eventuais doenças associadas (Barbosa *et al.*, 2002). No caso das demências neurodegenerativas, os exames laboratoriais são normais, e os de neuroimagem estrutural revelam atrofia cortical, que, embora constitua alteração inespecífica, pode eventualmente apresentar distribuição topográfica sugestiva. Nessas condições, o diagnóstico se baseia em grande parte na história clínica, bem como no perfil neuropsicológico (Barbosa *et al.*, 2002).

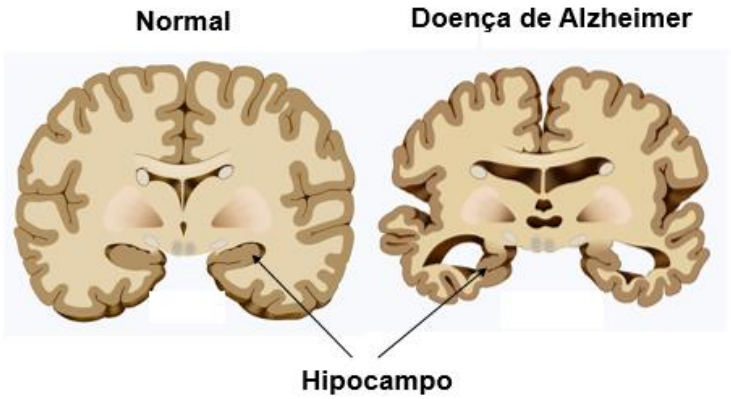
Segundo Brucki e colaboradores (2011) as demências podem ser divididas em dois grupos: 1) demências potencialmente reversíveis e 2) demências irreversíveis. As principais causas de demências reversíveis são: deficiência de vitamina B12; hipotireoidismo; depressão (pseudodemência); doenças infecciosas (sífilis, tuberculose); hidrocefalia de pressão normal; tumores; álcool; intoxicação medicamentosa e insuficiência renal, hepática, pulmonar e adrenal. Este grupo é particularmente importante, pois apresenta grande chance de reversibilidade se suas causas forem tratadas adequadamente (Brucki *et al.*, 2011). As demências irreversíveis são representadas pelas demências neurodegenerativas primárias que incluem a DA, a DCL e a DPD, além da Demência Vascular (DV), Demência Mista (DM) e Demência Fronto-temporal (DFT) (Fornari *et al.*, 2010).

2.1.1 Doença de Alzheimer

2.1.1.1 Aspectos gerais

A DA é a causa mais frequente de demência, responsável por 30 a 40% dos casos entre os idosos (Alzheimer's Association, 2016). A doença se caracteriza por processo degenerativo que acomete inicialmente a formação hipocampal (Figura 1), com posterior comprometimento de áreas corticais associativas e relativa preservação dos córtices primários. Essa distribuição do processo patológico faz com que o quadro clínico da DA seja caracterizado por alterações cognitivas e comportamentais, com preservação do funcionamento motor e sensorial até as fases mais avançadas da doença (Barbosa *et al.*, 2002).

Figura 1 – Região do hipocampo destacada no cérebro normal e no cérebro de um paciente com DA.



FONTE: imagem adaptada e disponível em http://www.ceanne.com.br/revista/wp-content/uploads/2015/04/shutterstock_197889566.jpg.

Quanto ao curso clínico, apresenta-se com início insidioso e deterioração progressiva. O prejuízo de memória é o evento clínico de maior magnitude. Nos estágios iniciais, geralmente é encontrada perda de memória episódica e dificuldades na aquisição de novas habilidades, evoluindo gradualmente com prejuízos em outras funções cognitivas, tais como cálculo, raciocínio abstrato e habilidades visuo-espaciais (Gallucci-Neto *et al.*, 2005).

Declínio da função executiva (manifesto por pobre julgamento e planejamento e franca dificuldade em completar tarefas); apraxia (dificuldade em realizar tarefas motoras

aprendidas); além de marcantes alterações do ciclo sono–vigília; alterações comportamentais, como irritabilidade e agressividade; sintomas psicóticos; incapacidade de deambular, falar e realizar cuidados pessoais são observados nas fases mais avançadas e terminais da doença (Gallucci-Neto *et al.*, 2005; Fornari *et al.*, 2010). O curso pode ser medido por escalas que avaliam o estado mental, como o MEEM e a Avaliação Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating* - CDR). Em média, o paciente com DA diminui de 3 a 3,5 pontos anualmente na escala do MEEM (Han *et al.*, 2000).

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA. Foi estimado que a prevalência de DA dobra a cada 5 anos em pacientes dos 65 até os 90 anos de idade (Corrada *et al.*, 2010). Além da idade, existe uma série de outros fatores considerados de risco, biológicos e ambientais, que, ao interagirem, podem contribuir para o surgimento da DA. Dentre eles, se destacam: alterações no material genético, incluindo polimorfismos em genes relacionados a vias importantes; nível de escolaridade; stress oxidativo e uso de drogas (Hardy, 1997; Small, 1998). Já foram considerados fatores protetores o uso de anti-inflamatórios não esteroides; consumo de vinho e café e também a prática regular de atividade física (Lindsay *et al.*, 2002).

Geneticamente, a DA costuma ser dividida em duas formas: familial e esporádica. Os casos de DA familial são predominantemente de início precoce (abaixo dos 60 anos) e na sua forma esporádica são de início tardio (acima dos 60 anos) (Bertram *et al.*, 2010).

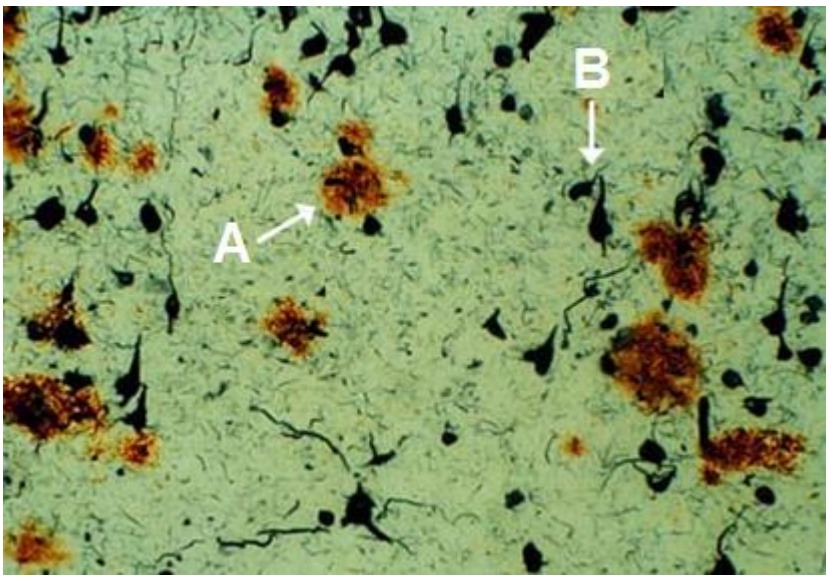
A DA de início precoce representa 5% dos casos e uma grande proporção é causada por mutações autossômicas dominantes, com penetrância completa em um dos três genes, *APP* (proteína precursora do amiloide) situado no cromossomo 21, *PSEN1* (presenilina 1) no cromossomo 14 e *PSEN2* (presenilina 2) no cromossomo 1. As mutações mais comuns são encontradas no gene *PSEN1* (de 40 a 70% de todos os casos), o qual codifica uma proteína implicada na clivagem do peptídeo β-amiloide. Mutações nos genes *PSEN1* ou *PSEN2* foram descritas como capazes de aumentar a taxa do peptídeo Aβ-42 (tóxico) em relação ao Aβ-40 (benigno) (Alagiakrishnan *et al.*, 2012).

O mais bem estabelecido fator de risco genético para o desenvolvimento da DA esporádica parece ser a herança do alelo ε4 do gene *APOE*, que codifica a proteína apolipoproteina E (APOE). Em populações descendentes de europeus, os heterozigotos portando os alelos ε3ε4 têm de 2 a 3 vezes maior risco de desenvolver DA comparados aos homozigotos ε3 ε3. O risco de desenvolvimento para homozigotos ε4ε4 é mais que o dobro comparado aos indivíduos ε3ε4, enquanto que os indivíduos homozigotos para ε2 têm um risco reduzido (Avramopoulos, 2009).

2.1.1.2 Fisiopatologia

A DA é caracterizada principalmente por duas marcas neuropatológicas: placas formadas por peptídeos β-amiloides localizadas extracelularmente (placas amiloides, também chamadas de placas senis) e emaranhados neurofibrilares (*neurofibrillary tangles* - NFTs) intracelulares (Figura 2). As placas amiloides e os NFTs foram descritos pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1906 em autopsia de uma paciente demente. Embora sejam consideradas marcas da DA, estes achados não são únicos a esta demência. As placas e os NFTs ocorrem durante o envelhecimento normal e em outras desordens neurodegenerativas. Na DA, eles estão localizados em áreas do cérebro que correspondem aos sintomas clínicos (Morrison *et al.*, 2005).

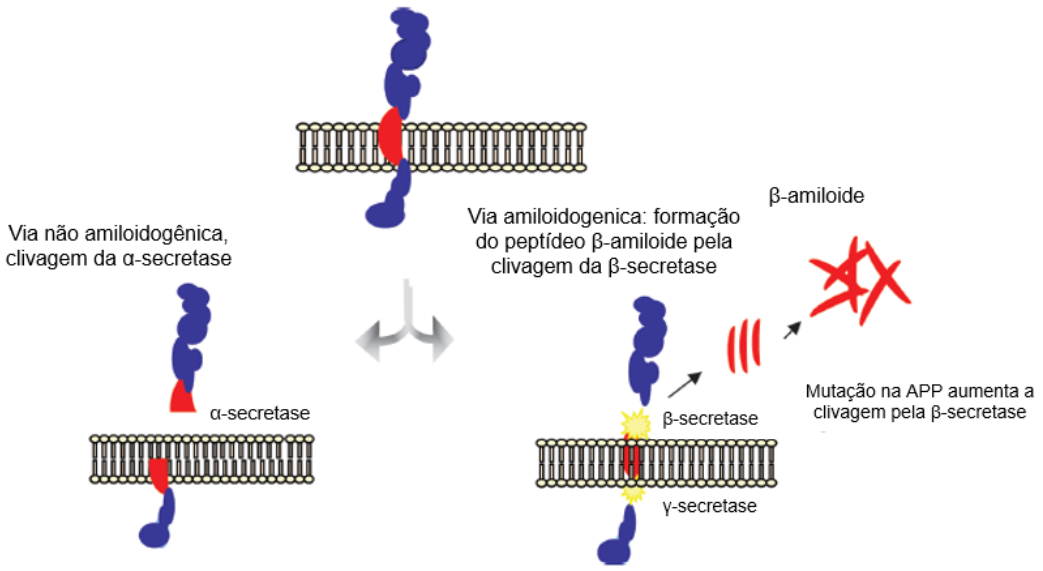
Figura 2 – Placas senis e NFTs. A letra A indica uma placa senil e a letra B um neurônio com NFTs. Imagem adaptada e disponível em: http://ladulab.anat.uic.edu/images/ADstain.jpg



A principal hipótese sobre o desencadeamento do processo patológico da DA é a teoria da cascata do amiloide. O peptídeo β-amiloide (Aβ), principal constituinte das placas amiloides, possui de 39 a 43 aminoácidos (sendo o de 42 aminoácidos encontrado em maior quantidade) e é parte de uma proteína maior, denominada de proteína precursora do amiloide (APP) codificada pelo gene *APP*, localizado no cromossomo 21 (21q21.2). A APP é uma proteína de 695 aminoácidos que contém uma pequena porção

transmembrana, e uma porção aminoterminal, localizada extracelularmente. O peptídeo β-amiloide situa-se, em parte, no segmento transmembrana e, em parte, no segmento extracelular da APP. A clivagem mais comum da APP é denominada de via não-amiloidogênica, realizada pela α-secretase, a qual corta em uma região que possibilita a liberação de toda a porção extracelular, denominada de APPs (APP secretado). A via amiloidogênica ocorre quando as enzimas β-secretase e γ-secretase clivam nos sítios localizados nas regiões transmembrana e extracelular, liberando o peptídeo β-amiloide, considerado neurotóxico (Figura 3) (Hardy *et al.*, 1992; Grace *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2007). Embora ainda não se saiba exatamente qual a relação causal entre Aβ e o mau funcionamento dos neurônios e da memória, não existe dúvida que Aβ exerce um papel crítico na neuropatologia da DA (Dong *et al.*, 2012).

Figura 3 – Representação das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica da APP. A APP é uma proteína transmembrana clivada por enzimas secretases. Na via não-amiloidogênica a APP é clivada preferencialmente pela α-secretase. Na via amiloidogênica os peptídeos Aβ neurotóxicos são liberados após clivagem pelas secretases β e γ e se acumulam nas placas senis.



FONTE: Adaptado de Paula et al. (2009).

A proteína TAU é pertencente à classe de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) e se localiza principalmente no axônio. O principal componente dos emaranhados neurofibrilares (NFTs) – uma das marcas neuropatológicas da DA - são os filamentos PHFs (*paired helical filaments*) contendo a proteína TAU hiperfosforilada

(Mandelkow *et al.*, 2007). Diversas proteínas cinases e fosfatases estão envolvidas na regulação da fosforilação da proteína TAU, e a enzima GSK3β (*glycogen synthase kinase 3β*) parece ser a mais importante TAU-cinase nos neurônios (Lovestone *et al.*, 1994).

A fosforilação da TAU nos resíduos de serina/treonina próximo ao domínio de ligação a tubulina favorece a desagregação do complexo TAU-tubulina e a remontagem da TAU em PHFs, originando a formação dos NFTs (Johnson *et al.*, 2004). Devido à importância da TAU na manutenção da estabilidade neuronal e homeostasia, sua hiperfosforilação leva a uma cascata de eventos, que culmina em morte neuronal (Paula *et al.*, 2009).

A DA é uma doença neurodegenerativa complexa com etiologia multifatorial. A hipótese atual da cascata do amiloide juntamente com a patologia da TAU, apesar de amplamente aceita, explica parcialmente a patofisiologia da doença. É plausível supor, desta forma, que somente esta teoria não seja suficiente para elucidar todos os aspectos referentes à patogênese da DA ou ainda, para diferenciar o cérebro de indivíduos acometidos pela doença, daqueles com envelhecimento normal, sendo necessárias novas abordagens (Paula *et al.*, 2009).

2.1.1.3 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico clínico da DA se baseia na observação de quadro clínico compatível e na exclusão de outras causas de demência, por meio de exames laboratoriais e de neuroimagem estrutural (Barbosa *et al.*, 2002). Os critérios diagnósticos para DA provável são os preconizados pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* e pelo *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS – ADRDA) e incluem: (1) síndrome demencial estabelecida por avaliação clínica, testes padronizados de avaliação do estado mental e testes neuropsicológicos confirmatórios; (2) início entre 40 e 90 anos; (3) deficiência em duas ou mais áreas cognitivas; (4) ausência de distúrbios da consciência causando os déficits cognitivos; (5) ausência de outra doença que possa ser a responsável pelos sintomas (Fornari *et al.*, 2010). Outra possibilidade é o diagnóstico de DA possível, em que os pacientes apresentam variações na forma de apresentação ou evolução clínica e também nos casos em que outras condições passíveis de produzir demência estejam presentes, porém sem serem consideradas responsáveis pelo quadro demencial, com base em juízo e experiência

clínica (McKhann *et al.*, 1984). O diagnóstico definitivo de DA só pode ser feito mediante a análise histopatológica do tecido cerebral *post-mortem* (Gallucci-Neto *et al.*, 2005).

Os biomarcadores são essenciais, tanto no diagnóstico, quanto no tratamento de doenças, e costumam ser avaliados a partir de sua presença, concentração e atividade. Apresentam grande importância no monitoramento do curso da patologia, assim como na avaliação da intervenção terapêutica e, também, para evitar falsos diagnósticos (Aluise *et al.*, 2008). Os fluidos corporais como o LCR, plasma e urina são considerados importantes fontes para a identificação de biomarcadores para DA. Dentre elas, o LCR é considerado melhor devido ao seu contato direto com o espaço extracelular do cérebro, podendo refletir as mudanças bioquímicas que ocorrem internamente. Até o momento, foram descritos três biomarcadores no LCR: Aβ-42, total-TAU (t-tau) e TAU fosforilada (p-tau) com bom potencial diagnóstico, apesar de serem encontradas discrepâncias em alguns resultados (Mulder *et al.*, 2002; Anoop *et al.*, 2010). Pesquisadores demonstraram que valores baixos de Aβ-42 e altos da proteína TAU (t-tau e p-tau) no LCR são capazes de diferenciar indivíduos com DA, de indivíduos controles (Mulder *et al.*, 2002; Kapaki *et al.*, 2003; Wallin *et al.*, 2006; Craig-Schapiro *et al.*, 2009).

As técnicas de neuroimagem também têm sido de grande utilidade no diagnóstico e monitoramento da DA (Anoop *et al.*, 2010). A perda de volume cerebral é uma das consequências da neurodegeneração (Killiany *et al.*, 2000; Thal *et al.*, 2006) e pode ser diferenciada do cérebro normal, com auxílio da tomografia computadorizada (TC) e da imagem por ressonância magnética (IRM) (Frisoni, 2001). Essas técnicas são capazes de mostrar a perda neuronal, atrofia das regiões medial temporal, assim como os NFTs no cérebro de pacientes com DA. Utilizando IRM, é possível distinguir indivíduos com DA dos controles com envelhecimento normal, além de diferenciar outros tipos de demência (DFT e DCL) a partir dos diferentes padrões de atrofia evidenciados (Scheltens *et al.*, 2002; Whitwell *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2006).

O sistema colinérgico central tem papel importante nos mecanismos de memória e aprendizagem e seu déficit na DA gera comprometimento cognitivo (Bartus *et al.*, 1982). Pacientes com Doença de Alzheimer têm menor produção cerebral de colina acetil transferase que, por sua vez, induz uma menor produção de acetilcolina (ACh), gerando uma disfunção colinérgica cortical (Whitehouse *et al.*, 1982).

Os anticolinesterásicos (AchE) são aprovados para o tratamento da DA em suas fases leve e moderada. São substâncias que inibem a colinesterase na fenda sináptica, diminuindo a degradação da ACh e, com isso, aumentando a disponibilidade deste

neurotransmissor (Brucki *et al.*, 2011). Os quatro inibidores disponíveis são a galantamina, o donepezil, a rivastigmina e a tacrina, apesar de a tacrina não estar mais sendo utilizada devido a seu perfil de posologia e efeitos colaterais acentuados (Watkins *et al.*, 1994; Engelhardt *et al.*, 2005). A memantina é um antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA, sendo aprovada pelo FDA para uso em pacientes com DA em fase moderada a grave (Reisberg *et al.*, 2003).

2.1.2 Demência com Corpos de Lewy

2.1.2.1 Aspectos gerais

Os corpos de Lewy foram assim nomeados por Frederick Lewy após descrever pela primeira vez, em 1912, inclusões concêntricas intracitoplasmáticas eosinofílicas em células do núcleo basal de Meynert e em vários outros núcleos do tronco encefálico, em um paciente com DP (Holdorff *et al.*, 2013). Em 1961, Okazaki relacionou a presença de corpos de Lewy corticais à demência (Okazaki *et al.*, 1961).

A Demência com Corpos de Lewy (DCL) representa de 15 a 20% de todas as síndromes demenciais. A idade de início varia dos 50 aos 83 anos e de morte dos 68 aos 92 anos com uma leve prevalência em homens. A média de sobrevida é similar aos pacientes com DA, muito embora muitos pacientes com DCL apresentem rápida progressão dos sintomas, com morte variando de 1 a 2 anos após diagnóstico (McKeith, 2002). Em estudos populacionais, a prevalência de DCL dentre as demências variou de 2,8 a 30,5%. No Brasil, em estudo epidemiológico realizado na cidade de Catanduva, a prevalência foi de 1,7% (Herrera-Junior *et al.*, 1998; Brayne *et al.*, 2006).

Em um estudo clínico transversal realizado por Auning e colaboradores (2011), prejuízo de memória foi o sintoma mais comum (57%) na DCL, seguido por alucinações visuais (44%), depressão (34%), dificuldade em resolução de problemas (33%), problemas na marcha (28%) e tremores/rigidez (25%) (Auning *et al.*, 2011). Apesar de o prejuízo de memória ser considerado um sintoma comum em DCL, pesquisadores sugerem que o déficit da memória episódica e verbal é menos severo quando comparado a pacientes com DA, assim como a habilidade em consolidar informações (Mormont *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2004). Estes achados são consistentes com estudos neuropatológicos que demonstram menor atrofia do hipocampo em pacientes com DCL,

sendo esta uma das maiores regiões acometidas em pacientes com DA (Lippa *et al.*, 1998).

A flutuação na cognição e no nível de consciência é uma importante característica na DCL. A pequena diferença de tempo entre o melhor e o pior desempenho, que geralmente pode ocorrer em apenas algumas horas, a distinguem de variações na cognição que podem ocorrer nas outras demências (McKeith, 2002).

Cerca de dois terços dos pacientes reportam alucinações visuais, normalmente são relatos de visões de pessoas e/ou animais que, de acordo com o paciente, aparentam ser reais (McKeith, 2002). O trabalho publicado por Harding e colaboradores (2002) associou a presença de alta densidade de corpos de Lewy na região da amígdala e parahipocampo, com alucinações bem formadas (Harding *et al.,* 2002). Além disso, hipoperfusão sanguínea e hipometabolismo de glucose em áreas de associação visuais, também foram relacionadas com alucinações em pacientes com DCL (Higuchi *et al.*, 2000; Colloby *et al.*, 2002).

Mais de 70% dos pacientes com DCL apresentam parkinsonismo, rigidez, e problemas na marcha. Quando presentes, estes sintomas podem ser tão graves quanto na DP (Aarsland *et al.*, 2001; McKeith, 2002).

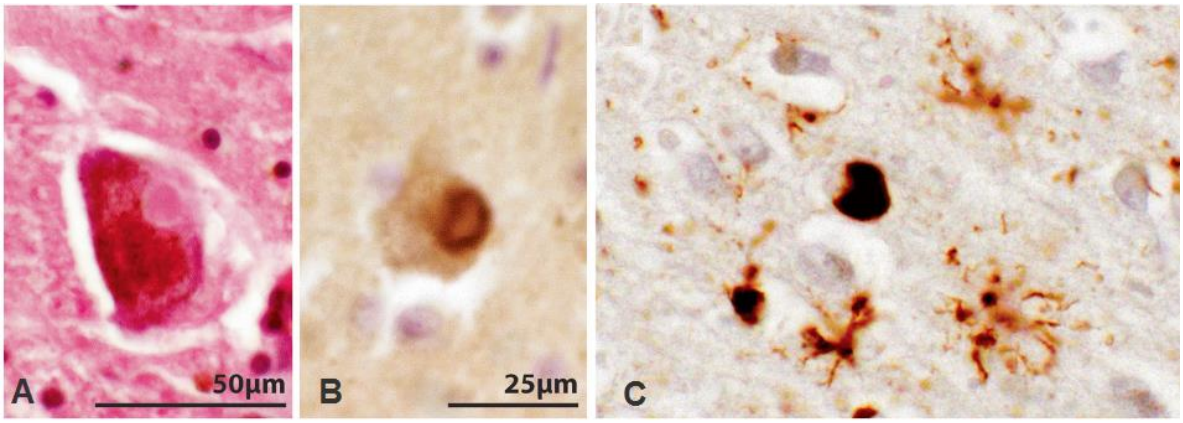
2.1.2.2 Corpos de Lewy e a proteína α- sinucleína

Os corpos de Lewy (CL) (Figura 4) clássicos são inclusões citoplasmáticas esféricas, com centro eosinofílico e um halo pálido, podendo apresentar-se de forma única ou como várias inclusões em um único neurônio (Brucki *et al.*, 2011).

As Doenças com Corpos de Lewy incluem a DCL; DP e DPD e se caracterizam por mudanças neuropatológicas incluindo inclusões com CLs e Neuritos de Lewy (NL - acúmulos proteicos intracelulares filamentares), que se sobrepõem em algumas regiões do cérebro (Tsuang *et al.*, 2013). A DCL é caracterizada por um grande número de CLs e NLs no córtex cerebral, assim como na substância negra (Goedert, 2001).

Tanto os CLs, como os NLs, são formados majoritariamente pela proteína α-sinucleína (Spillantini *et al.*, 1998) e, devido a isto, a DCL, PD, DPD e a Variante da Doença de Alzheimer com Corpos de Lewy são também denominadas de sinucleinopatias.

Figura 4 – Identificação de corpos de Lewy. A) CL em um neurônio dopaminérgico B) CL maduro positivo para α- sinucleína no neocortex, identificado com peroxidase a partir da técnica de imunohistoquímica C) CLs imaturos e astrócitos em formato de estrela ambos positivos para α- sinucleína no neocortex, identificados por imunohistoquímica.



FONTE: Adaptado de Huang e Halliday (2013).

A proteína α-sinucleína faz parte de uma família de proteínas cerebrais, juntamente com as proteínas β e γ sinucleínas, e é codificada pelo gene *SNCA*, localizado no cromossomo 4 (4q21). As proteínas sinucleínas variam de 127 a 140 aminoácidos e suas sequências são 55 a 62% idênticas (Jellinger, 2003). Somente a α- sinucleína é associada às inclusões filamentosas e por ser considerada uma fosfoproteína, sua fosforilação é capaz de regular suas funções. Em doenças neurodegenerativas, são encontrados depósitos de α-sinucleína fosforilada no resíduo 129 de Serina. A α-sinucleína é conhecida por promover déficit mitocondrial e stress oxidativo, levando à agregação de proteínas para a formação dos CLs (Goedert, 2001; Fujiwara *et al.*, 2002).

A função da α-sinucleína ainda não é totalmente esclarecida. Tem sido proposto um envolvimento no transporte de vesículas sinápticas e também como reguladora negativa da liberação de dopamina (Goedert, 2001). A inativação do gene *SNCA* por recombinação homóloga não leva a um fenótipo neurológico muito prejudicado, desta forma a perda da função da proteína α-sinucleína dificilmente dá conta do processo de neurodegeneração, que até o momento, ainda é pouco compreendido (Abeliovich *et al.*, 2000).

2.1.2.3 Diagnóstico e tratamento

Os critérios clínicos para diagnóstico possível e provável de DCL foram revisados em 2005 (McKeith *et al.*, 2005), sendo o diagnóstico definitivo, assim como na DA, dependente de estudo anatomopatológico *post-mortem*. Ficou determinado que para diagnóstico provável de DCL, é essencial a presença de duas, das três características consideradas como principais (tabela 2, subitem 2), enquanto que para o diagnóstico possível, é necessária a presença de somente uma das características. Ficaram também determinadas outras características que dão suporte ou diminuem a possibilidade de DCL (Huang *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Critérios para diagnóstico clínico de DCL possível e provável

1. O sinal cardinal da DCL é o declínio cognitivo de magnitude suficiente para interferir na função social e profissional do paciente.
2. *Dois dos seguintes aspectos são necessários para o diagnóstico de doença provável e um para o diagnóstico de doença possível:*
   a) flutuações das capacidades cognitivas, com variações pronunciadas da atenção e da vigilância;
   b) alucinações visuais recorrentes que são tipicamente bem formadas e detalhadas;
   c) parkinsonismo espontâneo.
3. *Características que apoiam o diagnóstico:*
   a) quedas repetidas;
   b) síncope;
   c) perdas transitórias de consciência;
   d) sensibilidade aos neurolépticos;
   e) ilusões sistematizadas;
   f) alucinações em outras modalidades.
4. *O diagnóstico de DCL é menos comum na presença de:*
   a) doença isquêmica evidente através de sinais neurológicos focais ou por evidências em neuroimagem;
   b) evidência no exame físico, de outra doença sistêmica ou neurológica que justifique o quadro.

FONTE: Tavares *et al.* (2003)

A presença de um declínio progressivo das funções cognitivas do paciente que interfira nas funções da vida diária é uma exigência fundamental para o diagnóstico de DCL (Tavares *et al.*, 2003). Pacientes com DCL normalmente possuem déficits na atenção, função executiva e habilidade visuoespacial (Huang *et al.*, 2013).

O diagnóstico diferencial da DCL, em relação às demais demências, é extremamente importante, a fim de proporcionar opções de tratamento apropriadas, lidar com os transtornos comportamentais característicos dos pacientes, assim como prover informações corretas aos cuidadores. A DA e a DPD são as principais desordens que requerem o diagnóstico clínico diferencial da DCL (Huang *et al.*, 2013).

Uma importante forma de diferenciar a DCL da DPD é a chamada "regra do um ano". Se a demência ocorre pelo menos 12 meses antes do aparecimento dos sintomas motores, é feito o diagnóstico de DCL, já em DPD é comum que problemas motores (parkinsonismo) ocorram antes do aparecimento da demência (McKeith *et al.*, 2005).

Devido a um prejuízo de memória proeminente ou persistente poder ocorrer nos estágios iniciais tanto na DCL quanto na DA- apesar de mais frequente em DA (Auning *et al.*, 2011) - estas duas síndromes são, em muitos casos, difíceis de diferenciar (McKeith, 2002), sem contar que as características consideradas como essenciais (tabela 2, subitem 2) para o diagnóstico de DCL podem invariavelmente não aparecer durante todo o curso da doença ou se confundir com certas características da DA. Além disso, é possível ocorrer a presença de DA, concomitantemente com DCL. Quando isso ocorre, os sintomas clínicos principais se modificam, podendo diminuir a frequência de alucinações e parkinsonismo, tornando estes casos difíceis de serem diagnosticados corretamente (Merdes *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2007).

Os agentes neurolépticos são, normalmente, as drogas de escolha para o tratamento da psicose em pacientes com síndromes demenciais (McKeith, 2002). Na DCL, no entanto, eles são evitados ou utilizados com extrema cautela, uma vez que aproximadamente 81% dos idosos com DCL vão apresentar algum tipo de efeito adverso, e mais da metade dos indivíduos sensíveis aos neurolépticos apresentarão reações graves. Sedação, aumento da confusão, rigidez e imobilidade são algumas reações graves observadas. Além disso, os neurolépticos são responsáveis por aumentar de duas a três vezes o índice de mortalidade nesses pacientes (McKeith *et al.*, 1992). Este tipo de sensibilidade não é encontrado em pacientes com DA, ressaltando a importância do diagnóstico correto entre DCL e DA, a fim de não expor os pacientes com DCL aos riscos associados aos neurolépticos (Aarsland *et al.*, 2005).

O sistema colinérgico está também extensamente afetado na DCL, tanto no córtex quanto no prosencéfalo basal, especialmente no núcleo de Meynert e em projeções no tronco cerebral (Barber *et al.*, 2001). Desta forma, o tratamento medicamentoso do comprometimento cognitivo, utilizando os inibidores das colinesterases, é bastante

indicado. Existem evidências consistentes da efetividade e segurança no uso destas medicações, com melhora cognitiva e dos distúrbios neuropsiquiátricos, sem piora dos sintomas extrapiramidais (Brucki *et al.*, 2011).

2.1.3 Doença de Parkinson com Demência

2.1.3.1 Aspectos gerais

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre os idosos e possui prevalência estimada de 3,3% no Brasil (Barbosa, 2006). Essa condição resulta da perda dos neurônios dopaminérgicos, principalmente da região da substância negra, localizada no mesencéfalo, e da presença de inclusões intraneuronais de CL, causando sintomas motores e não motores. Os principais sintomas motores são: tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia (lentidão e diminuição dos movimentos voluntários) e instabilidade postural (Beitz, 2014). Os sintomas não motores incluem: depressão, apatia, ansiedade, alucinações, distúrbios do sono e, em cerca de 30% dos casos, demência (Aarsland *et al.,* 2005; Melo *et al.,* 2007). Em casos mais avançados da DP, a prevalência da demência ultrapassa os 80% (Vasconcellos & Pereira, 2015).

Vários fatores já foram descritos como envolvidos no aumento do risco para o desenvolvimento da DPD, que incluem: idade avançada, idade de início da DP ≥ 60 anos, duração da DP e a severidade do parkinsonismo (sintomas motores) (Aarsland *et al.,* 2003; Hobson e Meara, 2004).

2.1.3.2 Classificação Neuropatológica

Na DP, a morte neuronal de células na região da substância negra ocorre paralelamente às inclusões da proteína α-sinucleína nos CLs e NLs em várias regiões do cérebro. Estas incluem, principalmente, núcleos aminérgicos do tronco encefálico, núcleo basal de Meynert, núcleos hipotalâmicos e bulbo olfatório (Cookson, 2009). Embora os CLs corticais sejam detectados em grande parte dos pacientes com DP, existe uma relação estabelecida entre a extensão da presença dos CLs corticais e estabelecimento do quadro de demência (Gouveia, 2008). Indivíduos que desenvolvem a DP mais tardiamente, possuem maior número total de CLs corticais e maior propensão ao aparecimento do quadro demencial (Mattila *et al*., 1998).

Por meio dos resultados de alguns estudos, sugere-se que a quantidade global de α-sinucleína cortical e límbica possa ser utilizada para diferenciar os casos de DP e DPD (Braak *et al.,* 2005; Irwin *et al.,* 2012). Em contrapartida, outros pesquisadores sugerem que o aumento dos níveis de α-sinucleína, especificamente no giro parahipocampal e anterior cingulado em DPD poderia auxiliar no diagnóstico diferencial. Além disso, já foram verificadas fortes correlações entre a diminuição da performance em testes cognitivos e aumento do acometimento cortical pelas inclusões com α-sinucleína (Revisado em Irwin *et al.,* 2013).

Apesar do papel central dos CLs e NLs, alguns pesquisadores descreveram uma correlação entre as placas senis e NFTs – marcas neuropatológicas da DA – com distúrbios cognitivos presentes em pacientes com DPD (Kövari *et al.,* 2003; Jellinger *et al.,* 2008; Compta *et al.,* 2011). O modelo de regressão utilizado no estudo de Compta e colaboradores (2011), incluindo tanto a α-sinucleína cortical, quanto a tau e Aβ, foi capaz de predizer casos de demência com maior acurácia do que quando os marcadores eram utilizados individualmente (Compta *et al.,* 2011).

Em termos de marcas neuropatológicas (CLs e NLs), existe uma continuidade entre DCL e DPD, e frequentemente, cérebros autopsiados de pacientes de ambas as sinucleinopatias são indistinguíveis. No entanto, alguns estudos suportam que a patologia da β-amiloide é mais comum na DCL do que na DPD (Garcia-Ptacek e Kramberger, 2016). Sendo assim, a etiologia da diferença dos distúrbios cognitivos observados em DCL e DPD permanece indeterminada, muito embora possa ser, em parte, atribuída aos vários graus de comorbidades advindas da neuropatologia da DA (Irwin *et al.,* 2013).

2.1.3.3 Diagnóstico e tratamento

A literatura descreve um vasto leque de alterações das funções cognitivas, mesmo no curso inicial da DP, que incluem: alterações das habilidades visuo-espaciais, disfunção executiva e alterações da memória (Emre et al., 2007). Dentre todas as alterações já descritas, a demência é considerada a mais grave, uma vez que aumenta consideravelmente o risco de morte (De Lau *et al.,* 2005). A presença do quadro demencial diminui significativamente a qualidade de vida do paciente e acarreta em aumento nos cuidados com a saúde. Ser capaz de realizar o diagnóstico precoce oferece novas oportunidades de intervenção e tratamento, assim como aumento da sobrevida (Obeso *et al.,* 2010).

A DPD é classificada como uma demência sub-cortical, com frequentes alterações na esfera executiva. Porém, o diagnóstico pode muitas vezes ser dificultado pela heterogeneidade clínica dos sintomas, que varia desde o perfil predominantemente amnésico até o predomínio da disfunção executiva, havendo em certos casos, um perfil misto. Conforme progride a doença, podem ser observados déficits nas esferas visuo-espaciais e de linguagem (Gouveia, 2008).

Existe certa similaridade entre os sintomas cognitivos de pacientes com DPD e DA, muito embora os pacientes com DPD apresentem alucinações, flutuações na cognição, depressão e distúrbios do sono mais frequentemente. Já quando as alterações cognitivas da DPD são comparadas com as observadas em DCL, elas são, grande parte das vezes, indistinguíveis (Irwin *et al.*, 2013). A tabela 3 sumariza as principais características clínicas que podem auxiliar no diagnóstico diferencial.

Tabela 3 – Características clínicas da Doença de Parkinson com Demência (DPD), Demência com corpos de Lewy (DCL) e Doença de Alzheimer (DA).

Características Clínicas	DPD	DCL	DA
Demência	Sem déficits precoces	Déficits da atenção e percepção visual precoces	Déficits de memória e atenção precoces
Alucinações Visuais	Ocasional	Típico	Ocasional
Delírios	Ocasional	Típico	Típico
Parkinsonismo	Manifestação inicial	Um ano após o início da demência	Raro
Rigidez	Típica	Típica	Ocasional
Bradicinesia	Típica	Típica	Ocasional
Tremor	Típico	Ocasional	Raro

FONTE: Neef e Walling (2006) *apud* Gouveia (2008).

A identificação das alterações cognitivas que caracterizam a DPD pode constituir um desafio para o clínico, dado que as funções executivas, geralmente afetadas, não são habitualmente avaliadas por rotina (Emre *et al.*, 2007). Algumas escalas foram desenvolvidas especialmente com o objetivo de avaliar a demência associada à DP. Dentre estas, é possível citar a Escala para Resultados de Cognição na Doença de Parkinson (Scales for Outcomes of Parkinson's Disease-Cognition [SCOPA-COG]) e o

Teste Mini-Mental Parkinson, que foram elaboradas com a intenção de avaliar os domínios cognitivos mais comumente afetados pela DP (Revisado em Melo *et al.*, 2007).

O tratamento da DPD é complexo, pois envolve o tratamento conjunto de um mesmo processo degenerativo com duas apresentações fenotípicas diferentes (sintomas motores e alterações cognitivas) (Melo et al., 2007). Os agentes dopaminérgicos comumente utilizados no tratamento dos sintomas motores podem levar ao aparecimento de alucinações e agravar os déficits cognitivos. Da mesma forma que na DCL, medicações antipsicóticas (neurolépticos) utilizadas para o tratamento de comportamentos alterados presentes na DA, podem agravar sintomas extrapiramidais da DPD. Sendo assim, cabe ao clínico o manejo entre manter uma motricidade aceitável e controlar os demais sintomas associados (Caixeta e Vieira, 2008).

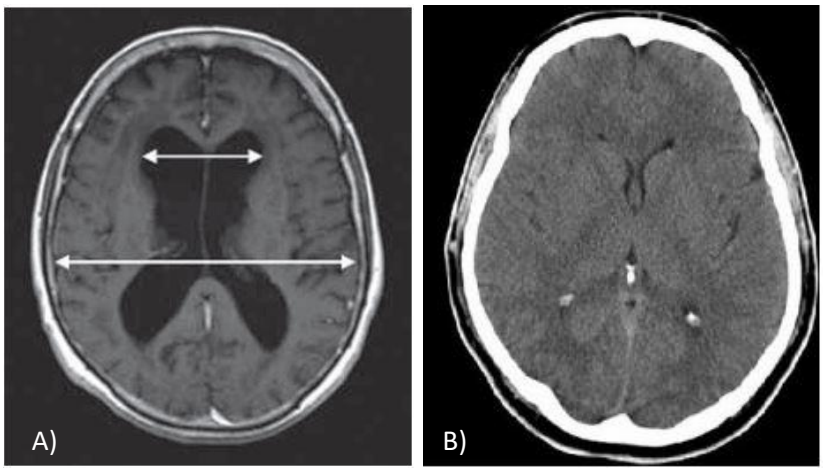
2.1.4 Hidrocefalia de Pressão Normal

A Hidrocefalia de Pressão Normal (HPN) é uma demência classificada como potencialmente reversível e é responsável por cerca de 6% dos casos de demência no Brasil e no mundo. Classicamente, a síndrome de HPN é definida pela presença de distúrbio de marcha, incontinência urinária/fecal e alterações cognitivas, com início insidioso e progressão lenta (Brucki *et al.*, 2011).

A HPN é uma desordem na dinâmica do LCR, que consiste na insuficiência na sua reabsorção, nas granulações aracnoideas. Pode ser derivada de vários processos que causem inflamação no espaço subaracnoideo, tais como meningite, hemorragia subaracnoidea, contusão cerebral e mucopolissacarosidose das meninges. No entanto, em mais de 50% dos casos, a causa não é identificada, e a doença é classificada como HPN idiopática (McGirt *et al.*, 2005).

Os exames de imagem (tomografia ou ressonância magnética) são capazes de identificar a dilatação ventricular (Figura 5), que ocorre devido ao excesso de líquido que pressiona o cérebro de dentro para fora, resultando em um mau funcionamento cerebral e consequentemente nos três sintomas cardinais, já descritos (Brucki *et al.*, 2011).

Figura 5 – A) Imagem de ressonância magnética mostrando ventriculomegalia em um paciente com HPN. O índice de Evans é a largura máxima dos cornos anteriores (seta menor) dividida pela largura máxima da calvária (seta maior). Hidrocefalia é definida por um índice maior ou igual a 0,3. O índice desse paciente é de 0,4. B) cérebro normal.



FONTE: Factora, (2006) apud Pereira et al. (2012).

O TAP TESTE é usualmente utilizado como exame complementar no diagnóstico e na predição dos pacientes que terão uma boa resposta ao principal tratamento para HPN, a derivação ventricular. O exame consiste em avaliar o paciente em relação à tríade dos sintomas (alteração de marcha, demência e incontinência urinária/fecal), antes e depois da retirada de 40 a 50 mL de LCR. Os pacientes que apresentam uma melhora dos sintomas, principalmente da marcha, possuem uma probabilidade alta de responder bem ao tratamento cirúrgico (Gallia *et al.,* 2006). Além disso, a punção lombar é também necessária para avaliar a pressão de abertura de todos os pacientes, que deve estar abaixo de 20 cmH_20 (Relkin *et al.,* 2005).

A derivação ventricular visa aliviar o excesso de LCR no interior do sistema ventricular e pode ser feita tanto para o peritônio (Derivação Ventrículo-Peritoneal) como para o átrio (Derivação Ventrículo-Atrial), com prognósticos semelhantes para as duas abordagens (Bergsneider *et al.,* 2005). Apesar de ser considerado um procedimento cirúrgico relativamente simples, em 30% dos casos podem ocorrer complicações como morte, infecções, convulsões, assim como hemorragia e hematoma subdural (Hebb e Cusimano, 2001).

As alterações cognitivas normalmente observadas na HPN incluem as funções das áreas subcortical e frontal, manifestadas como retardo psicomotor, diminuição da atenção e concentração, disfunção executiva e viso espacial e alteração de memória, sendo a função executiva, danificada precocemente no curso da doença. A gravidade de tais

déficits vistos na HPN pode variar de minimamente detectáveis a profundamente graves, e significativa melhora desses sintomas pode ser obtida depois da derivação, sendo, portanto, uma das poucas causas de demência reversível (Revisado em Pereira *et al.*, 2012).

2.2 MicroRNAs

2.2.1 Aspectos gerais

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs) de aproximadamente 20 nt de tamanho, responsáveis por regular a expressão gênica pós-transcricionalmente, ligando-se às regiões 3'UTR, sequência codificadora ou 5'UTR de seus mRNA alvos, levando à inibição da tradução ou à sua degradação (Almeida *et al.*, 2011). É estimado que aproximadamente 30% do genoma humano codificador de proteínas seja regulado por miRNAs (Filipowicz *et al.*, 2008).

Lin-4 foi o primeiro miRNA a ser descoberto em 1993, pelos laboratórios dos pesquisadores Ambros e Ruvkun. Sete anos após, o let-7 foi o segundo miRNA a ser descoberto no ano 2000, ambos em *C. elegans*. O miRNA lin-4 foi descrito como um pequeno transcrito não codificador, capaz de regular o gene *lin-14* por complementariedade com sua região 3'UTR e o miRNA let-7 como um RNA de 21 nts, capaz de controlar a transição do estágio larval tardio para o estágio adulto inicial (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000).

São conhecidos de 100 a 200 miRNAs expressos em metazoários inferiores e em plantas, e de acordo com o banco de dados miRBase, em seres humanos já foram descritas cerca de 2.600 sequências de miRNAs maduros (miRBase database, versão 21, 2014). Pesquisadores, a partir de estudos funcionais, indicam que os miRNAs participam da regulação de quase todos os processos celulares já investigados, como, por exemplo, a diferenciação e proliferação celular. Mudanças em suas expressões foram observadas em processos patológicos, dentre eles diversos tipos de cânceres e desordens neurológicas (Filipowicz *et al.*, 2008; Felekkis *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011).

Devido aos miRNAs exercerem suas funções primariamente a partir da repressão de mRNAs de genes alvos, a determinação destes alvos têm sido uma área de pesquisa de bastante interesse. Abordagens experimentais e computacionais indicam que um único miRNA é capaz de agir em várias centenas de mRNAs (Selbach *et al.*, 2008). Alguns processos do desenvolvimento são conhecidos por serem regulados por miRNAs atuando na repressão de apenas um alvo. Contudo, a maioria dos miRNAs exercem seus efeitos através de uma modesta redução em um grande número de alvos, os quais juntos, provocam as alterações no fenótipo celular (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008).

2.2.2 Biogênese dos miRNAs

Os genes dos miRNAs estão localizados em diversas regiões genômicas, incluindo ambas as unidades codificadoras e não codificadoras de proteínas. Aproximadamente 50% dos miRNAs são derivados de transcritos de RNAs não codificadores, enquanto que o restante está localizado dentro de introns de genes codificadores de proteínas (Saini *et al.*, 2007). A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA Polimerase (RNA Pol) II e assim como os mRNAs, possuem cauda Poli A na extremidade 3' e cap 7-metil-guanilato na extremidade 5' (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Os miRNAs em regiões de elementos repetitivos Alu já foram descritos como sendo transcritos pela RNA pol III (Borchert *et al.*, 2006).

Os miRNAs são tipicamente produzidos em sua forma de transcrito primário (pri-miRNAs) que são subsequentemente maturados em um processo de biogênese de muitos passos, até a geração da sua forma madura e funcional (Krol *et al.*, 2010) (Figura 6).

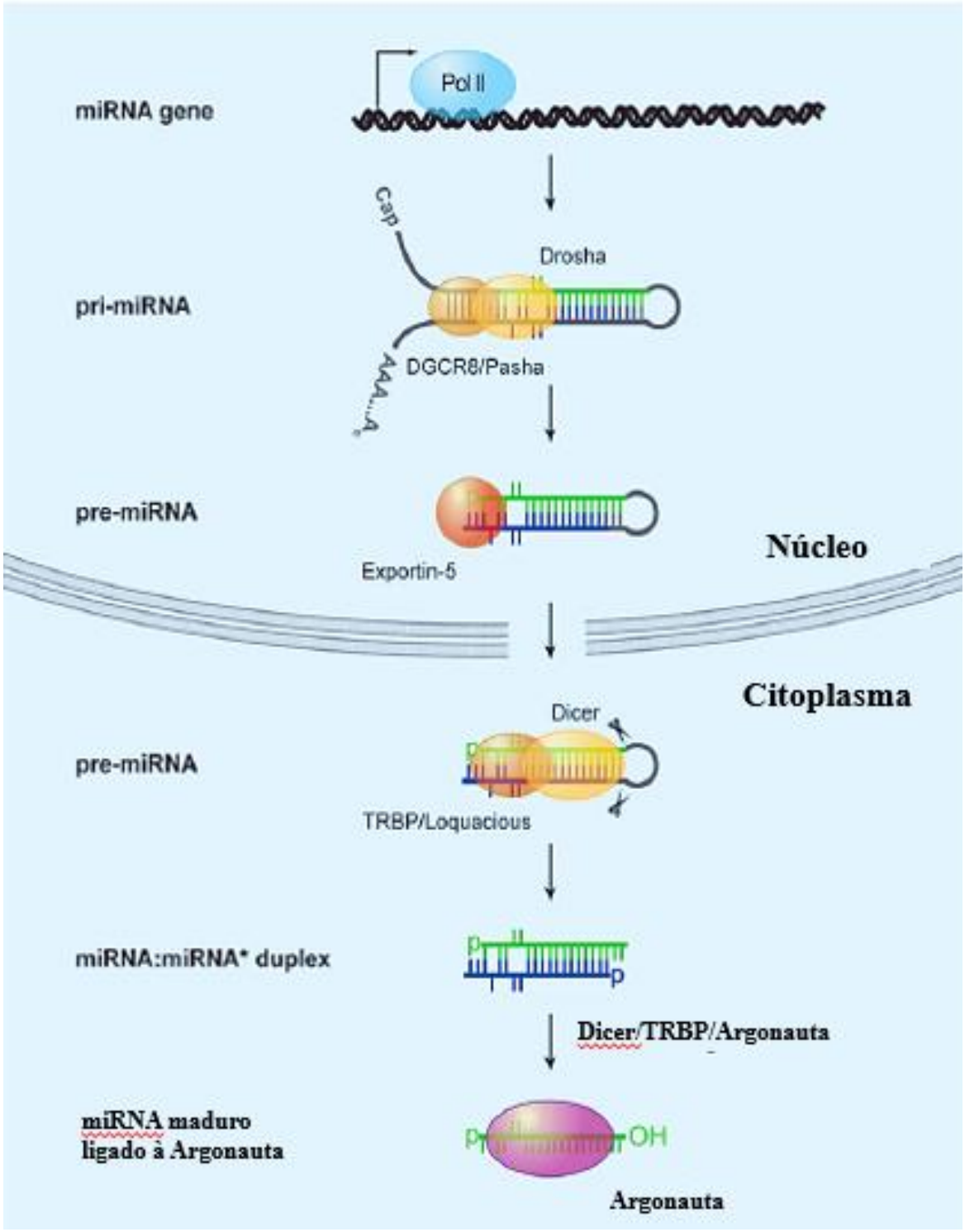
O pri-miRNA é clivado em pre-miRNA endonucleoliticamente por um complexo microprocessador formado pela enzima Rnase III Drosha e pela proteína DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*), também conhecida como Pasha (parceira da Drosha) em *D. melanogaster* e *C. elegans*. A proteína DGCR8/ Pasha contém dois domínios de ligação à dupla fita de RNA e é essencial para o processamento de miRNAs em todos os organismos já testados. Em média, o pri-miRNA humano contém um grampo com 33 pares de bases (pb), uma volta terminal e duas regiões simples fita a montante e a jusante do grampo. Os dois domínios RNase da Drosha clivam nos braços 5' e 3' do grampo do pri-miRNA enquanto que a DGCR8 direciona e estabiliza o pri-miRNA, garantindo a clivagem no sítio específico (Winter *et al.*, 2009). Após o processamento nuclear, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela Exportina-5, em um complexo com Ran-GTP (Yi *et al.*, 2003).

A RNase III Dicer, junto com a proteína TRBP/Loquacious cliva a volta do pre-miRNA e gera um miRNA dupla fita de aproximadamente 22 nt com dois nt projetando-se como saliências nas extremidades 3' de cada fita. Esta clivagem é essencial para o processamento do miRNA e vem sendo descrita em muitos organismos, incluindo *C. elegans, D. melanogaster* e mamíferos. A depleção da Dicer diminui ou cessa a produção de miRNAs maduros (Winter *et al.*, 2009).

Seguindo a clivagem pela Dicer, o pequeno RNA dupla fita se liga ao complexo chamado miRISC (complexo de silenciamento induzido por miRNAs) com a proteína

Argonauta (AGO) como um de seus componentes (Krol *et al.*, 2010). Subsequentemente, uma das duas fitas, chamada fita passageira (também referida como miRNA*) é solta e degradada enquanto a outra fita, chamada fita guia ou miRNA, é retida dentro do miRISC. A seleção das fitas segue uma regra 'termodinâmica assimétrica', na qual a fita com a extremidade 5' menos estável no pareamento de bases é destinada como a fita guia. A fita guia do miRNA se liga ao alvo mRNA com sequências parcialmente complementares e silencia sua tradução (Djuranovic *et al.*, 2011).

Figura 6 – Biogênese dos miRNAs.



FONTE: Adaptado de Bushati e Cohen (2007).

2.2.3 Mecanismo de silenciamento por miRNAs

Existem dois mecanismos pós-transcricionais pelos quais os miRNA regulam a expressão gênica. Estes mecanismos são baseados no grau de complementariedade entre as bases do miRNA e do mRNA (Sun *et al.*, 2008). Quando a complementaridade de bases é completa ou quase completa, o mRNA é clivado. No entanto, em seres humanos, a maioria dos miRNAs pareia de forma imperfeita. Quando isso ocorre, tem-se ao invés da clivagem, a repressão da tradução do mRNA (Engels *et al.*, 2006). Somente um miRNA endógeno animal foi descrito como tendo seu alvo clivado (Yekta *et al.*, 2004).

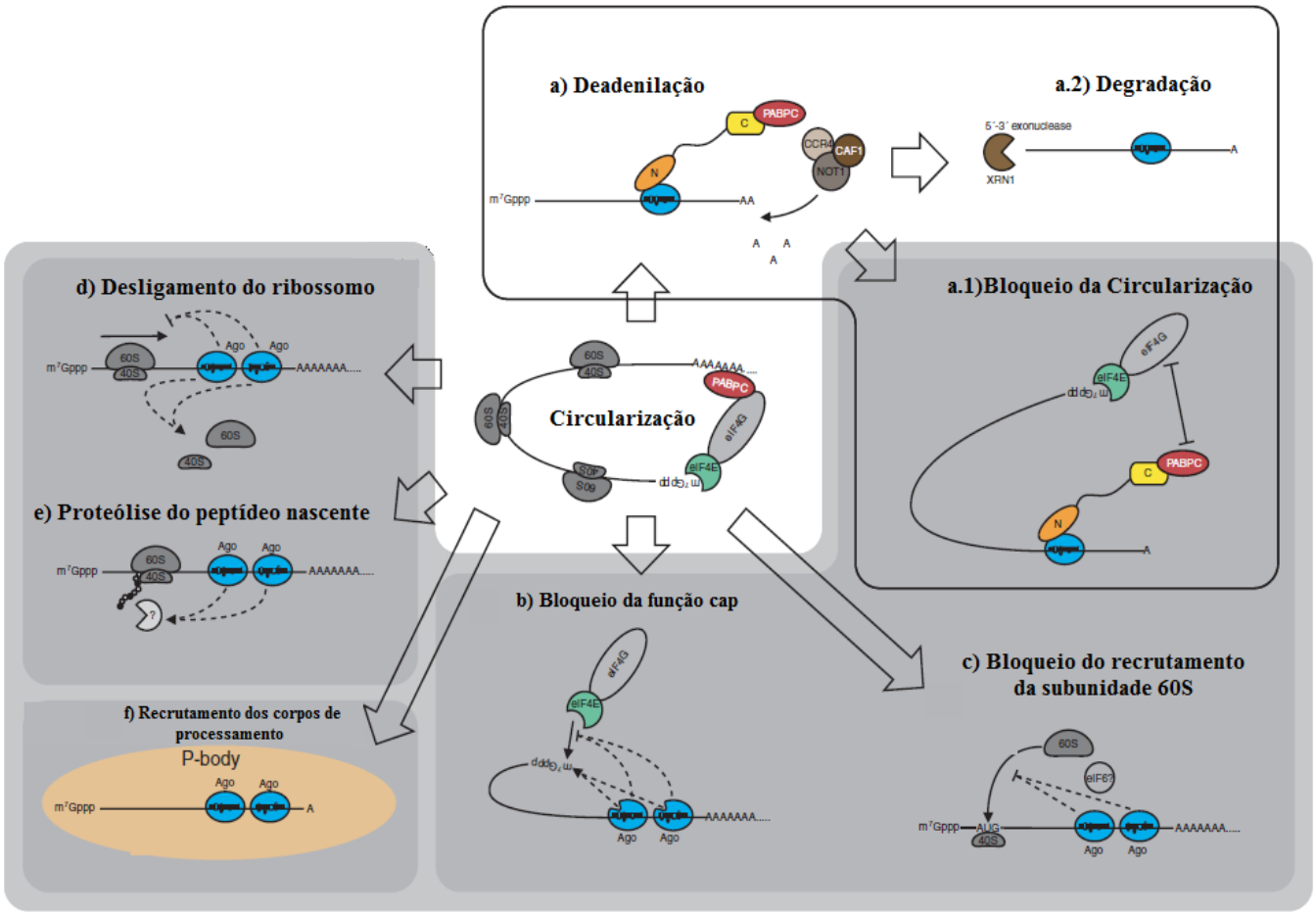
Para que ocorra o silenciamento, é necessário um pareamento de bases perfeito e contínuo do 2º ao 8º nt da extremidade 5' do miRNA com o mRNA, esta região requerida é chamada de sequência semente ou "*seed sequence*" (Fabian *et al.*, 2010). A maioria dos sítios de ligação de miRNAs previstos ou caracterizados experimentalmente estão na região 3' UTR do mRNA, embora miRNA de animais possam se ligar, também, à região 5' UTR e regiões codificadoras (Orom *et al.*, 2008; Rigoutsos, 2009).

Numerosos estudos *in vivo* e *in vitro* são destinados a entender melhor, de que forma os miRNAs suprimem a síntese proteica. Os miRNAs inibem a tradução principalmente nos passos de iniciação e /ou elongação, ou então facilitam a deadenilação e degradação do mRNA (Fabian *et al.*, 2010).

Seis modelos de repressão da tradução já foram propostos (Figura 7): (a) O complexo miRISC induz deadenilação causando diminuição da eficiência na tradução pelo (a.1) bloqueio da circularização do mRNA (a.2) degradação; (b) miRISC bloqueia a função cap também interferindo na circularização do mRNA; (c) miRISC bloqueia o recrutamento da subunidade ribossomal 60S no início da tradução; (d) miRISC bloqueia estágios tardios da elongação ou promove o desligamento do ribossomo; (e) miRISC induz a proteólise do peptídeo nascente durante a tradução; ou (f) miRISC recruta o mRNA alvo para os corpos de processamento *"p-bodies"*, no qual o mRNA é degradado ou mantido em um estado inativo de tradução (Kwak *et al.*, 2010).

Quando ocorre o silenciamento por clivagem, o corte ocorre exatamente entre nucleotídeos que pareiam com os resíduos 10 e 11 do miRNA. Após a clivagem, o miRNA permanece intacto, podendo atuar no reconhecimento e destruição de outros mRNAs (Bartel, 2004).

Figura 7 – Modelos de repressão da tradução pelo complexo miRISC.



FONTE: Adaptado de Kwak *et al.* (2010).

2.2.4 Regulação da expressão gênica no cérebro por miRNA

O estudo dos miRNAs do cérebro tem mostrado um papel crucial destes reguladores em fenômenos do desenvolvimento do sistema nervoso, dentre eles é possível destacar o padrão neural, estabelecimento e manutenção da identidade celular, assim como neurogênese em adultos (Coolen *et al.*, 2009; Schratt, 2009).

A função de miRNAs no sistema nervoso de adultos parece estar bastante relacionada à plasticidade neuronal, incluindo regulação da síntese de proteínas sinápticas e morfogênese de espinhas dendríticas e plasticidade relacionada a doenças. Existe evidência do envolvimento de miRNAs em funções cerebrais fisiológicas de grande importância tais como: aprendizagem, memória, emoções e doença mental (Wang *et al.*, 2012).

Pesquisadores que investigaram a interrupção de componentes da biogênese dos miRNAs sugerem fortemente que a atividade dos miRNAs influenciam diretamente a integridade do cérebro (Abe *et al.*, 2013). A enzima Dicer, quando depletada em células tronco, causa um defeito acentuado no desenvolvimento do cérebro embrionário e letalidade. Apoptose e falhas no desenvolvimento de arborizações neuronais são comuns em diferentes tipos celulares, devido à perda da função da Dicer. Em tipos celulares específicos, como em neurônios maduros dopaminérgicos, a perda da Dicer leva a uma redução marcante na locomoção de indivíduos, da mesma forma quando a região do mesencéfalo é atingida, característica comum em pacientes com DP. Além disso, a inativação da Dicer em camundongos, especificamente em neurônios do prosencéfalo e hipocampo, resulta em mudanças na morfologia e tamanho das espinhas em dendritos, apoptose, microcefalia, ataxia e letalidade, após 3 semanas do nascimento (Feng *et al.*, 2011).

Os oligodendrócitos no sistema nervoso central produzem a bainha de mielina, responsável por envolver os axônios dos neurônios essenciais para a proteção axonal e condução saltatória dos potenciais de ação (Baumann *et al.*, 2001). O miR-9 está menos expresso durante a transição de células progenitoras oligodendrogliais em olidendrócitos maduros (Lau *et al.*, 2008), além de estar implicado na neurogênese e proliferação de células progenitoras neurais humanas (hNPCs), derivadas de células tronco embrionárias (Delaloy *et al.*, 2010). Os miRNAs miR-138 e miR-338 também já foram descritos como envolvidos na diferenciação dos oligodendrócitos. Já o miR-219 é considerado o principal miRNA necessário e suficiente para promover a maturação terminal destas células (Dugas *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010).

Os miRNAs let-7b, miR-9, e miR-124 já foram relacionados à neurogênese e diferenciação neuronal, enquanto que os miRNAs miR-132, miR-134, e miR-138 foram relatados como envolvidos na plasticidade da formação sináptica (Liu *et al.*, 2011).

Liu e colaboradores (2012) indicaram um importante papel para o miR-34 no envelhecimento do cérebro e neurodegeneração em *Drosophila*. O miR-34 foi descrito como um regulador associado a eventos relacionados à idade e à integridade do cérebro a longo prazo. A perda deste miRNA leva à aceleração do envelhecimento, degeneração cerebral e um declínio acentuado na sobrevivência (Liu *et al.*, 2012).

2.3 miRNAs em vias neurodegenerativas

Os miRNAs também têm sido relacionados à regulação de genes e vias associadas a doenças neurodegenerativas (Liu *et al.*, 2012). Um aspecto comum entre as condições neurodegenerativas é a acumulação de proteínas de efeito tóxico no sistema nervoso, como por exemplo, o peptídeo β-amiloide e a proteína tau em DA e a α-sinucleína em inclusões com corpos de Lewy na DCL e DPD (Rauk, 2008; Cookson, 2009; Talmat-Amar *et al.*, 2011). Os miRNAs são conhecidos por atuarem em muitos estágios na produção de proteínas com efeito tóxico e mudanças em suas atividades podem ter relação direta na patologia. Por exemplo, um miRNA responsável por impedir a tradução do mRNA de uma proteína com efeito tóxico pode ser perdido. Alternativamente, miRNAs que medeiam a regulação de proteínas envolvidas na produção ou degradação de proteínas com efeito tóxico, também podem ser perdidos (Eacker *et al.*, 2009). Quando isso ocorre, pode se dar o início de um processo de degeneração neuronal, com consequente desenvolvimento de uma demência neurodegenerativa.

No ano de 2007, foi publicado o primeiro estudo de perfis diferenciais de miRNAs em hipocampo de pacientes com DA (Lukiw, 2007). Desde então, muitos grupos têm realizado esforços no intuito de comparar a expressão de perfis de miRNAs em pacientes com DA esporádico, em relação a indivíduos cognitivamente normais (Schonrock *et al.*, 2012a).

Vários miRNAs já foram descritos como desregulados em DA, diversos deles implicados na regulação de genes chaves na DA, incluindo o *APP* e *BACE1*. O gene *APP* codifica a proteína APP, já o gene *BACE1* codifica a enzima β-secretase, responsável pela clivagem da proteína APP na via amiloidogênica. Pesquisadores demonstraram padrões de expressão alterados de miRNAs não somente em cérebros, mas também em amostras de sangue e LCR em pacientes com DA (Revisado em Tan *et al.*, 2013).

Muitos miRNAs têm sido identificados *in vitro* como reguladores diretos do mRNA da APP em sua região 3'UTR. Eles incluem miR-106a, -520c, miR-16 e -101, assim como membros da família miR-20ª (dentre eles, -20a, -106a/b e -17) e outros como miR-147, -655, -323-3p e -153. Enquanto que o miR-101 já foi descrito como menos expresso em cérebros com DA, potencialmente contribuindo no aumento da expressão de APP e geração do peptídeo β-amiloide (Schonrock *et al.*, 2012b). Polimorfismos específicos na DA identificados na região 3'UTR da APP (T171C e A454G) afetam a atividade dos miRNAs miR-147 e -20a, respectivamente, na modulação

da APP, e poderiam, desta forma, afetar o risco de DA por alterar a regulação da APP mediada por miRNAs (Delay *et al.*, 2011).

Além do *APP*, o gene *BACE1* foi identificado como alvo de miRNAs. Perda de um grupo de miRNAs contendo miR-29a, -29b1 e -9 foi encontrado como correlacionado com aumento da expressão de β-secretase e, por consequência, aumento nos níveis do peptídeo Aβ (Schonrock *et al.*, 2012b). Zong e colaboradores (2011), mostraram que miR-29c é capaz de diminuir os níveis da proteína β-secretase *in vitro.* Além disso, superexpressão de miR-29c em camundongos regula negativamente os níveis de β-secretase, sugerindo um papel do miR-29c como regulador endógeno do gene *BACE1* (Zong *et al.*, 2011).

As inclusões da proteína Tau são consideradas como outra marca na patogênese em DA, além do peptídeo Aβ. Diferentemente do gene *APP*, o gene *MAPT*, responsável por codificar a proteína Tau, não é conhecido por ser regulado diretamente por miRNAs. No entanto, uma redução global na produção de miRNAs em cérebros de camundongos *knockout* para a proteína Dicer induz mudanças no metabolismo da proteína Tau, incluindo hiperfosforilação e recomposições alternativas do gene *MAPT*, semelhantemente ao que é encontrado em DA (Hebert *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011).

A DA é uma desordem altamente complexa e apresenta diversas mudanças patológicas, além das placas amiloides e dos emaranhados neurofibrilares, consideradas como marcas neuropatológicas principais. Dentre elas, é possível destacar os processos inflamatórios, transporte axonal prejudicado e redução na plasticidade sináptica, e são todos conhecidos por serem influenciados por miRNAs (Schonrock *et al.*, 2012a). Os miRNAs miR-124, -125b, -132, -134, -138 e -219 foram descritos como reguladores bem estabelecidos da plasticidade sináptica, enquanto que o aumento da expressão do miR-146 foi descrito como um dos efetores da inflamação, em cérebros de pacientes com DA (Taganov *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2011).

Comparado à DA, existem poucos trabalhos que investigam a função de miRNAs nas vias relacionadas à DP. O miR-133b já foi implicado na diferenciação e manutenção de neurônios dopaminérgicos, e foi visto como menos expresso em camundongos modelo para a DP e em cérebros de pacientes com DP esporádica (Hébert e De Strooper, 2009). O miR-153 está mais expresso em LCR de pacientes com DP, comparado ao grupo controle. Além disso, é conhecido por ser predominantemente expresso no cérebro e participar da regulação da expressão da α-sinucleína, a partir da sua ligação à região 3’-

UTR do mRNA do gene *SNCA* (Doxakis, 2010), podendo estar envolvido tanto na patologia da DP, como na da DCL.

O miR-7 também já foi descrito como regulador da α-sinucleína (Junn *et al.*, 2009; Doxakis, 2010). Junn e colaboradores (2009) demonstraram que os níveis de miR-7 estavam aumentados na substância negra e no *striatum* de camundongos, comparado ao córtex e cerebelo. Os níveis deste miRNA também estavam aumentados em neurônios, sendo cerca de 40x superiores aos de astrócitos. De fato, a α-sinucleína é detectada somente em neurônios, fornecendo suporte da atuação do miR-7 na regulação da α-sinucleína neuronal (Junn *et al.*, 2009).

2.4 miRNAs circulantes como biomarcadores em doenças neurodegenerativas

Com o intuito de buscar referências atualizadas sobre o tema, a revisão "An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases" foi escrita e publicada na revista *International Journal of Neuroscience*. Este artigo está disponível para leitura no Apêndice 1.

3. JUSTIFICATIVA

O aumento da expectativa de vida reflete na maior incidência de doenças senis, entre elas, as síndromes demenciais. O déficit cognitivo associado à diminuição da independência nas atividades de vida diária torna os diferentes tipos de demência um problema atual e de grande impacto na vida do paciente, assim como na de seus cuidadores e familiares. Embora a DA seja a principal causa de demência entre os idosos, a DCL e a DPD também estão entre as síndromes demenciais mais frequentes. O diagnóstico clínico ainda é a principal forma de detecção da doença.

Devido a sua etiologia complexa, os diferentes tipos de demência muitas vezes apresentam sobreposição de sintomas clínicos, dificultando o diagnóstico correto da patologia. Embora não haja cura para o processo neurodegenerativo, o tratamento dos sintomas muitas vezes requer medicamentos específicos, como é o caso dos neurolépticos, muito utilizados em pacientes com DA no tratamento dos sintomas da psicose. Os neurolépticos possuem efeito tóxico em pacientes com sinucleinopatias (DCL e DPD), o que justifica a necessidade do diagnóstico diferencial.

Até o momento, não existe um marcador biológico eficaz em estabelecer um diagnóstico precoce e diferencial entre os principais tipos de síndromes demenciais. Abordagens moleculares estão sendo vistas como uma alternativa nos esforços de encontrar biomarcadores ideais.

Uma das possibilidades seria o diagnóstico diferencial por miRNAs circulantes, uma vez que estes pequenos RNAs não codificadores são estáveis em diversos tecidos, incluindo os fluídos biológicos, possuem especificidade tecidual, e suas concentrações refletem diferentes estágios em processos patológicos, sendo relativamente fáceis de detectar por diversos métodos. Desta forma, a pesquisa de miRNAs para cada tipo de demência em tecidos biológicos, como o LCR (pela proximidade ao SNC) e o soro (pelo fácil acesso), são boas opções no diagnóstico diferencial destas demências. Além disso, estabelecer um perfil de expressão de miRNAs específico em cada uma destas patologias e, ao mesmo tempo, diferente do perfil de expressão de indivíduos cognitivamente normais, poderia auxiliar no diagnóstico e tratamento precoce da demência.

A análise comparativa do perfil de expressão de miRNAs nas diferentes demências também é importante para se descobrir quais vias moleculares estão sendo moduladas por miRNAs, e de que forma esta modulação interfere nos processos de neurodegeneração. Além disso, permite inferir se estas vias de regulação são comuns ou

específicas de cada síndrome demencial e como elas interferem na patogênese de cada uma delas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar biomarcadores dentre os miRNAs circulantes na doença de Alzheimer, demência com corpos de Lewy e doença de Parkinson com demência, utilizando amostras de LCR e soro, por meio da técnica miRNA-Seq, capazes de permitir o diagnóstico diferencial destas demências.

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar o perfil de expressão de miRNAs em cada uma das síndromes demenciais (DA, DCL e DPD) separadamente, em relação ao grupo controle (idosos cognitivamente saudáveis e HPN), utilizando amostras de soro e LCR.
- Verificar a existência de sobreposição entre os perfis de miRNAs diferentemente expressos no LCR e no soro de pacientes em relação aos controles.
- Propor potenciais vias e alvos dos perfis de miRNAs diferencialmente expressos em casos e controles e suas possíveis interferências nos processos neurodegenerativos.
- Comparar os perfis de expressão dos miRNAs de cada grupo demencial entre si (utilizando os grupos de doentes como referência) com o intuito de avaliar miRNAs comuns e específicos de cada doença, a fim de auxiliar no diagnóstico diferencial, por meio da coleta de LCR e sangue.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras

5.1.1 Caracterização das amostras - LCR

As amostras de LCR são provenientes de pacientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do setor de Neurologia, coletadas no Centro de coleta de Líquido Cefalorraquidiano do Hospital de Clínicas. As amostras foram coletadas em uma quantidade de 10,5 ml, aproximadamente, estocadas em tubo estéril livres de DNAse e RNAse, centrifugadas por 10 minutos a 500g, e acondicionadas em freezer -80ºC para posterior extração do RNA total.

Amostras de pacientes com HPN foram utilizadas como controle, devido à dificuldade em conseguir LCR de pacientes cognitivamente normais, uma vez que a coleta do LCR é considerada um procedimento invasivo. Além disso, a HPN é considerada um tipo de demência reversível, não decorrente de processos neurodegenerativos, podendo ser utilizada como controle para as demências neurodegenerativas utilizadas neste trabalho. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas (número do parecer 746.345).

Os participantes da pesquisa foram convidados pelo médico geriatra responsável durante as consultas e assim selecionados para a coleta de LCR, com base na avaliação/diagnóstico do próprio médico. O diagnóstico foi apoiado por testes e escalas psicológicas incluindo: MEEM, GDS, PFEFFER e CDR (anexos 1-4), assim como por exames de laboratório e de imagem, que excluem formas tratáveis de demências. Pessoas com menos de 60 anos de idade e portadores de doenças infectocontagiosas não foram convidados a participar.

As amostras coletadas foram testadas quanto ao número de hemácias e VDRL (sífilis). Foram selecionadas para o sequenciamento dos miRNAs as amostras VDRL negativas e com número de hemácias de até 500 por mm^3, e divididas nos seguintes grupos: a) DA (n=5); b) DCL (n=4); c) DPD (n=5) e d) CTRL_HPN (controle HPN, n=5).

5.1.2 Coleta do LCR

Sendo o procedimento da coleta de LCR considerado invasivo, o procedimento só pode ser realizado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou por seu representante legal, de acordo com a Resolução 466 do

Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 12 de dezembro de 2012. O termo utilizado neste trabalho está incluso nos anexos (Anexo 5).

A coleta da amostra de LCR é de responsabilidade do médico requisitante e dentre as três vias clássicas para coleta, a lombar é a mais utilizada na rotina, seguida pela suboccipital ou cisternal e, por último, a via ventricular (Comar *et al.*, 2009).

Um manômetro é colocado antes da remoção do LCR, para indicar a pressão de abertura. A pressão de abertura normal, em adultos, é de 90 mm H_2O a 180 mm H_2O, na posição decúbito lateral, sendo ligeiramente mais elevada em pacientes sentados ou obesos, e essa pressão pode variar entre 4 e 10 mm H_2O, com a respiração, e entre 2 e 5 mm H_2O, com o pulso do paciente. Em casos de pressão de abertura normal, podem ser removidos, normalmente, até 20 ml de LCR (Comar *et al.*, 2009).

A Academia Brasileira de Neurologia postula recomendações consensuais quanto ao ato da punção para coleta de LCR no Brasil. Tais recomendações são: (a) a via preferencial e rotineira de coleta de LCR é a via lombar; (b) devem ser utilizadas agulhas calibre 22G (preferencialmente) ou 21G; (c) em grupo restrito de pacientes (aqueles com risco mais elevado de cefaleia pós-punção), deve ser considerada a possibilidade de utilizar as agulhas atraumáticas ou em ponta de lápis; (d) devem ser tomados os cuidados técnicos para que a ocorrência de cefaleia seja reduzida à sua expressão mínima; (e) excepcionalmente e em situações particulares, cabe ao médico responsável decidir a utilização da via cisternal como alternativa (Puccioni-Sohler *et al.*, 2002).

5.1.3 Caracterização das amostras - soro

As amostras de soro foram coletadas após aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná (Parecer 1192.117.11.08) de pacientes do Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Setor de Neurologia do Hospital de Clínicas de ambos os sexos, diagnosticados pelo médico neurogeriatra com alguma síndrome demencial. Os pacientes foram convidados a participar do estudo e a coleta só foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 6) pelo próprio paciente ou pelo responsável legal. Também foram aplicados testes e escalas psicológicas (anexos 1-4) que dão suporte ao diagnóstico. Foram coletados aproximadamente 1,5 mL de sangue de cada indivíduo em tubo estéril com ativador de coágulo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, 5.000 rpm para fazer a separação do soro, e em seguida acondicionados à temperatura de -80ºC. Os

controles utilizados foram coletados de idosos acompanhantes dos pacientes, os quais também passaram por uma avaliação do médico responsável e submetidos aos testes psicológicos MEEM e GDS. As amostras de soro escolhidas para o sequenciamento foram as dos mesmos pacientes escolhidos para a coleta de LCR, com exceção do grupo controle que se constituiu de idosos cognitivamente saudáveis (CTRL_CS n=5) (tabela 4).

Tabela 4 – Informações dos pacientes cujas amostras foram utilizadas neste estudo.

Paciente	Diagnóstico	Sexo	Idade Coleta	Fluido Coletado
1	DA*	F	80	Soro/LCR
2	DA*	F	74	Soro/LCR
3	DA*	M	78	Soro/LCR
4	DA*	M	80	Soro/LCR
5	DA*	F	80	Soro/LCR
6	DCL	F	80	Soro/LCR
7	DCL	M	71	Soro/LCR
8	DCL	F	72	Soro/LCR
9	DCL	M	75	Soro/LCR
10	DPD	F	79	Soro/LCR
11	DPD	M	56	Soro/LCR
12	DPD	F	61	Soro/LCR
13	DPD	M	75	Soro/LCR
14	DPD	F	88	Soro/LCR
		8F/6M	┼74,9	
15	CTRL_CS	F	76	Soro
16	CTRL_CS	F	78	Soro
17	CTRL_CS	M	74	Soro
18	CTRL_CS	M	79	Soro
19	CTRL_CS	F	80	Soro
		3F/2M	┼77,4	
20	CTRL_HPN**	F	80	LCR
21	CTRL_HPN**	F	65	LCR
22	CTRL_HPN**	M	75	LCR
23	CTRL_HPN**	F	80	LCR
24	CTRL_HPN**	F	71	LCR
		4F/1M	┼74,2	

┼Média da idade dos indivíduos, CTRL_CS – Controle Cognitivamente Saudável; CTRL_HPN – Controle HPN. * Todos os pacientes com DA foram classificados como CDR =2 no momento da coleta. ** Todos os pacientes com diagnóstico de HPN tiveram o TAP TESTE positivo. FONTE: O autor (2016).

5.2 Extração do RNA Total e Análise da qualidade

A extração de RNA total enriquecido com miRNAs foi realizada com auxílio do kit de extração mirVana™ PARIS™ (Ambion). O protocolo utilizado segue as instruções do fabricante (Anexo 7).

Para o preparo da biblioteca de miRNAs para o sequenciamento, a quantidade de 1µg de RNA total por amostra, é considerada ideal. Para alcançar esse valor, extrações subsequentes da mesma amostra foram realizadas, baseando-se também na modificação sugerida por Burgos e colaboradores (2013), com a qual obtém-se cerca de duas vezes mais RNA total, partindo de um volume inicial de 200 µL. A modificação consiste, basicamente, em realizar uma segunda extração da fase aquosa obtida após a extração habitual com fenol-clorofórmio, e com isto, obter maior rendimento nos casos em que a quantidade de material disponível é limitada (Burgos *et al.*, 2013).

As amostras extraídas tiveram a quantidade e qualidade aferidas no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). A concentração de RNA total para as amostras de soro variou de 3,9 ng/µL a 14 ng/µL enquanto que para as de LCR foram obtidas concentrações variando de 2,2 ng/µL a 10,1 ng/µL, todas em um volume total de eluição de 400 µL.

Os parâmetros de absorbância 260/280, assim como 260/230, são frequentemente utilizados para aferir a pureza dos ácidos nucleicos extraídos, e valores em torno de 2,0 são considerados ótimos, quando se trata de RNA. Para as amostras utilizadas neste estudo, foram obtidos os valores de A260/280 com média de 0,85 e 1,68 para soro e LCR, respectivamente, e 0,068 e 0,114 para A260/230. Apesar de serem parâmetros bem estabelecidos, para amostras com baixa concentração (até 25ng/µL), espectofotômetros como o NanoDrop não possuem a acurácia necessária para aferir precisamente a pureza das amostras, e deste modo, valores abaixo do ótimo podem ser tolerados (Bustin *et al.*, 2009).

Todas as amostras de soro foram verificadas quanto ao grau de hemólise com auxílio do equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). As amostras consideradas hemolisadas (absorbância a 414 nm maior que 0,2) não foram incluídas no estudo, uma vez que o grau de hemólise interfere na abundância de miRNAs circulantes, detectados em fluidos corporais (Kirschner *et al.*, 2013).

5.3 Sequenciamento dos miRNAs

A técnica RNA-Seq (RNA sequencing) foi desenvolvida (Morin et al., 2008) para a investigação de perfis de transcriptomas por meio do que é chamado de sequenciamento de alto desempenho (high-throughput sequencing) ou sequenciamento de nova geração – next generation sequencing (NGS) (Wang et al., 2009). Devido a técnica ter sido desenvolvida inicialmente para detecção de RNAs longos (> 200 nt), para a identificação de pequenos RNAs (entre eles os miRNAs), foram necessárias modificações no protocolo de preparação das amostras (Ozsolak et al., 2011).

O equipamento escolhido para o sequenciamento dos miRNAs do soro e LCR foi o Ion Proton™ (Departamento de Bioquímica, UFPR), que utiliza a tecnologia dos chips semicondutores para a leitura das bases nitrogenadas, responsáveis por traduzir a informação química em informação digital. As bibliotecas foram preparadas de acordo com o protocolo do kit Ion Total RNA-Seq Kit v2.0. Cada amostra foi marcada com um *barcode* diferente, para permitir que várias amostras fossem sequenciadas ao mesmo tempo no mesmo chip (Ion Total RNA-Seq Kit v2 User Guide, 2013). Das 38 amostras iniciais, 3 tiveram de ser desconsideradas das análises de diferença de expressão por não atingirem número suficiente de *reads* nas corridas (2 de soro = 1 DCL e 1 CTRL_CS e 1 de LCR = CTRL_HPN).

Apesar dos esforços em manter a cobertura em 10 milhões de reads para todas as amostras, este número variou de 100 mil até 19 milhões, com média de 5,1 milhões. Esta diferença pode ser devida a própria variação da qualidade e quantidade de input de RNA total para a construção de cada biblioteca, assim como devido às perdas de material em cada etapa, resultando em bibliotecas com menor concentração.

5.4 Análises

5.4.1 Alinhamento ao genoma de referência

Após as corridas, os *reads* gerados para cada amostra foram alinhados ao genoma humano (hg19) e ao banco de dados de miRNAs (miRBase v.21) com auxílio da ferramenta online sRNAbench (Barturen *et al.*, 2014). As análises foram realizadas com o software configurado em seu modo padrão, e geraram, para cada amostra, uma listagem dos miRNAs detectados e seus respectivos número de *reads*.

5.4.2 Expressão diferencial dos miRNAs nas diferentes demências

A análise da expressão diferencial dos miRNAs foi realizada com auxílio do pacote DESEQ2 do programa R, a partir do teste Wald (Love *et al.,* 2014). Os miRNAs considerados para a análise foram aqueles que apresentaram, em média, pelo menos 5 *reads* em todas as amostras. Os miRNAs com $p < 0,05$ foram considerados com expressão diferencial significativa. Além disso, o *Fold Change* (FC) também foi calculado para cada miRNA diferencialmente expresso. Para a construção dos diagramas de Venn foi utilizada a ferramenta online Venny 2.1 (Oliveros, 2015).

5.4.3 Enriquecimento de vias relacionadas aos miRNAs diferencialmente expressos

O enriquecimento das vias KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa e Goto, 2000) para os miRNAs diferencialmente expressos foi realizado a partir do software DIANA-mirPath v.3 (Vlachos *et al.,* 2015) com auxílio dos algoritmos TarBase (v.7.0) (Vlachos *et al.,* 2015) e microT-CDS (v.5.0) (Paraskevopoulou *et al.,* 2013). O TarBase é utilizado para buscar interações validadas experimentalmente entre miRNAs:mRNA, e o microT-CDS para predizer alvos a partir das interações nas regiões 3'-UTR e codificadora.

6. RESULTADOS

A partir do sequenciamento das amostras foram detectados (com ao menos 1 read) no total 548 miRNAs no soro e LCR. Apesar de o número de miRNAs no LCR ser conhecidamente menor do que no soro (Weber et al., 2010), no presente estudo os números foram praticamente equivalentes (278 no soro vs. 270 no LCR). Dos 548 miRNAs identificados, 59 foram detectados exclusivamente no soro, 51 exclusivamente no LCR, enquanto que 219 foram detectados em ambos os fluidos corporais.

Somente 19 miRNAs foram detectados em todas as amostras de soro comparado a 21 que foram detectados em todas as amostras de LCR, sendo 14 deles comuns aos dois fluidos (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-99a-5p). Ou seja, somente 5 miRNAs foram detectados somente em todas as amostras de soro (hsa-let-7f-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-30d-5p) e 7 miRNAs exclusivamente em todas as amostras de LCR (hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-199a-3p=hsa-miR-199b-3p).

Para avaliar os miRNAs diferencialmente expressos em cada grupo, foram feitas comparações duas a duas, conforme descrita na tabela 5.

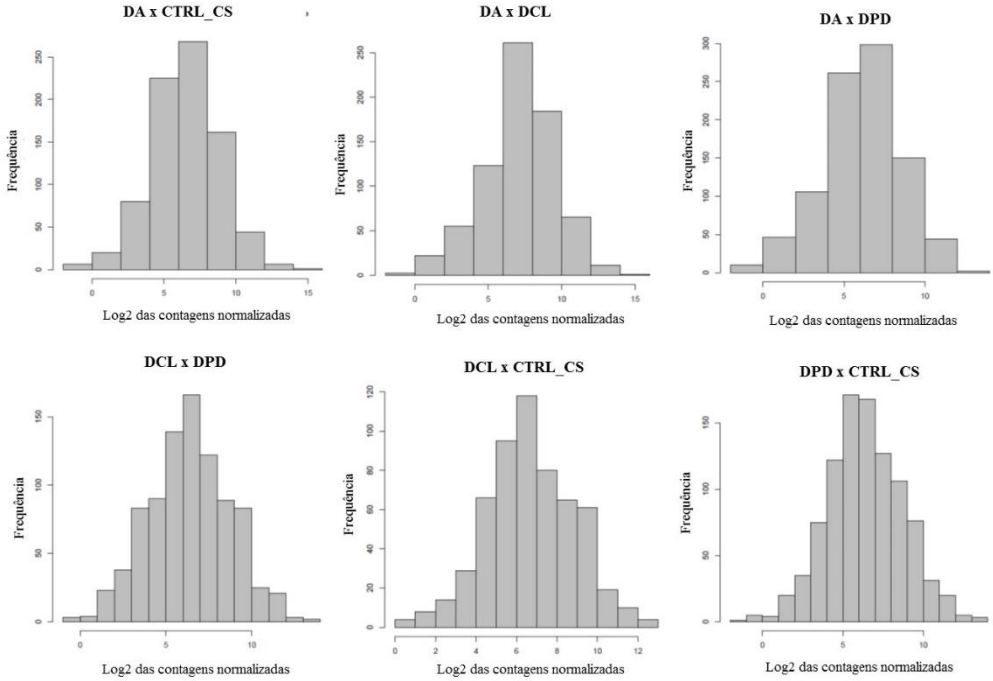
Tabela 5 – Comparações realizadas para verificação da expressão diferencial dos miRNAs em cada um dos grupos.

Fluido	**Comparação**
Soro	DA x CTRL_CS
	DA x DCL
	DA x DPD
	DCL x DPD
	DCL x CTRL_CS
	DPD x CTRL_CS
LCR	DA x CTRL_HPN
	DA x DCL
	DA x DPD
	DCL x DPD
	DCL x CTRL_HPN
	DPD x CTRL_HPN
Soro e LCR	DA_S x DA_L
	DCL_S x DCL_L
	DPD_S x DPD_L
	CTRL_CS x CTRL_HPN

FONTE: O autor (2016). CTRL_CS – Controle Cognitivamente Saudável; CTRL_HPN – Controle HPN. O segundo grupo em cada comparação foi usado como grupo referência nas análises de diferença de expressão.

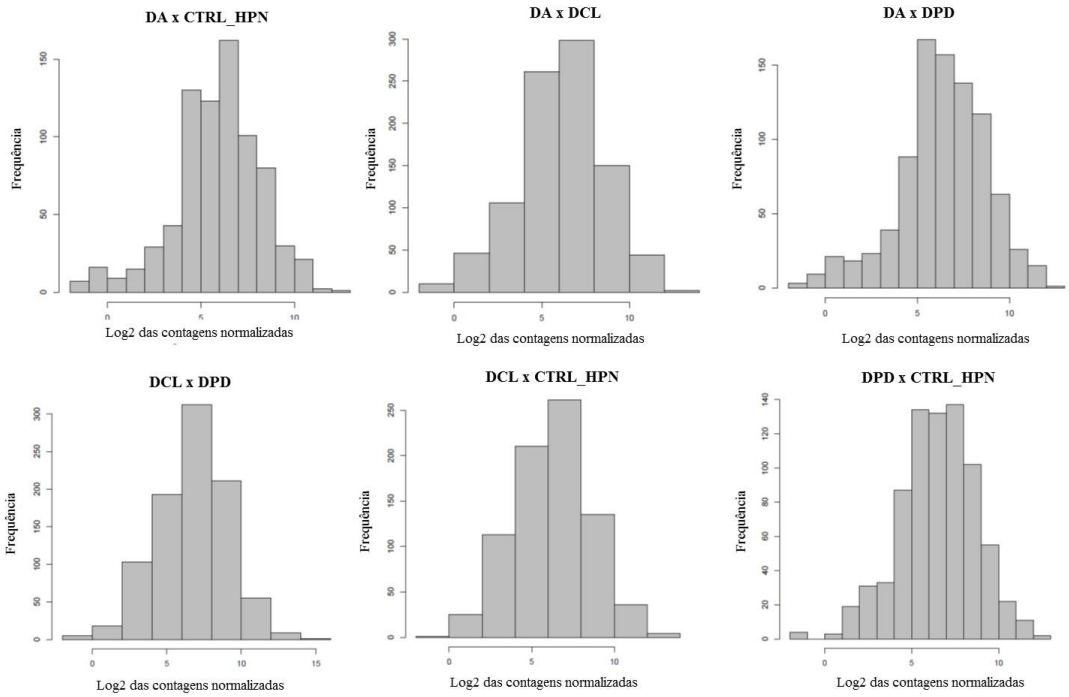
Foram gerados histogramas da distribuição da contagem dos *reads* devidamente normalizadas (DESEQ2, programa R), evidenciando a distribuição normal para todas as comparações, conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 – Distribuição da contagem normalizada dos *reads* para as comparações do soro, evidenciando distribuição normal para todas as comparações.



FONTE: O autor (2016).

Figura 9 – Distribuição da contagem normalizada dos *reads* para as comparações do LCR, evidenciando distribuição normal para todas as comparações.



FONTE: O autor (2016).

6.1 Perfil de miRNAs diferencialmente expressos nos diferentes tipos de demências

6.1.1 miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes

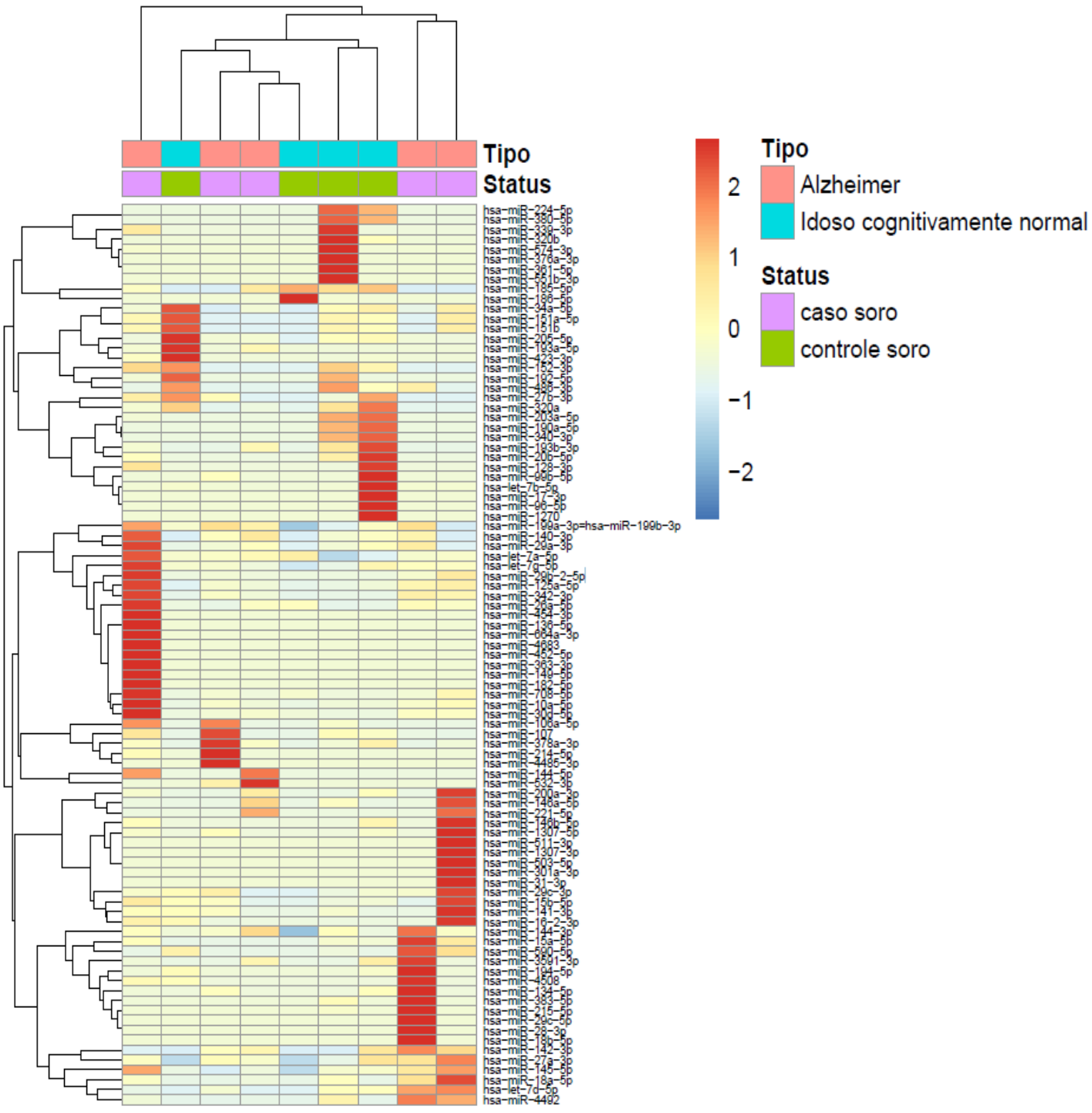
A fim de se obter o perfil sérico de expressão de miRNAs característico de cada tipo demencial, as amostras dos pacientes (DA, DCL e DPD) foram comparadas à expressão dos miRNAs no grupo controle cognitivamente saudável (CTRL_CS). Dos 278 miRNAs detectados no soro, 7 miRNAs estavam diferencialmente expressos na DA (5 mais expressos e 2 menos expressos), 10 em DCL (6 mais expressos e 4 menos expressos) e 6 para DPD (5 mais expressos e 1 menos expresso). A identificação de cada miRNA, assim como o valor de *Fold Change* (FC) e de p (<0,05), estão descritos na tabela 6. Os resultados para as demais comparações descritas na tabela 5 estão disponíveis no Apêndice 2.

Tabela 6 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no soro nos diferentes grupos de pacientes, comparados ao grupo controle cognitivamente saudável (CTRL_CS).

	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DA	hsa-miR-342-3p	20,22	0,000009
	hsa-miR-29b-2-5p	28,3	0,00009
	hsa-miR-10a-5p	7,23	0,0042
	hsa-miR-125a-5p	4,06	0,0074
	hsa-miR-708-5p	8,58	0,0082
	hsa-miR-380-5p	0,12	0,043
	hsa-miR-340-3p	0,12	0,045
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DCL	hsa-miR-708-5p	22,2	0,000025
	hsa-miR-452-5p	62,5	0,000034
	hsa-miR-30d-5p	9,4	0,000084
	hsa-miR-152-3p	0,04	0,0017
	hsa-miR-342-3p	11,6	0,0023
	hsa-miR-30e-5p	4,1	0,0092
	hsa-miR-106b-5p	0,06	0,012
	hsa-miR-30c-5p	3,4	0,017
	hsa-miR-31-5p	0,10	0,038
	hsa-miR-194-5p	0,11	0,047
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DPD	hsa-miR-144-5p	18,7	0,00051
	hsa-miR-342-3p	4,22	0,016
	hsa-miR-708-5p	4,62	0,017
	hsa-miR-149-5p	8,25	0,018
	hsa-miR-93-5p	0,32	0,021
	hsa-miR-15b-5p	3,40	0,040

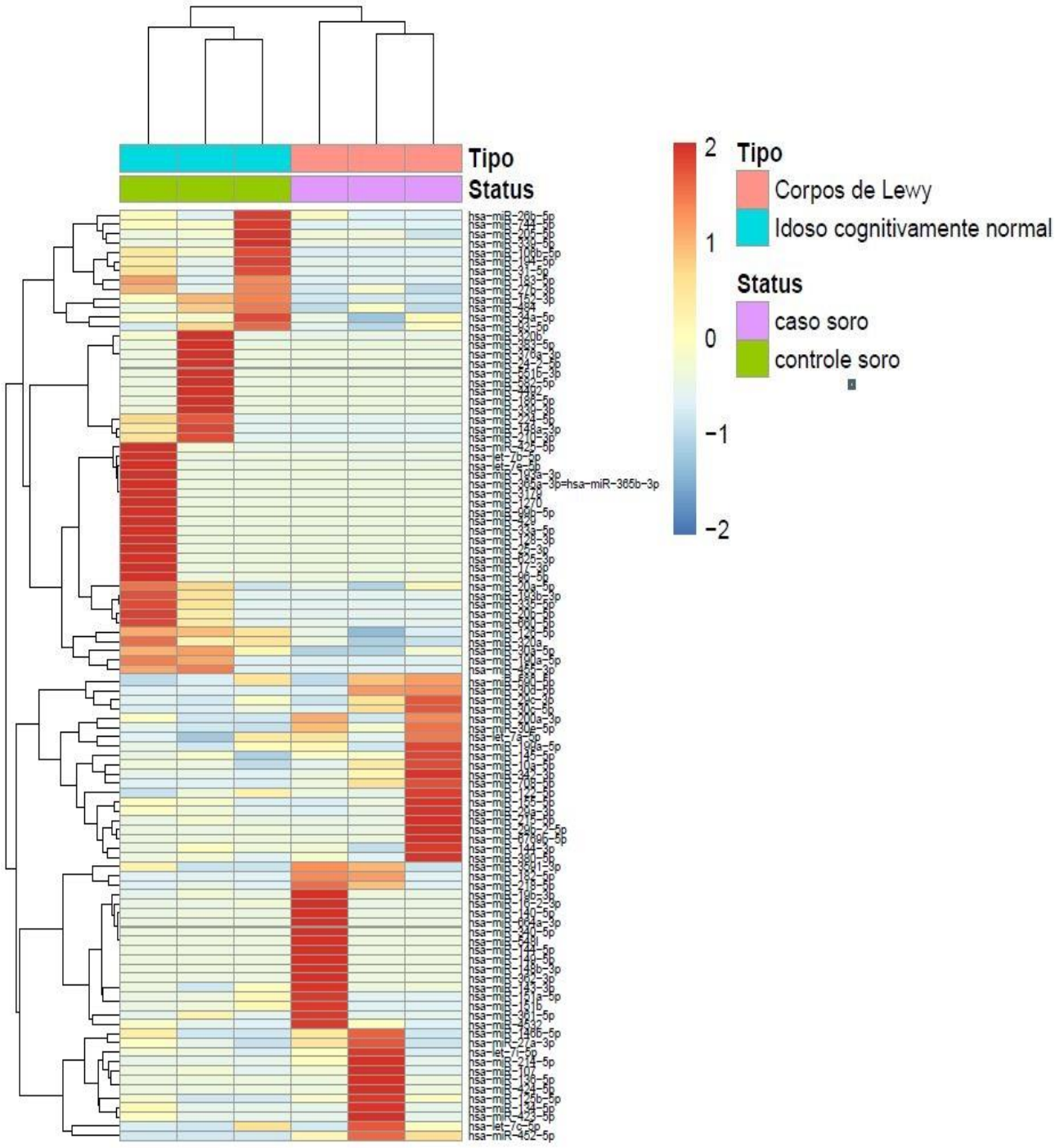
A visualização global da expressão dos diferentes tipos de miRNA com FC > 1,5 e < 0,5 em cada grupo, estão evidenciados nas figuras 10, 11 e 12. A partir da análise da figura 11 é possível observar um nítido agrupamento das amostras dos pacientes com DCL comparados aos idosos cognitivamente saudáveis (CTRL_CS).

Figura 10 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DA comparado ao grupo controle (CTRL_CS). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



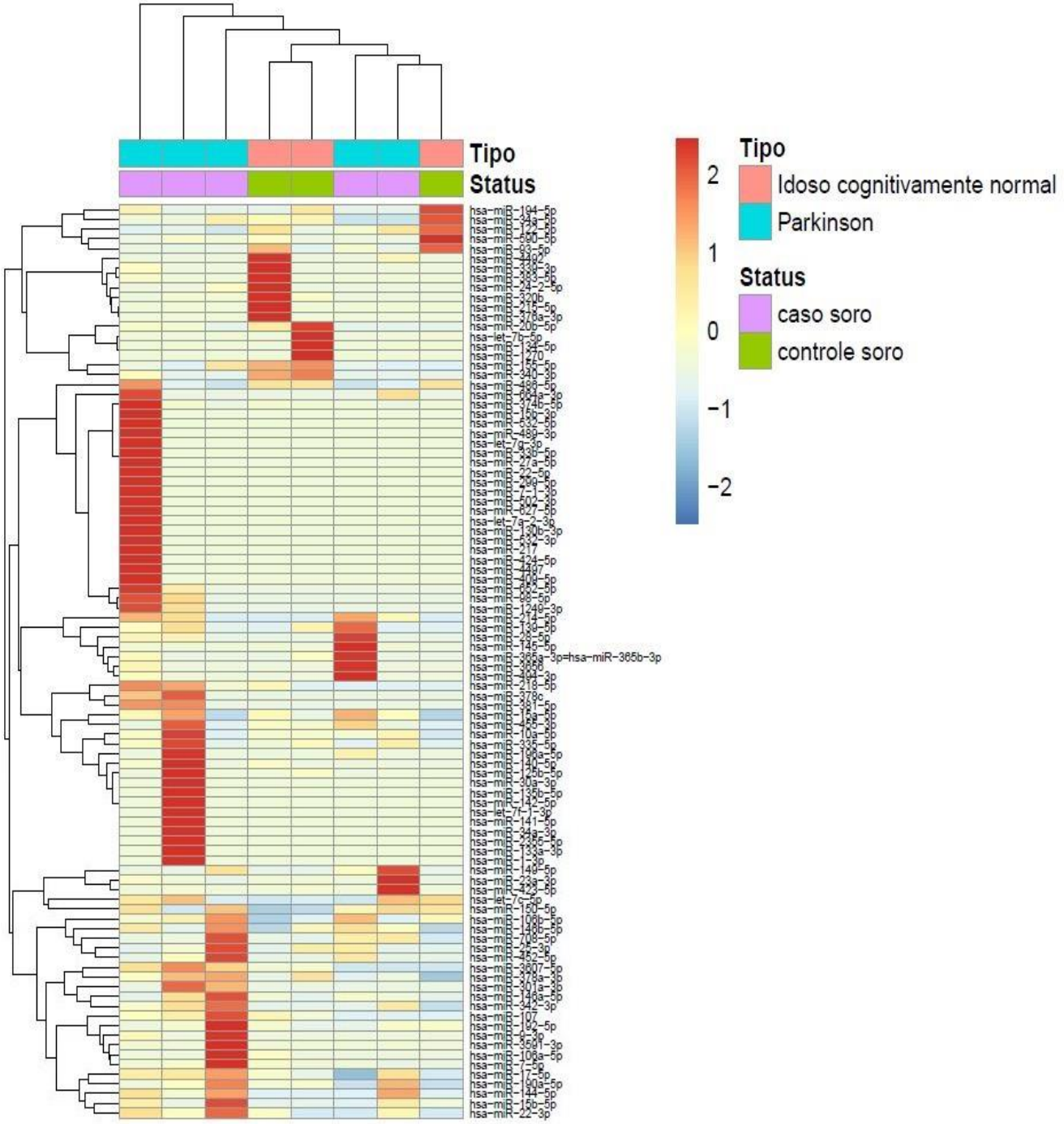
FONTE: O autor (2016).

Figura 11 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DCL comparado ao grupo controle (CTRL_CS). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



FONTE: O autor (2016).

Figura 12 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DPD comparado ao grupo controle (CTRL_CS). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



FONTE: O autor (2016).

6.1.2 miRNAs diferencialmente expressos no LCR de pacientes

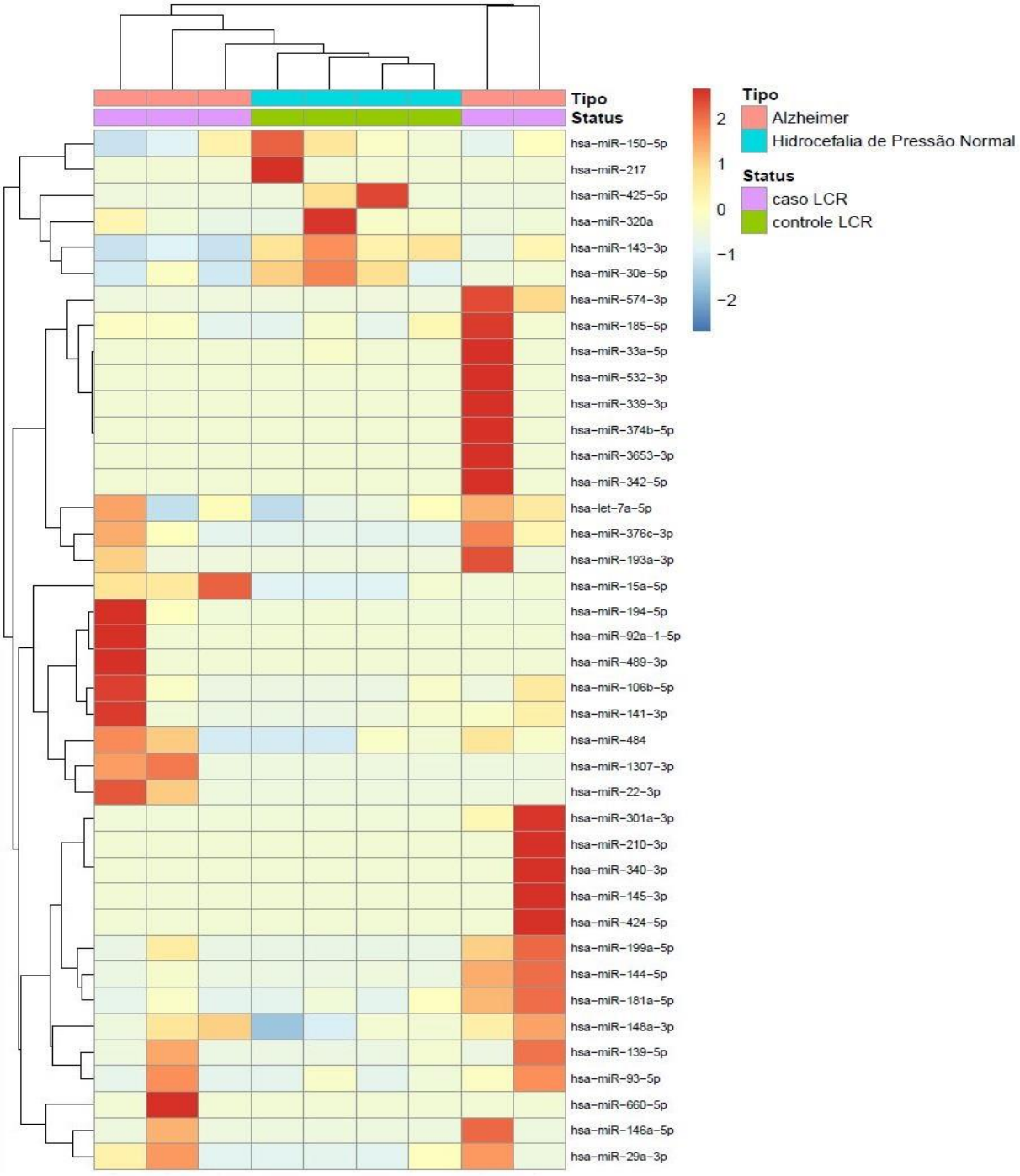
Da mesma forma que para o soro, foram encontrados miRNAs diferencialmente expressos em LCR de pacientes, quando comparados aos controles (CTRL_HPN). Dos 270 miRNAs detectados, 14 deles estavam significativamente desregulados. No grupo DA, foram encontrados somente 2 miRNAs diferencialmente expressos, ambos super-expressos. Já no grupo DCL, foram encontrados 8 miRNAs, 6 com maior expressão em relação a 2 menos expressos, por fim, em DPD, foram verificados 4 miRNAs, sendo 3 deles mais expressos e 1, menos expresso (tabela 7).

Tabela 7 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no LCR nos diferentes grupos de pacientes, comparados ao grupo controle (CTRL_HPN).

	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DA	hsa-miR-376c-3p	4,46	0,0075
	hsa-miR-15a-5p	3,13	0,041
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DCL	hsa-miR-454-3p	0,011	0,0035
	hsa-miR-423-5p	17,56	0,0046
	hsa-miR-199a-5p	44,06	0,0064
	hsa-miR-423-3p	28,06	0,0167
	hsa-miR-193b-5p	23,56	0,0247
	hsa-miR-221-5p	30,74	0,0285
	hsa-miR-374b-5p	28,08	0,0313
	hsa-miR-150-5p	0,095	0,0358
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DPD	hsa-miR-199a-5p	101,87	0,00000016
	hsa-miR-106b-5p	10,98	0,014
	hsa-miR-141-3p	6,64	0,024
	hsa-miR-454-3p	0,10	0,026

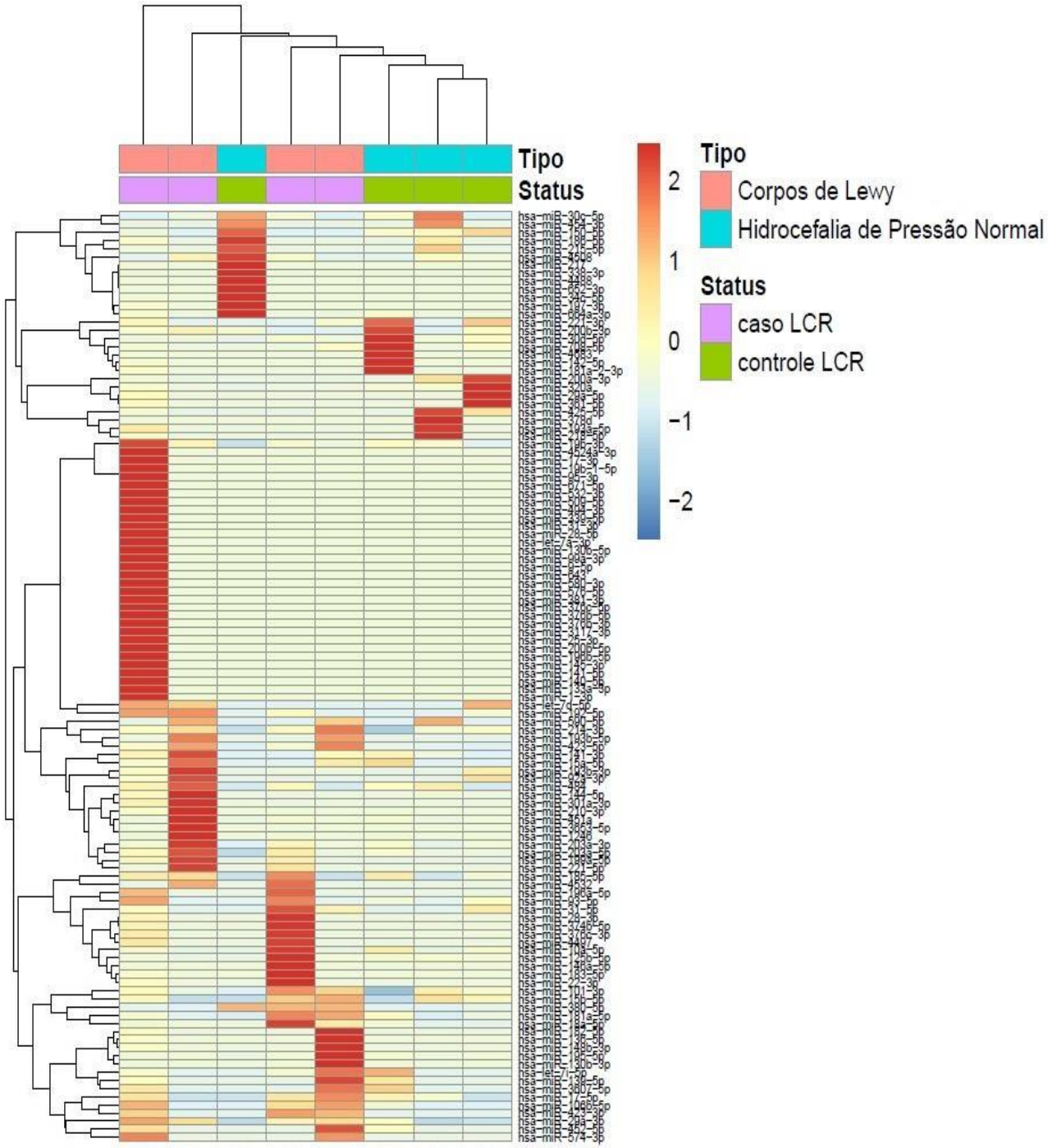
A partir da análise das figuras 13, 14 e 15, é possível observar a expressão global dos miRNAs com FC > 1,5 e < 0,5, assim como o agrupamento das amostras nos grupos DA, DCL e DPD, respectivamente. No caso do LCR, em nenhuma das figuras é possível observar o perfeito agrupamento das amostras por grupo.

Figura 13 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DA comparado ao grupo controle (CTRL_HPN). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



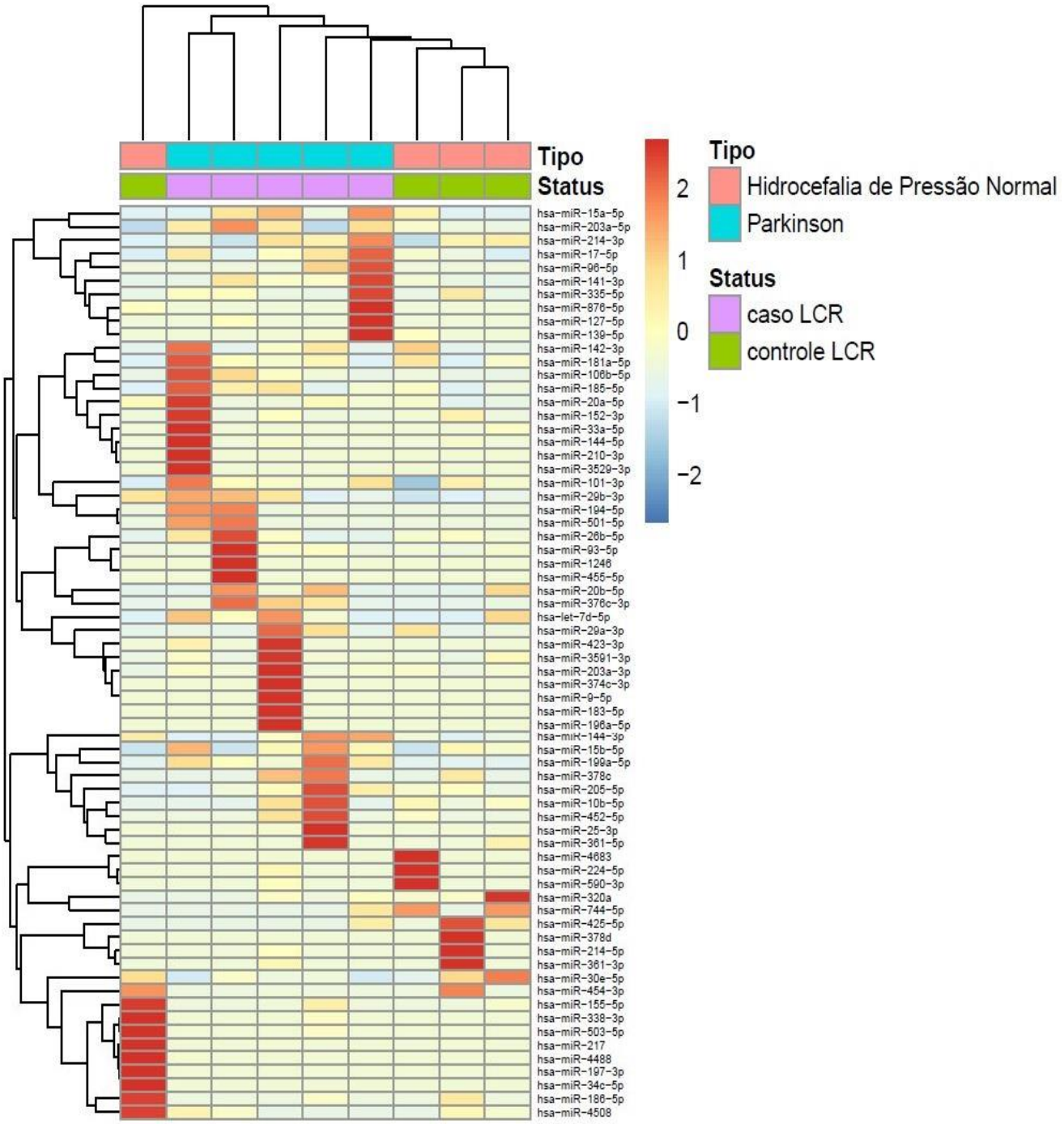
FONTE: O autor (2016).

Figura 14 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DCL comparado ao grupo controle (CTRL_HPN). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



FONTE: O autor (2016).

Figura 15 – Expressão diferencial dos miRNAs expressos em pacientes DPD comparado ao grupo controle (CTRL_HPN). O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos miRNAs. O vermelho indica indução da expressão, a cor azul repressão, e o amarelo, sem modulação. O *heat map* foi gerado a partir dos miRNAs que apresentaram FC > 1,5 e < 0,5.



FONTE: O autor (2016).

6.2 Enriquecimento de vias para os perfis de miRNAs diferencialmente expressos

Os perfis de expressão diferencial dos miRNAs em pacientes em relação aos controles (tabelas 6 e 7), foram utilizados para predizer as vias biológicas, assim como o número de genes sob o controle destes conjuntos de miRNAs. O objetivo desta análise foi avaliar de que forma a atuação destes miRNAs poderia influenciar os processos de neurodegeneração, de forma geral. As vias encontradas, assim como seus respectivos valores de p (<0,05), número de genes alvos e a quantidade de miRNAs dos perfis que participam das vias foram agrupados nas tabelas 8 e 9 para o soro e LCR, respectivamente.

Tabela 8 – Vias KEGG, valores de p e número de genes controlados pelos miRNAs diferentemente expressos em soro de pacientes DA, DCL e DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_CS).

Grupo	Vias KEGG (identificação)	Valor de p	Genes Regulados	miRNAs (N)	Algoritmo
DA	Interação Matrix Extra Celular (MEC) - receptor (hsa04512)	$9{,}2x10^{-17}$	25	hsa-miR-340-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-29b-2-5p (7)	Tarbase
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	0,000122	26	hsa-miR-340-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-29b-2-5p (6)	Tarbase
	Via de sinalização Notch (hsa04330)	0,00595	19		
	Proteólise mediada pela ubiquitina (hsa04120)	0,0048	31	hsa-miR-340-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-29b-2-5p (7)	microT-CDS
	Via de sinalização MAPK (hsa04010)	0,0294	44	hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-29b-2-5p (6)	microT-CDS
DCL	Interação Matrix Extra Celular (MEC) - receptor (hsa04512)	$<1x10^{-325}$	18	hsa-miR-708-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-452-5p (3)	Tarbase
	Proteólise mediada pela ubiquitina (hsa04120)	$5{,}5x10^{-15}$	62	hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-194-5p (5)	Tarbase
	Doenças de Prion (hsa05020)	$6{,}2x10^{-12}$	6	hsa-miR-106b-5p (1)	Tarbase
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	$5{,}7x10^{-5}$	33	hsa-miR-708-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-30c-5p (4)	Tarbase
	Via de sinalização Wnt (hsa04310)	0,00913	46	hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-30c-5p (3)	Tarbase
	Via de sinalização FoxO (hsa04068)	0,0384	32	hsa-miR-106b-5p (1)	Tarbase
	Doenças de Prion (hsa05020)	$<1x10^{-325}$	1	hsa-miR-152-3p (1)	microT-CDS
	Direcionamento de axônios (hsa04360)	$2{,}99x10^{-7}$	39	hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p (4)	microT-CDS
	Junções Gap (hsa04540)	0,000909	16		
DPD	Doenças de Prion (hsa05020)	$3{,}8x10^{-10}$	12	hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-149-5p (5)	Tarbase
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	$3{,}05x10^{-06}$	38		
	Proteólise mediada pela ubiquitina (hsa04120)	$3{,}10x10^{-6}$	66	hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-144-5p (6)	Tarbase
	Via de sinalização mTOR (hsa04150)	0,0043	30	hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-149-5p (5)	Tarbase
	Via de sinalização FoxO (hsa04068)	0,0137	53		
	Via de sinalização de neurotrofinas (hsa04722)	0,0214	48		
	Via de sinalização PI3K-Akt (hsa04151)	0,0221	115		
	Via de sinalização AMPK (hsa04152)	0,0263	51		
	Via de sinalização MAPK (hsa04010)	0,0264	87		
	Via de sinalização Wnt (hsa04310)	0,00656	28	hsa-miR-342-3p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-144-5p (6)	microT-CDS

A partir das análises, foram encontradas 19 vias ao todo, sendo 13 delas comuns aos perfis de miRNAs diferencialmente expressos nos dois fluidos biológicos (Interação Matrix Extra Celular (MEC) - receptor, proteólise mediada pela ubiquitina, doenças de Prion, direcionamento de axônios, junções gap e vias de sinalização MAPK, TGF-beta, Wnt, FoxO, mTOR, de neurotrofinas, PI3K-Akt e AMPK). Somente a via de sinalização Notch foi predita exclusivamente para o perfil de expressão sérico em DA (tabela 8), e as vias: doença de Huntington, sinapse GABAérgica, moléculas de adesão celulares (CAMs), vias de sinalização TNF e HIF-1, foram encontradas somente para os perfis de miRNAs diferencialmente expressos no LCR (tabela 9).

Tabela 9 – Vias KEGG, valores de p e número de genes controlados pelos miRNAs diferentemente expressos em LCR de pacientes DA, DCL e DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_HPN).

Grupo	Vias KEGG (identificação)	Valor de p	Genes Regulados	miRNAs (N)	Algoritmo
DA	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	0,000967	22	hsa-miR-15a-5p (1)	Tarbase
	Proteólise mediada pela ubiquitina (hsa04120)	0,00657	34		
	Via de sinalização mTOR (hsa04150)	0,00119	15	hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-376c-3p (2)	microT-CDS
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	0,00393	13		
	Via de sinalização PI3K-Akt (hsa04151)	0,00516	41		
	Via de sinalização AMPK (hsa04152)	0,00946	19		
	Via de sinalização FoxO (hsa04068)	0,0364	18		
DCL	Doenças de Prion (hsa05020)	$1,08x10^{-12}$	13	hsa-miR-454-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-150-5p (8)	Tarbase
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	0,00102	25		
	Via de sinalização FoxO (hsa04068)	0,00265	51		
	Interação Matrix Extra Celular (MEC) - receptor (hsa04512)	0,00659	24		
	Via de sinalização de neurotrofinas (hsa04722)	0,0191	45		
	Via de sinalização MAPK (hsa04010)	0,0306	79		
	Doença de Huntington (hsa05016)	0,0411	54		
	Via de sinalização Wnt (hsa04310)	0,0223	32	hsa-miR-454-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-150-5p (6)	microT-CDS
	Sinapse GABAérgica (hsa04727)	0,0223	17	hsa-miR-454-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-221-5p (6)	microT-CDS
	Moléculas de adesão celulares (CAMs) (hsa04514)	0,0484	29	hsa-miR-454-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-150-5p (7)	microT-CDS
DPD	Doenças de Prion (hsa05020)	$6,8x10^{-13}$	8	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-454-3p (4)	Tarbase
	Via de sinalização FoxO (hsa04068)	$1,62x10^{-6}$	53		
	Via de sinalização de neurotrofinas (hsa04722)	0,000116	44		
	Via de sinalização mTOR (hsa04150)	0,00293	24		
	Proteólise mediada pela ubiquitina (hsa04120)	0,00426	44		
	Via de sinalização TGF-beta (hsa04350)	0,00541	26		
	Via de sinalização MAPK (hsa04010)	0,00586	70		
	Via de sinalização TNF (hsa04668)	0,00809	32		
	Via de sinalização PI3K-Akt (hsa04151)	0,0157	85		
	Via de sinalização HIF-1 (hsa04066)	0,031	32		
	Via de sinalização AMPK (hsa04152)	0,0411	37		
	Direcionamento de axônios (hsa04360)	0,0411	35		
	Junções Gap (hsa04540)	0,00572	19	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-454-3p (4)	microT-CDS
	Via de sinalização Wnt (hsa04310)	0,0209	29		

A maioria dos miRNAs desregulados do perfil sérico em DA estão envolvidos em todas as vias enriquecidas para estes pacientes, com exceção do miR-380-5p que não participa das vias de sinalização TGF-beta e Notch, assim como o miR-340-3p não está envolvido no controle dos genes da via de sinalização MAPK (tabela 8). Do mesmo modo, para os pacientes DPD, o único miRNA ausente da maioria das vias enriquecidas é o miR-144-5p. Este miRNA participa somente das vias de sinalização Wnt e de proteólise mediada pela ubiquitina, juntamente com os demais miRNAs do perfil para DPD.

A quase totalidade dos miRNAs dos perfis participando de todas as vias preditas para os grupos DA e DPD, não ocorreu em DCL. O número de miRNAs controlando genes de vias diferentes variou de 1 a 5, com nenhuma via sendo controlada por todos os miRNAs do perfil. Por exemplo, o miR-106b-5p foi o único miRNA envolvido nas vias Doenças de Prion e de sinalização FoxO, enquanto que os 5 miRNAs juntos miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-30c-5p, miR-106b-5p, miR-194-5p estavam responsáveis por atuar somente na via proteólise mediada pela ubiquitina (tabela 8).

Em LCR, o perfil de miRNAs diferencialmente expressos em DPD participa de todas as vias enriquecidas para a doença (tabela 9). O perfil de expressão em DCL, diferentemente do que visto no soro, apresenta a participação de quase totalidade dos miRNAs em todas as vias. Como somente 2 miRNAs (miR-15a-5p e miR-376c-3p) se mostraram diferencialmente expressos em LCR no grupo DA. Estes foram vistos participando de quase todas as vias, com exceção do miR-15a-5p, que controla, sozinho, 22 genes da via de sinalização TGF-beta e 34 genes da via de proteólise mediada pela ubiquitina.

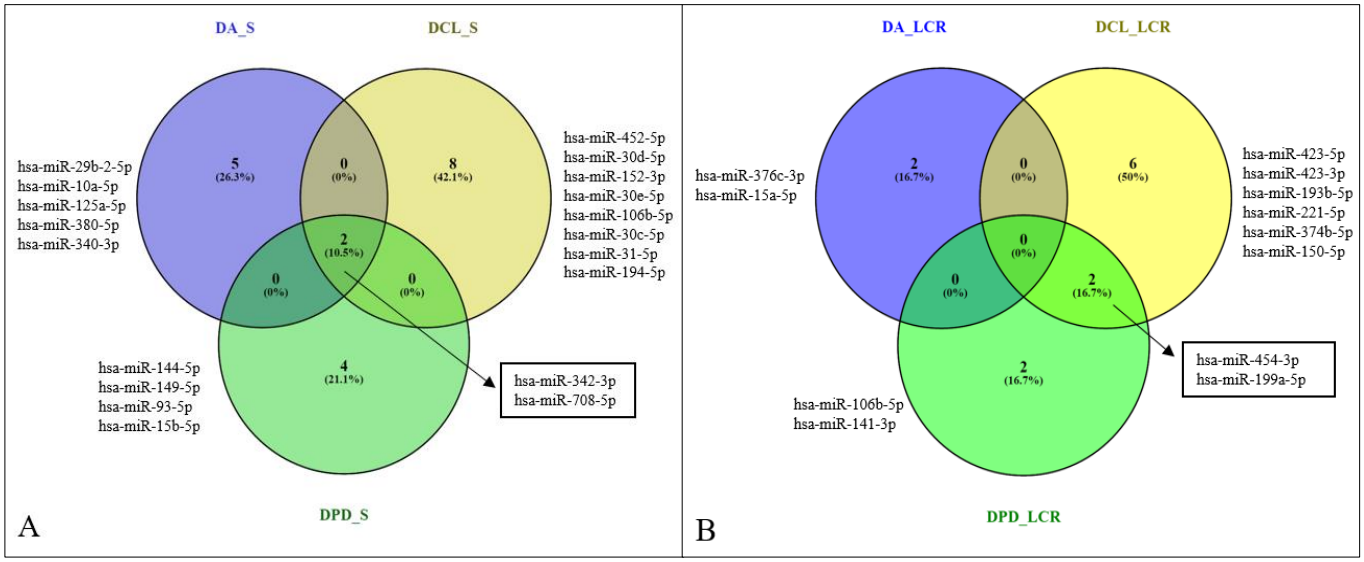
6.3 Interpolação dos miRNAs diferencialmente expressos nos diferentes tipos de demências

Com o intuito de auxiliar no diagnóstico diferencial das diferentes patologias, foram construídos diagramas de Venn, a partir de todas as comparações realizadas de expressão diferencial (tabela 5). Os miRNAs com expressão alterada, utilizando DCL e DPD como grupos referência, foram utilizados para complementar os resultados dos diagramas. Por esta razão, estão apresentados nas tabelas 10 (soro) e 11 (LCR).

A partir dos diagramas de Venn, foi possível visualizar o número de miRNAs que estavam com expressão alterada em mais de uma demência ao mesmo tempo, e aqueles que apareceram somente em um dos grupos.

A figura 16 mostra a comparação feita entre os grupos DA, DCL e DPD com seus respectivos controles, no soro e no LCR. No soro (figura 16A), foram encontrados 5 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em DA, 8 em DCL e 4 em DPD. Ademais, os miRNAs miR-342-3p e miR-708-5p foram identificados como diferencialmente expressos no soro de todas as demências, comparados aos controles (intersecção central). Com auxílio da tabela 6, é possível verificar que estes miRNAs estão sempre mais expressos (FC acima de 4), independentemente do grupo. Em relação às amostras de LCR (figura 16B), só foram encontrados miRNAs comuns considerando a intersecção de DCL e DPD (miR-454-3p e miR-199a). Apesar de a expressão do miR-199a ser maior tanto no grupo DCL, quanto no DPD (tabela 7), o valor de FC para DPD é consideravelmente maior comparado a DCL (101,9 DPD vs 44,1 DCL). Já em relação ao miR-454-3p, este miRNA está cerca de 10x menos expresso em DCL, comparado à DPD (tabela 7). Considerando os miRNAs diferencialmente expressos específicos de cada demência encontrados no LCR, os números foram 2, 6 e 2 para DA, DCL e DPD, respectivamente.

Figura 16 – Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos de cada síndrome demencial. Cada círculo representa os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes em relação ao grupo controle (CTRL_CS ou CTRL_HPN), destacando os miRNAs que são exclusivos em cada comparação (descritos ao lado de cada círculo), assim como os comuns, nas intersecções (descritos dentro da caixa de texto apontadas pela seta). A) Soro B) LCR.



O grupo DA foi utilizado como alvo em todas as comparações e os grupos controle, DCL e DPD como grupo referência (figura 17). A ideia foi verificar a possibilidade de diferenciar a DA tanto do controle, quanto das demais demências, a partir dos miRNAs comuns em cada intersecção.

Analisando o diagrama referente ao soro (figura 17A), os miRNAs miR-125a-5p e miR-380-5p são comuns em todas as comparações utilizando DA como grupo alvo (intersecção central) e estão mais e menos expressos, respectivamente, independentemente do grupo utilizado como referência (tabelas 7 e 11). Além disso, o miR-125a-5p também está mais expresso no soro de DA quando comparado ao LCR dos mesmos pacientes (Apêndice 2 – Tabela 1). O miR-29b-2-5p está mais expresso no soro tanto comparado ao grupo controle ($p = 0,00009$, tabela 6) quanto com DPD ($p = 1,10x10^{-11}$, tabela 10). O miR-4492 foi verificado como mais expresso em soro de DA comparado aos grupos DCL ($p = 0,046$) e DPD ($p = 0,024$) (tabela 10).

Ainda considerando as comparações feitas no grupo DA em relação aos grupos DCL e DPD, porém agora no LCR (figura 17B), foram encontrados somente dois miRNAs comuns (miR-142-5p, mais expresso e miR-143-3p, menos expresso – tabela 11). Os demais miRNAs do LCR foram verificados como exclusivos de cada grupo.

Figura 17 – **Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos no soro e LCR na DA.** Cada círculo representa os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com DA em relação ao grupo controle (CTRL_CS ou CTRL_HPN), e às outras demências (DCL e DPD), destacando os miRNAs que são exclusivos em cada comparação (descritos ao lado de cada círculo), assim como os comuns, nas intersecções (descritos dentro da caixa de texto apontadas pela seta). A) Soro B) LCR.

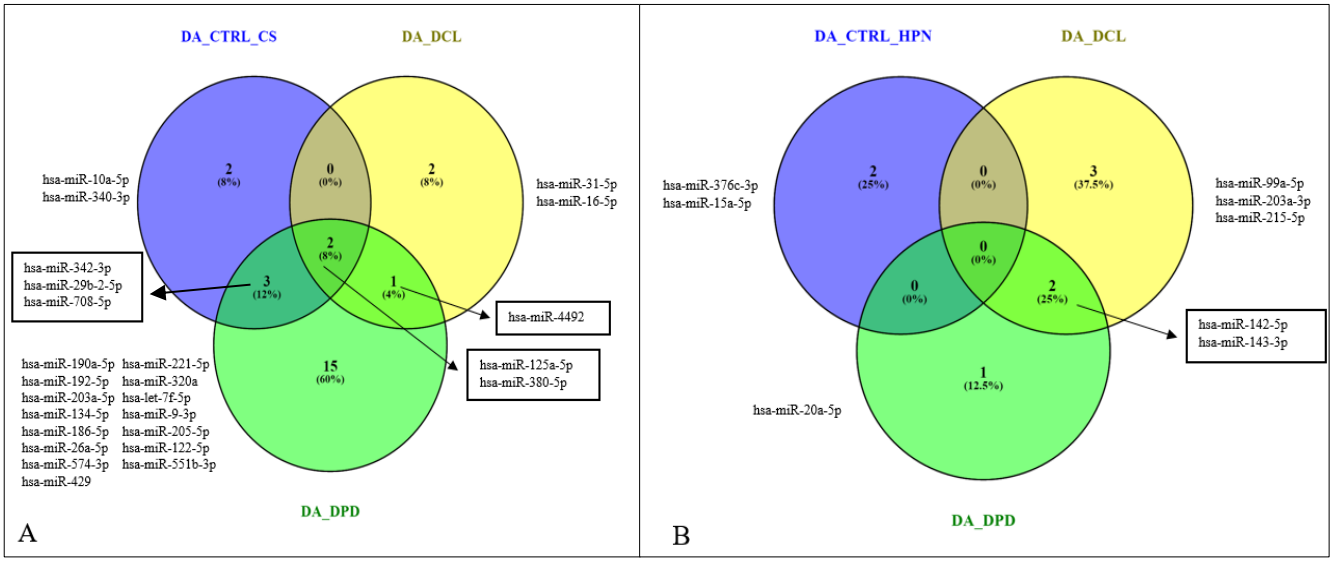


Tabela 10 – miRNAs diferencialmente expressos no soro para as comparações DA x DCL; DA x DPD e DCL x DPD.

	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DA x DCL	hsa-miR-380-5p	0,04	0,00053
	hsa-miR-125a-5p	3,12	0,021
	hsa-miR-31-5p	8,23	0,026
	hsa-miR-16-5p	0,47	0,038
	hsa-miR-4492	6,71	0,046
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DA x DPD	hsa-miR-29b-2-5p	560,03	$1{,}10x10^{-11}$
	hsa-miR-190a-5p	0,010	$1{,}59x10^{-05}$
	hsa-miR-192-5p	0,019	0,00016
	hsa-miR-125a-5p	4,19	0,00076
	hsa-miR-342-3p	4,84	0,0019
	hsa-miR-708-5p	8,20	0,0029
	hsa-miR-203a-5p	0,055	0,0035
	hsa-miR-134-5p	38,20	0,0053
	hsa-miR-186-5p	0,027	0,0056
	hsa-miR-26a-5p	2,63	0,0170
	hsa-miR-380-5p	0,039	0,0184
	hsa-miR-574-3p	0,079	0,0192
	hsa-miR-429	0,040	0,0200
	hsa-miR-4492	10,42	0,0239
	hsa-miR-221-5p	21,58	0,0253
	hsa-miR-320a	0,12	0,0255
	hsa-let-7f-5p	0,42	0,0278
	hsa-miR-9-3p	0,05	0,0292
	hsa-miR-205-5p	0,49	0,0338
	hsa-miR-122-5p	3,11	0,0398
	hsa-miR-551b-3p	0,059	0,0406
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DCL x DPD	hsa-miR-106b-5p	0,0047	$7{,}70x10^{-8}$
	hsa-miR-31-5p	0,0060	$2{,}08x10^{-7}$
	hsa-miR-30d-5p	16,37	$2{,}23x10^{-5}$
	hsa-miR-183-5p	0,013	0,00015
	hsa-miR-455-3p	0,013	0,00030
	hsa-miR-148a-3p	0,013	0,00061
	hsa-miR-190a-5p	0,016	0,00086
	hsa-miR-335-5p	0,015	0,00097
	hsa-miR-152-3p	0,013	0,0011
	hsa-miR-210-3p	0,016	0,0012
	hsa-miR-182-5p	94,68	0,0015
	hsa-miR-744-5p	0,025	0,0078
	hsa-let-7e-5p	0,049	0,010
	hsa-miR-30e-5p	3,92	0,010
	hsa-miR-423-3p	0,028	0,011
	hsa-miR-193b-3p	0,034	0,014
	hsa-miR-25-3p	0,027	0,016
	hsa-miR-30c-5p	3,66	0,017
	hsa-miR-660-5p	0,042	0,017
	hsa-miR-708-5p	4,91	0,020
	hsa-miR-365a-3p=hsa-miR-365b-3p	0,025	0,022
	hsa-miR-15b-5p	0,098	0,026
	hsa-miR-425-5p	0,035	0,028
	hsa-miR-186-5p	0,040	0,033
	hsa-miR-590-5p	15,73	0,040
	hsa-miR-122-5p	3,50	0,044

Tabela 11 – miRNAs diferencialmente expressos no LCR para as comparações DA x DCL; DA x DPD e DCL x DPD.

	miRNA	**Fold Change**	**Valor de p**
DA x DCL	hsa-miR-99a-5p	0,45	0,0058
	hsa-miR-142-5p	5,19	0,0067
	hsa-miR-143-3p	0,32	0,032
	hsa-miR-203a-3p	0,53	0,036
	hsa-miR-215-5p	3,55	0,037
	miRNA	**Fold Change**	**Valor de p**
DA x DPD	hsa-miR-142-5p	3,08	0,015
	hsa-miR-20a-5p	0,36	0,015
	hsa-miR-143-3p	0,40	0,044
	miRNA	**Fold Change**	**Valor de p**
DCL x DPD	hsa-miR-423-5p	128,70	$4{,}76 \times 10^{-6}$
	hsa-miR-590-5p	43,90	0,0040
	hsa-miR-193b-5p	30,25	0,011
	hsa-miR-194-5p	0,03	0,014
	hsa-miR-221-5p	36,08	0,015
	hsa-miR-501-5p	0,041	0,031
	hsa-miR-96-5p	0,044	0,035
	hsa-miR-22-3p	17,72	0,042

Os próximos diagramas apresentam os resultados das demências agora comparadas 2 a 2, cada uma com seu respectivo controle e comparadas entre si (DA x DCL – figura 18 e DA x DPD – figura 19 e DCL e DPD – figura 20). O objetivo destas análises foi verificar a existência de miRNAs diferencialmente expressos comuns capazes de diferenciar tanto o paciente do controle, quanto as duas doenças entre si. Os miRNAs com expressão alterada que foram encontrados como comuns no soro de pacientes com DA, comparado a DCL (figura 18A) e DPD (figura 19A), já foram previamente descritos nas figuras 16A e 17A. A única diferença está na figura 18A, na intersecção entre DA x DCL e DCL x CTRL_CS, em que o miR-31-5p foi identificado como comum, sendo menos expresso sempre em DCL (tabela 10 e tabela 6, respectivamente). Nas comparações realizadas para o LCR (figuras 18B e 19B), foram encontrados somente miRNAs exclusivos, em cada grupo.

Figura 18 – **Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DA e DCL.** Cada círculo representa os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com DA ou DCL, em relação ao grupo controle (CTRL_CS ou CTRL_HPN), e DA em relação a DCL, destacando os miRNAs que são exclusivos em cada comparação (descritos ao lado de cada círculo), assim como os comuns, nas intersecções (descritos dentro da caixa de texto apontadas pela seta). A) Soro B) LCR.

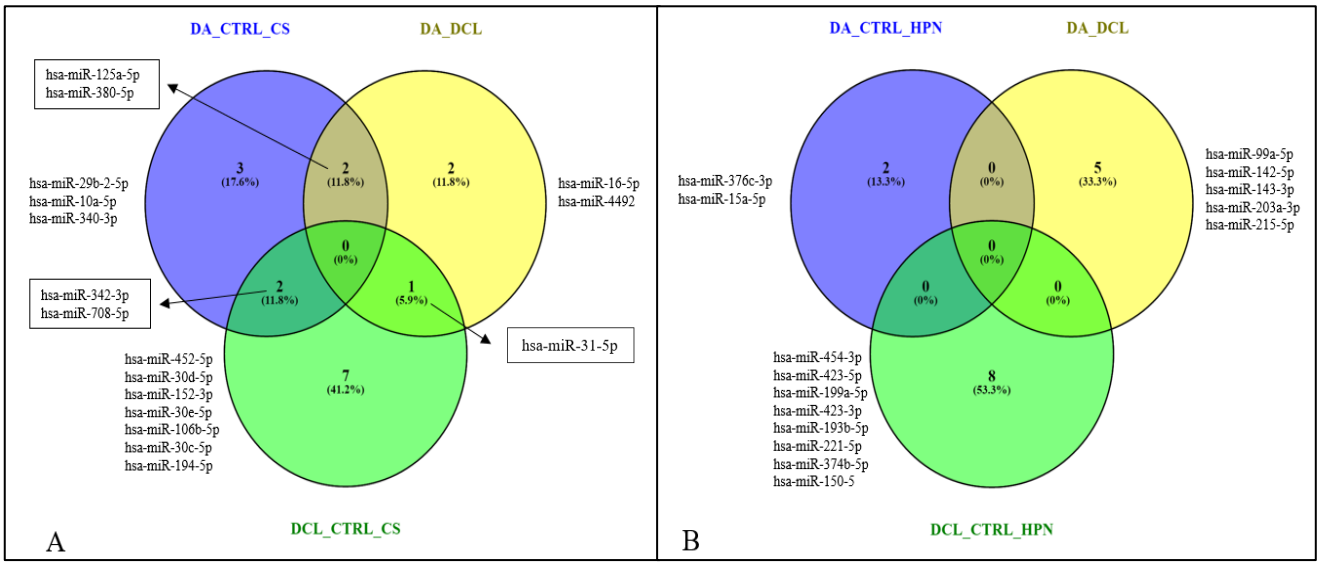
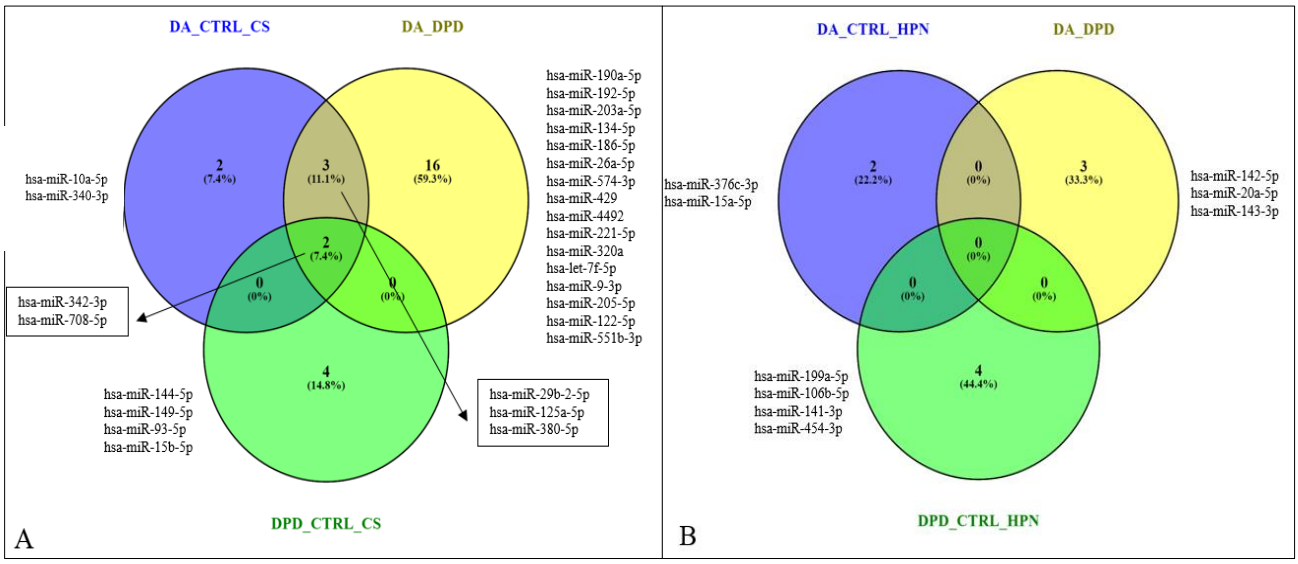


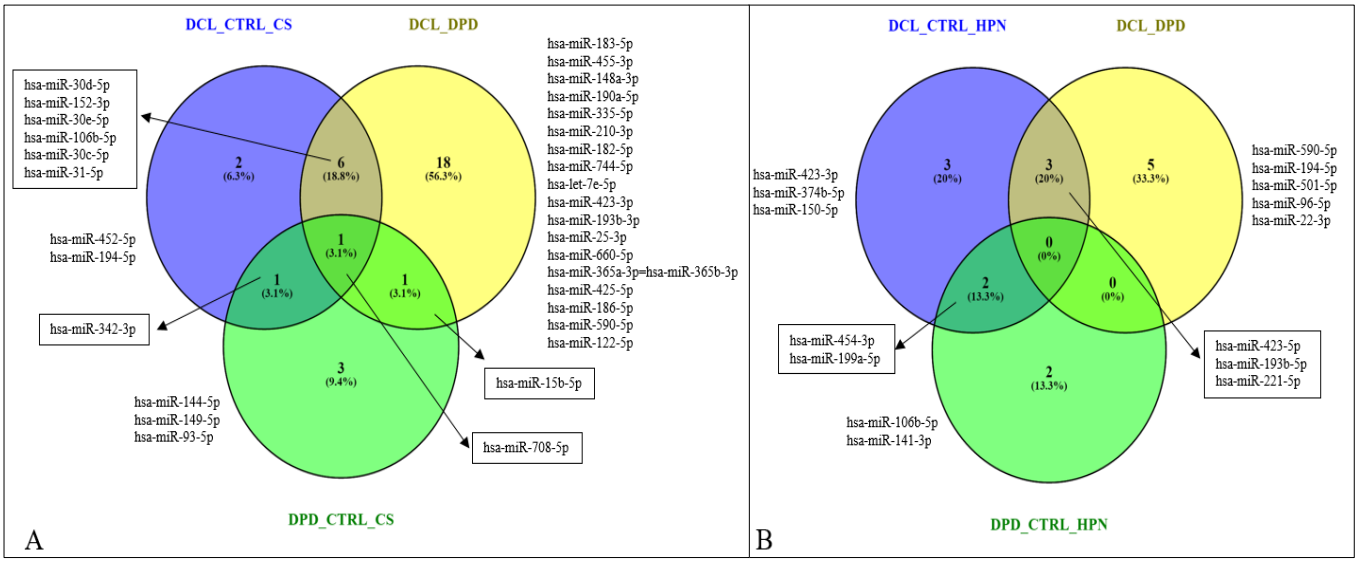
Figura 19 – **Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DA e DPD.** Cada círculo representa os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com DA ou DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_CS ou CTRL_HPN), e DA em relação a DPD, destacando os miRNAs que são exclusivos em cada comparação (descritos ao lado de cada círculo), assim como os comuns, nas intersecções (descritos dentro da caixa de texto apontadas pela seta). A) Soro B) LCR.



A comparação realizada entre os grupos DCL e DPD (figura 20) foi a que mais identificou miRNAs diferencialmente expressos comuns. Na intersecção entre DCL x CTRL_CS e DCL x DPD (figura 20A), 6 miRNAs foram identificados com a expressão alterada, sendo 3 deles super-expressos em DCL nas duas comparações (miR−30d−5p, miR−30e−5p e miR−30c−5p), e 3 menos expressos (miR-106b-5p e miR-152-3p e miR-31-5p). O miR-15b-5p, em contrapartida, está mais expresso em DPD, tanto em relação ao grupo controle (tabela 6), quanto ao DCL (tabela 10).

Na comparação realizada entre DCL x CTRL_HPN e DCL x DPD no LCR (figura 20B), foram identificados 3 miRNAs igualmente desregulados (miR-423-5p, miR-193b-5p e miR-221-5p), todos mais expressos em DCL (tabelas 7 e 11). O destaque está para o maior FC do miR-423-5p na comparação DCL x DPD, em relação a DCL x CTRL_HPN (128,70 vs 17,56, respectivamente).

Figura 20 – **Diagrama de Venn com os miRNAs diferencialmente expressos comuns e específicos entre DCL e DPD.** Cada círculo representa os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com DCL ou DPD, em relação ao grupo controle (CTRL_CS ou CTRL_HPN), e DCL em relação a DPD, destacando os miRNAs que são exclusivos em cada comparação (descritos ao lado de cada círculo), assim como os comuns, nas intersecções (descritos dentro da caixa de texto apontadas pela seta). A) Soro B) LCR.



7. DISCUSSÃO

Até o ano de 2018, estima-se que serão gastos mundialmente cerca de 1 trilhão de dólares nos cuidados relativos aos casos de demência (Martin *et al.*, 2015). Embora haja grande esforço da comunidade científica, até o momento não existem biomarcadores capazes de identificar processos neurodegenerativos em seu estágio inicial (antes da perda massiva de neurônios), tão pouco capazes de diferenciar, em vida, os tipos de síndromes demenciais mais comuns, como é o caso da DA, DCL e DPD, restando somente o diagnóstico clínico como alternativa. Neste sentido, o presente trabalho propôs a identificação de perfis de miRNAs circulantes que sirvam como biomarcadores, auxiliando no diagnóstico das diferentes demências, por meio da coleta de sangue e LCR.

Foram coletadas amostras de soro e LCR, do mesmo paciente, diagnosticados com algum tipo de síndrome demencial (DA, DCL ou DPD), assim como soro de idosos cognitivamente saudáveis e LCR de indivíduos com HPN. Após o sequenciamento de todas as amostras e das análises de expressão diferencial entre casos e controles, foram identificados os seguintes perfis de miRNAs a) soro: 7 miRNAs desregulados no grupo DA, 10 em DCL e 6 em DPD (tabela 6) e b) LCR: 2 miRNAs diferencialmente expressos em DA, 8 em DCL e 4 em DPD (tabela 7). A maioria dos miRNAs (70%) foram identificados como mais expressos nos dois fluidos corporais.

O LCR é continuamente produzido pelo plexo coroide e banha tanto os ventrículos e superfície cerebrais, quanto a medula espinhal, sendo continuamente absorvido pelo sistema venoso. Este fluido biológico é capaz de refletir as mudanças que ocorrem no cérebro advindas de processos patológicos. Por este motivo, é uma boa escolha para a busca de biomarcadores em doenças neurodegenerativas (Mattsson, 2011). Alguns pesquisadores também já buscaram a identificação de miRNAs diferencialmente expressos no LCR de pacientes com DA, comparado a controles (Cogswell *et al.*, 2008; Sala Frigerio *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Kiko *et al.*, 2014; Burgos *et al.*, 2014; Denk *et al.*, 2015). No entanto, em nenhum deles os miRNAs encontrados como mais expressos neste estudo, miR-376c-3p (p=0,0075) e miR-15a-5p (p=0,041) (tabela 7), foram vistos com expressão diferencial. Apesar de, até o momento, o miR-376c-3p não ter sido detectado em cérebros de pacientes com DA, este miRNA foi predito como modulador de vários genes, atuando em 5 vias relacionadas ao sistema nervoso (tabela 9), entre eles os genes: *ATG12*, relacionado à autofagia em neurônios (Pla *et al.*, 2016), *SMAD4*, envolvido na expressão gênica e ativação da proteína APP (Burton *et al.*,

2002; Docagne *et al.,* 2004) e *HIF1A*, relacionado à neurodegeneração (Jiang *et al.*, 2012), indicando seu possível papel da patogênese da DA. Por outro lado, o papel do miR-15a-5p na DA já foi bem estabelecido em diversos trabalhos. Este miRNA já foi descrito como mais expresso em soro (Cheng *et al.,* 2015) e plasma (Bekris *et al.,* 2013) de pacientes com DA, comparado aos controles, e possui como um de seus alvos o gene *BACE1*, responsável pela clivagem da proteína APP (Hébert *et al.*, 2008). Além disso, a concentração plasmática do miR-15a-5p já foi vista como correlacionada positivamente com o escore de placas senis, no hipocampo de pacientes com DA (Bekris *et al.,* 2013).

Até o momento, não existem registros na literatura de pesquisadores que investigaram perfis de miRNAs circulantes diferencialmente expressos em LCR de pacientes com DCL e DPD comparado a controles, ou seja, os resultados encontrados neste estudo são totalmente inéditos (tabela 7). Hébert e colaboradores (2013) avaliaram por NGS o perfil de miRNAs diferencialmente expressos no neocórtex de pacientes diagnosticados, *post-mortem,* com várias doenças neurodegenerativas, incluindo 4 indivíduos com DCL (Hébert *el al.,* 2013). Todos os 8 miRNAs (miR-454-3p, miR-423-5p, miR-199a-5p, miR-423-3p, miR-193b-5p, miR-221-5p, miR-374b-5p, miR-150-5p) vistos como diferencialmente expressos em DCL (tabela 7) foram detectados no trabalho de Hébert e colaboradores (2013), aumentando a confiabilidade dos nossos resultados.

Apesar de não existirem trabalhos específicos para DPD em fluidos corporais, dois trabalhos já avaliaram miRNAs diferencialmente expressos no LCR de pacientes com DP (Burgos *et al.,* 2014; Gui *et al.,* 2015) e, ao todo, foram encontrados 42 miRNAs desregulados. Mesmo que os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos para DPD neste estudo (miR-199a-5p, miR-106b-5p, miR-141-3p e miR-454-3p) (tabela 7) não tenham sido observados previamente neste estudo com LCR, todos já foram detectados no córtex pré-frontal de indivíduos com DP (Hoss et al., 2016).

O número de pesquisadores que buscam identificar perfis de miRNAs como novos biomarcadores no sangue de pacientes *versus* controles é muito maior, comparado com o número encontrado para o LCR. Isto porque, embora o LCR reflita mais diretamente o que ocorre em doenças que atingem o cérebro, a coleta do LCR é considerada um procedimento extremamente invasivo, em relação à simples coleta de sangue. No entanto, vale ressaltar que os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos no sangue de pacientes devem ser avaliados com cuidado, pois não é incomum que alguns deles possam estar relacionados a outros processos patológicos originados em outros órgãos, que não o cérebro (Sheinerman *et al.,* 2013).

Dos 7 miRNAs encontrados como diferencialmente expressos no soro de pacientes com DA (tabela 6), 6 deles (miR-342-3p, miR-29b-2-5p, miR-10a-5p, miR-125a-5p, miR-708-5p, miR-340-3p) já foram vistos também como desregulados em outros trabalhos que incluíam soro, plasma, sangue total, LCR ou cérebro como material biológico (Denk *et al.,* 2015; Lau et al., 2013; Leidinger et al., 2013; Cheng et al., 2015; Tan et al., 2014).

O miR-10a-5p, mais expresso em soro de DA comparado ao soro do grupo de idosos cognitivamente saudáveis (FC = 7,23 e p = 0,0042) (tabela 6), já havia sido descrito como menos expresso em LCR (Alexandrov *et al.*, 2012). Além disso, Burgos e colaboradores (2014) correlacionaram a diminuição da expressão do miR-10a-5p no soro com o aumento das NFTs em cérebros autopsiados de DA, ou seja, quanto maior o grau da doença, menores os níveis deste miRNA no soro (Burgos *et al.,* 2014). Uma vez que todas as amostras dos pacientes com DA utilizados neste estudo foram coletadas em CDR 2 (nível intermediário da doença), não foi possível verificar se esta tendência (diminuição da expressão) iria se replicar em nossos resultados. Uma das alternativas seria incluir na fase de validação pacientes com soro coletados em CDR 3. Outro achado relevante que diz respeito ao miR-10a-5p, é que este miRNA foi predito como modulador do gene *DVL1*, atuante na via de sinalização Notch, enriquecida para os miRNAs diferencialmente expressos no soro de DA (tabela 8). O gene *DVL1* foi visto como exercendo um papel importante na fosforilação da proteína tau (Russ *et al.*, 2002), principal componente das NFTs. Deste modo, sustenta a relação encontrada por Burgos e colaboradores (2014) entre a diminuição dos níveis séricos do miR-10a-5p e a maior concentração de NFTs no cérebro de indivíduos com DA (Burgos *et al.,* 2014).

Da mesma forma que para o LCR, não existem precedentes na literatura de pesquisadores que avaliaram o perfil de miRNAs diferencialmente expresso em soro de DCL e DPD, comparado a controles cognitivamente saudáveis.

Foram identificados 10 miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes com DCL (tabela 6). De todos eles, somente o miR-452-5p (FC=62,5 p= 0,000034) não foi detectado previamente em cérebro de pacientes com DCL, conforme trabalho anteriormente descrito (Hébert *et al.*, 2013). Apesar deste miRNA não ter sido ainda relacionado a nenhuma demência, o miR-452-5p já foi descrito como mais expresso no córtex pré-frontal de pacientes com doença de Huntington e, deste modo, pode desempenhar algum papel na neurodegeneração (Hoss *et al.,* 2015).

Em relação ao perfil sérico de expressão na DPD, 6 miRNAs foram encontrados como diferencialmente expressos comparado ao grupo controle, sendo 5 deles mais expressos (miR-144-5p, miR-342-3p, miR-708-5p, miR-149-5p, miR-15b-5p) e 1 menos expresso (miR-93-5p) (tabela 6). Alguns pesquisadores avaliaram o perfil de expressão em soro e plasma de pacientes com DP, comparado a controle. No entanto, os resultados de nenhum deles se sobrepuseram aos que foram encontrados deste estudo (Khoo *et al.*, 2012; Cardo *et al.*, 2013; Botta-Orfila *et al.*, 2014; Vallelunga *et al.*, 2014; Fernandez-Santiago *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014; Petillo et al., 2015). Assim como observado para o perfil do LCR, todos os miRNAs do perfil sérico em DPD já foram detectados no córtex pré-frontal de indivíduos com DP, e além disso, o miR-144-5p (FC=18,7, p=0,0005) e miR-15b-5p (FC=3,40, p=0,040), foram vistos como significativamente mais expressos em cérebro de pacientes, comparado a controles (p= 0,0015 e p = 0,01, respectivamente) (Hoss et al., 2016). Outro indício de que o miR-144-5p possa desempenhar algum papel na patogênese da DP é o fato de ele já ter sido predito como regulador dos genes *SNCA*, responsável por codificar a proteína α- sinucleína, e *LRKK2*, conhecido como o principal gene relacionado às formas herdáveis de DP (Heman-Ackah *et al.*, 2013).

Neste estudo, foram detectados 548 miRNAs, considerando LCR e soro, com 219 (cerca de 40%) comuns aos dois fluidos. Todos os perfis de miRNAs diferencialmente expressos do soro e LCR em DA, DCL e DPD em relação aos controles, fazem parte destes 40% de miRNAs comuns. Uma vez que o LCR é separado da corrente sanguínea pela Barreira Hemato-Encefálica (BHE), faria sentido o LCR conter uma assinatura única de miRNAs específica para doenças no SNC. No entanto, existe uma forte evidência de que doenças neurodegenerativas possam causar uma disfunção da BHE, permitindo tanto a entrada de moléculas para o LCR, como a saída delas para a corrente sanguínea, incluindo os miRNAs (Takeda *et al.*, 2014). Isto poderia, em parte, justificar os resultados encontrados.

Poucos pesquisadores descreveram o perfil de miRNAs diferencialmente expressos no LCR e soro/plasma do mesmo paciente (Kiko *et al.*, 2014; Burgos *et al.*, 2014; Sorensen *et al.*, 2016), e embora todos os miRNAs desregulados neste trabalho tenham sido detectados em ambos os fluidos, o perfil de expressão diferencial entre casos e controles no soro e LCR variou consideravelmente. Foram encontrados 23 miRNAs diferencialmente expressos no soro de pacientes (nos 3 grupos) (tabela 6) e 14 no LCR (tabela 7), e somente o miR-106b-5p foi visto como diferencialmente expresso em ambos os fluidos (menos expresso em soro de DCL e mais expresso em LCR de DPD).

Considerando um mesmo grupo (por exemplo: DA x CTRL_CS e DA x CTRL_HPN), não houve sobreposição de nenhum miRNA diferencialmente expresso, evidenciando que, muito embora os miRNAs identificados possam ser comuns ao soro e ao LCR, suas concentrações se alteram de forma diferente na presença da patologia, formando 2 perfis distintos de miRNA desregulados. O mesmo foi observado por Burgos e colaboradores (2014), em que somente 2 miRNAs diferencialmente expressos estavam sobrepostos nos perfis de soro e LCR de DA, e nenhum sobreposto entre soro e LCR de DP (Burgos *et al.*, 2014). Ou seja, ambos os fluidos apresentam perfis de miRNAs diferencialmente expressos em pacientes e controles que podem ser considerados na busca de potenciais biomarcadores, no entanto, a escolha do soro ou do LCR para novas pesquisas deve ser avaliada caso a caso, já que ambos os fluidos apresentam vantagens e desvantagens.

O fato de as vias enriquecidas para os perfis de miRNAs do soro e LCR terem sido muito similares (tabelas 8 e 9), apoia a hipótese de que os perfis de miRNAs encontrados como diferencialmente expressos podem estar, de fato, relacionados aos processos de neurodegeneração. Isto é especialmente relevante para o perfil sérico, uma vez que este fluido biológico pode apresentar miRNAs provenientes de vários órgãos e desregulados devido a diversos processos patológicos. Foram encontradas 13 vias comuns ao soro e LCR: interação Matrix Extra Celular (MEC) - receptor, proteólise mediada pela ubiquitina, doenças de Prion, direcionamento de axônios, junções gap e vias de sinalização MAPK, TGF-beta, Wnt, FoxO, mTOR, de neurotrofinas, PI3K-Akt e AMPK, sendo todas elas já previamente relacionadas a uma ou mais doenças neurodegenerativas (Tesseur e Wyss-Coray, 2006; Manolopoulos *et al.*, 2010; Munoz e Ammit, 2010; Hegde e Sudarshan, 2011; Rajapaksha *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2011; Takeuchi et al., 2011; Soto e Satani, 2012; Upadhya e Reddy, 2012; Weissmiller *et al.*, 2012; Arenas, 2014; Wang *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2015).

Os miRNAs miR-342-3p e miR-708-5p foram vistos como mais expressos no soro em todos os grupos de pacientes (DA, DCL e DPD), comparados aos controles (figura 16A, tabela 6). Além disso, o miR-708 está mais expresso em soro de DA e DCL comparado ao LCR do mesmo grupo, e o miR-342-3p mais expresso em soro, comparado ao LCR no grupo DA (apêndice 2 – tabela 1). Estes dois miRNAs também foram vistos como participando de todas as vias descritas acima como envolvidas em doenças neurodegenerativas, controlando dezenas de genes em cada uma delas. Sendo assim, a partir destas análises é possível sugerir que estes dois miRNAs possam ser úteis para

diferenciar, a partir da coleta de sangue, idosos com alguma doença neurodegenerativa em curso, daqueles com processos de envelhecimento normal.

A partir das análises conjuntas dos perfis de miRNAs no soro e LCR de pacientes *versus* controles, de vias moleculares relacionadas e das comparações entre os grupos realizadas a partir dos diagramas de Venn, foi possível propor alguns miRNAs capazes de auxiliar não somente no diagnóstico de pacientes em relação aos controles, mas também no diagnóstico diferencial entre as demências.

O miR-125a-5p foi visto como mais expresso em soro de DA, independente do grupo utilizado como referência, CTRL_CS (FC = 4,06, p=0,042, tabela 6), DCL (FC= 3,12 p=0,021, tabela 10) e DPD (FC = 4,19 p=0,00076, tabela 10) (Figura 17A), e também mais expresso em relação ao LCR (FC = 3,66, p= 0,00018, apêndice 2- tabela1). Da mesma forma, o miR-380-5p está menos expresso em DA, independente do grupo referência CTRL_CS (FC = 0,12, p= 0,043, tabela 6), DCL (FC = 0,04, p = 0,00053, tabela 10) e DPD (FC = 0,039, p= 0,0184, tabela 10). O miR-29b-2-5p está mais expresso no soro de DA em relação ao grupo controle (FC=28,3, p=0,00009, tabela 6) e embora não esteja diferencialmente expresso em relação a DCL, está muito mais expresso em DA em relação ao grupo DPD (FC= 560,03, $p=1,10x10^{-11}$).

Os miRNAs miR-125a-5p e miR-29b-2-5p participam da via de sinalização Notch (tabela 8) predita exclusivamente para o perfil sérico dos miRNAs em DA, controlando os genes *LFNG* (miR-125a-5p), *PSEN2* (miR-29b-2-5p) e *ADAM17* (miR-125a-5p e miR-29b-2-5p). Embora a via de sinalização Notch seja frequentemente considerada como uma via importante do desenvolvimento, seus componentes estão expressos e ativos no cérebro de adultos (Ables *et al.*, 2011). A clivagem pela enzima γ-secretase, codificada pelo gene *PSEN2* e potencialmente regulado pelo miR-29b-2-5p, é comum à via de sinalização Notch e ao processamento da proteína APP, que origina os peptídeos β-amiloides neurotóxicos (Berezovska *et al.*, 1998).

O gene *ADAM17*, visto como regulado pelos miRNAs miR-125a-5p e miR-29b-2-5p, codifica para a enzima ADAM17 de 70-kDa pertencente à família ADAM de metaloproteinases. Este gene também já foi intimamente relacionado à patogênese da DA (Qian *et al.*, 2016). A clivagem mais comum da APP é denominada de via não-amiloidogênica, realizada pela α-secretase, a qual corta em uma região que possibilita a liberação de toda a porção extracelular, denominada de APPs (Figura 3) (Hardy et al., 1992; Grace et al., 2002; Cole et al., 2007). A ADAM17 foi proposta como reguladora da produção da fração solúvel α-secretase, e o aumento de sua atividade ocasiona não

somente o aumento da produção de α-secretase, como também a diminuição da produção dos peptídeos β-amiloides, o que poderia ser benéfico para pacientes com DA (Postina, 2012). Embora o miR-380-5p não tenha sido previamente relacionado a DA, ele participa de mais da metade das vias enriquecidas para o perfil sérico (tabela 8) e pode, portanto, exercer algum papel na patogênese da doença.

Sendo assim, uma vez que os miRNAs miR-125a-5p, miR-380-5p e miR-29b-2-5p estão diferencialmente expressos na DA, em relação tanto ao grupo controle, quanto a uma ou mais demências, e já foram previamente relacionados às vias desreguladas na doença, estes três miRNAs poderiam ser considerados como candidatos para auxiliar no diagnóstico diferencial da DA, em relação às sinucleinopatias DCL e DPD, por meio da coleta e análise de sangue.

Do ponto de vista do diagnóstico diferencial, as sinucleinopatias, DCL e DPD são as mais difíceis de distinguir. Isto porque existe a sobreposição de sinais clínicos e neuropatológicos, assim como das vias moleculares alteradas (Irwin et al., 2013). A partir da análise da Figura 20A foi possível identificar 6 miRNAs séricos com expressão diferencial entre DCL x CTRL_CS (tabela 6) e DCL x DPD (tabela 10) simultaneamente, sendo 3 deles mais expressos: miR-30c-5p, miR-30d-5p e miR-30e-5p e 3 menos expressos: miR-106b-5p, miR-152-3p e miR-31-5p, que poderiam ser potenciais candidatos para o diagnóstico diferencial da DCL em relação a DPD. Além disso, também foram identificados 3 miRNAs (miR−423−5p, miR-193b-5p e miR-221-5p) como potenciais marcadores da DCL no LCR (Figura 20B), sempre mais expressos em DCL nas comparações DCL x CTRL_HPN e DCL x DPD. Por outro lado, somente o miR-15b-5p se mostrou mais expresso em soro de DPD, quando comparado ao grupo controle (tabela 6), e a DCL (tabela 10).

Apesar de bastante promissores, os miRNAs encontrados nos diferentes perfis para DA, DCL e DPD, ainda precisam ser validados com um maior número amostral e uma técnica de detecção mais sensível. Está prevista para a próxima etapa deste estudo a inclusão de 120 amostras de soro, sendo 85 amostras de DA, 16 de DCL, 7 de DPD e 12 CTRL_CS, e 51 amostras de LCR, sendo 33 de DA, 4 de DCL e 7 de CTRL_HPN. Caso novas amostras sejam coletadas, elas poderão compor os grupos amostrais nesta fase de validação. Serão realizados ensaios individuais para cada miRNA (o número de miRNAs para cada grupo ainda será determinado), por meio da metodologia RT-qPCR.

Não é possível deixar de mencionar que, embora os miRNAs circulantes sejam bons candidatos a biomarcadores, a replicação entre os estudos ainda é relativamente

baixa, com pouca sobreposição dos miRNAs encontrados como diferencialmente expressos em um mesmo fluido e em uma mesma doença (Witwer, 2015). São diversas as razões por trás destes resultados, entre elas é possível pontuar: a falta de homogeneidade em relação à população do estudo, idade, etnia, estágios da doença, grupo controle, além de diferenças nos métodos de detecção e processamento dos dados (Mestdagh *et al.*, 2014; Satoh *et al.*, 2015). Keller e colaboradores (2016) a partir da utilização do mesmo método de extração, detecção e análises, conseguiram obter a sobreposição significativa (p=0,0003) de 68 miRNAs diferencialmente expressos em dois estudos subsequentes, utilizando coortes provenientes dos EUA e Alemanha, respectivamente (Leidinger *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2016).

Em conclusão é possível dizer que, embora ainda sejam necessárias padronizações acerca de métodos e análises para garantir reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade, os miRNAs circulantes podem ser considerados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico das diferentes síndromes demenciais, entre elas a DA, DCL e DPD, a fim de garantir manejo adequado e melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

8. CONCLUSÕES

- A partir dos resultados de miRNA-Seq foi possível identificar diferentes perfis de miRNAs circulantes desregulados em pacientes com alguma síndrome demencial, DA, DCL ou DPD em relação ao grupo controle, a partir da coleta de soro e LCR.

- Embora exista sobreposição dos miRNAs detectados em soro e LCR, os perfis de miRNAs diferencialmente expressos em soro de pacientes com DA, DCL ou DPD, em relação ao grupo controle, são distintos dos perfis encontrados em LCR.

- As vias moleculares enriquecidas para os perfis de miRNAs desregulados do soro e LCR foram muito similares e já previamente envolvidas com doenças neurodegenerativas, sugerindo a participação destes miRNAs nos processos neurodegenerativos.

- Os miRNAs miR-342-3p e miR-708-5p estavam mais expressos no soro em todos os grupos de pacientes (DA, DCL e DPD), comparado aos controles cognitivamente saudáveis e, portanto, podem ser sugeridos como possíveis marcadores de neurodegeneração no soro.

- Os miRNAs miR-125a-5p, miR-380-5p e miR-29b-2-5p foram diferencialmente expressos no soro do grupo DA em relação aos controles e à uma ou mais demências e, por este motivo, poderiam auxiliar no diagnóstico diferencial da DA em relação às sinucleinopatias, DCL e/ou DPD, a partir da coleta de soro.

- Os miRNAs miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-106b-5p, miR-152-3p e miR-31-5p no soro e miR−423−5p, miR-193b-5p e miR-221-5p no LCR foram vistos como diferencialmente expressos em DCL em relação ao grupo controle e à DPD, e poderiam auxiliar no diagnóstico diferencial entre as sinucleinopatias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D.; BALLARD, C.; MCKEITH, I.; PERRY, R. H.;LARSEN, J. P. Comparison of extrapyramidal signs in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**,v.13, n. 3, p. 374-379, 2001.

AARSLAND, D.; PERRY, R.; LARSEN, J. P.; MCKEITH, I. G.; O'BRIEN, J. T., et al. Neuroleptic sensitivity in Parkinson's disease and parkinsonian dementias. **J Clin Psychiatry**,v.66, n. 5, p. 633-637, 2005.

AARSLAND, D.; ZACCAI, J.; BRAYNE, C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. **Movement Disorders,** 2005.

ABE, M.;BONINI, N. M. MicroRNAs and neurodegeneration: role and impact. **Trends Cell Biol**,v.23, n. 1, p. 30-36, 2013.

ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARINAS, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W. H., et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**,v.25, n. 1, p. 239-252, 2000.

ABLES, J. L.; BREUNIG, J. J.; EISCH, A. J.; RAKIC, P. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. Nature reviews. **Neuroscience**, v. 12, n. 5, p. 269–83, 2011.

ALAGIAKRISHNAN, K.; GILL, S. S.; FAGARASANU, A. Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 88, n. 1043, p. 522–529, 2012.

ALEXANDROV, P. N.; DUA, P.; HILL, J. M.; BHATTACHARJEE, S.; ZHAO, Y.;LUKIW, W. J. microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). **Int J Biochem Mol Biol**,v.3, n. 4, p. 365-373, 2012.

ALLEGRI, R. F.; HARRIS, P.; SERRANO, C.;DELAVALD, N. Perfis diferenciais de perda de memoria entre a demencia frontotemporal e a do tipo Alzheimer. **Psicologia: reflexao e crítica**,v.14, n. 2, p. 317-324, 2001.

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.;CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutat Res**,v.717, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

ALUISE, C. D.; SOWELL, R. A.;BUTTERFIELD, D. A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**,v.1782, n. 10, p. 549-558, 2008.

AlzGene. http://www.alzgene.org/. Acesso em: Março/2013

ALZHEIMER, A. Uber eigenartige Krankheitsfalle des spateren Alters Zeitscrift fur die Gesamte Neurologie und Psychiatrie v.4, n. 356–385, 1911.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimer's & Dementia 2016.

ANOOP, A.; SINGH, P. K.; JACOB, R. S.;MAJI, S. K. CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. **Int J Alzheimers Dis**,v.2010, n. 2010.

APA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders (DSM-5). 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ARENAS, E. Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease**. Journal of molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 42–53, 2014.

ARSLAND, D.; ANDERSEN, K.; LARSEN, J. P.; LOLK, A.; KRAGH-SORENSEN, P. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. **Archives of neurology**, v. 60, n. 3, p. 387–392, 2003.

AUNING, E.; RONGVE, A.; FLADBY, T.; BOOIJ, J.; HORTOBAGYI, T., et al. Early and presenting symptoms of dementia with lewy bodies. **Dement Geriatr Cogn Disord**,v.32, n. 3, p. 202-208, 2011.

AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome medicine**, v. 1, n. 3, p. 34, 2009.

BAEK, D.; VILLEN, J.; SHIN, C.; CAMARGO, F. D.; GYGI, S. P.;BARTEL, D. P. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**,v.455, n. 7209, p. 64-71, 2008.

BARBER, R.; PANIKKAR, A.;MCKEITH, I. G. Dementia with Lewy bodies: diagnosis and management. **Int J Geriatr Psychiatry**,v.16 Suppl 1, n. S12-18, 2001.

BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Movement disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006.

BARBOSA, M. T.;CARAMELLI, P. Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? **Revista Brasileira de Psiquiatria**,v.24, n. 7-10, p. 2002.

BARNES, J.; WHITWELL, J. L.; FROST, C.; JOSEPHS, K. A.; ROSSOR, M.;FOX, N. C. Measurements of the amygdala and hippocampus in pathologically confirmed Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. **Arch Neurol**,v.63, n. 10, p. 1434-1439, 2006.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**,v.116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BARTUREN, G.; RUEDA, A.; HAMBERG, M.; et al. sRNAbench: profiling of small RNAs and its sequence variants in single or multi-species high-throughput experiments. **Methods in Next Generation Sequencing**, v. 1, n. 1, 2014.

BARTUS, R. T.; DEAN, R. L., 3RD; BEER, B.;LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**,v.217, n. 4558, p. 408-414, 1982.

BAUMANN, N.;PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev,v.81, n. 2, p. 871-927, 2001.

BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in bioscience** (Scholar edition), v. 6, p. 65–74, 2014.

BEKRIS, L. M.; LUTZ, F.; MONTINE, T. J.; et al. MicroRNA in Alzheimer's disease: an exploratory study in brain, cerebrospinal fluid and plasma. **Biomarkers**,v. 18, n. 5, p. 455–66, 2013.

BENEDETTI, T. B.; BORGES, L. J.; PETROSKI, E. L.;GONÇALVES, L. H. T. Atividade física e estado de saúde mental de idosos. **Revista de Saúde Pública**,v.42, n. 2, p. 1-6, 2008.

BEREZOVSKA, O.; XIA, M. Q.; HYMAN, B. T. Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 57, n. 8, p. 738–45, 1998.

BERGSNEIDER, M.; BLACK, P. M.; KLINGE, P.; MARMAROU, A.; RELKIN, N. Surgical management of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. **Neurosurgery**, v. 57, n. 3 Suppl, p. S29–39; discussion ii–v, 2005.

BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 270–281, 2010.

BLENNOW, K.; HAMPEL, H.; WEINER, M.;ZETTERBERG, H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat Rev **Neurol**,v.6, n. 3, p. 131-144, 2010.

BLENNOW, K.;HAMPEL, H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. Lancet **Neurol**,v.2, n. 10, p. 605-613, 2003.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.;DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**,v.13, n. 12, p. 1097-1101, 2006.

BOTTA-ORFILA, T.; MORATÓ, X.; COMPTA, Y.; et al. Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 92, n. 8, p. 1071–7, 2014.

BOTTINO, C. M.; AZEVEDO, D., JR.; TATSCH, M.; HOTOTIAN, S. R.; MOSCOSO, M. A., et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from Sao Paulo, Brazil. **Dement Geriatr Cogn Disord**,v.26, n. 4, p. 291-299, 2008.

BRAAK, H.; RUB, U.; JANSEN STEUR, E. N. H.; TREDICI, K. DEL; VOS, R. A. I. DE. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, n. 8, p. 1404–1410, 2005.

BRAYNE, C.; MCCRACKEN, C.;MATTHEWS, F. E. Cohort profile: the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (CFAS). **Int J Epidemiol**,v.35, n. 5, p. 1140-1145, 2006.

BRUCKI, S. M. D.; MAGALDI, R. M.; MORILLO, L. S.; CARVALHO, I.; PERROCO, T. R., et al. Demências - Enfoque Multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento. São Paulo: Atheneu, 2011.

BURGOS, K.; MALENICA, I.; METPALLY, R.; 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.

BURGOS, K.L.; JAVAHERIAN, A.; BOMPREZZI, R; GHAFFARI, L; RHODES, s.; COURTRIGHT, A.; TEMBE, W.; KIM, S.; METPALLY, R.; VAN KEUREN-JENSEN, K. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. **RNA**, v.19, p. 712–722, 2013.

BURLÁ, C.; CAMARANO, A. A.; KANSO, S.; FERNANDES, D.; NUNES, R. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949–2956, 2013.

BURTON, T.; LIANG, B.; DIBROV, A.; AMARA, F. Transforming growth factor-beta-induced transcription of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein gene involves interaction between the CTCF-complex and Smads. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 295, n. 3, p. 713–23, 2002.

BUSHATI, N.;COHEN, S. M. microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol**,v.23, n. 175-205, 2007.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.T. The MIQE Guidelines -- Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clin Chem,** v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAI, X.; HAGEDORN, C. H.;CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA,v.10, n. 12, p. 1957-1966, 2004.

CAIXETA, L.; VIEIRA, R. T. Dementia in Parkinson's disease. **Revista brasileira de psiquiatria**,v. 30, n. 4, p. 375–83, 2008.

CARDO, L. F.; COTO, E.; MENA, L. DE; et al. Profile of microRNAs in the plasma of Parkinson's disease patients and healthy controls. **Journal of neurology**, v. 260, n. 5, p. 1420–2, 2013.

CARVALHO, A. D. M.;COUTINHO, E. D. S. F. Demência como fator de risco para fraturas graves em idosos **Revista de Saúde Pública**,v.36, n. 4, p. 448-454, 2002.

CHAVES, M. L. F. Diagnóstico diferencial das doenças demenciantes. In: O. V. FORLENZA & P. CARAMELLI. **Neuropsiquiatria Geriátrica**. Atheneu, 2000.

CHENG, L.; DOECKE, J. D.; SHARPLES, R. A.; et al. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with

neuropsychological and neuroimaging assessment. **Molecular psychiatry**, v. 20, n. 10, p. 1188–96, 2015.

COGSWELL, J. P.; WARD, J.; TAYLOR, I. A.; et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 14, n. 1, p. 27–41, 2008.

COLE, S. L.;VASSAR, R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. Mol **Neurodegener**,v.2, n. 22, 2007.

COLLOBY, S. J.; FENWICK, J. D.; WILLIAMS, E. D.; PALING, S. M.; LOBOTESIS, K., et al. A comparison of (99m)Tc-HMPAO SPET changes in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease using statistical parametric mapping. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**,v.29, n. 5, p. 615-622, 2002.

COMAR, M.; D'AGARO, P.; CAMPELLO, C.; POLI, A.; BREINHOLT, J. P., 3RD, et al. Human herpes virus 6 in archival cardiac tissues from children with idiopathic dilated cardiomyopathy or congenital heart disease. **J Clin Pathol**,v.62, n. 1, p. 80-83, 2009.

COMPTA, Y.; PARKKINEN, L.; O'SULLIVAN, S. S.; et al. Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? **Brain : a journal of neurology**, v. 134, n. Pt 5, p. 1493–1505, 2011.

COOKSON, M. R. alpha-Synuclein and neuronal cell death. **Molecular neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 9, 2009.

COOLEN, M.;BALLY-CUIF, L. MicroRNAs in brain development and physiology. **Curr Opin Neurobiol**,v.19, n. 5, p. 461-470, 2009.

CORRADA, M. M.; BROOKMEYER, R.; PAGANINI-HILL, A.; BERLAU, D.; KAWAS, C. H. Dementia incidence continues to increase with age in the oldest old: The 90+ study. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 1, p. 114–121, 2010.

CRAIG-SCHAPIRO, R.; FAGAN, A. M.;HOLTZMAN, D. M. Biomarkers of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**,v.35, n. 2, p. 128-140, 2009.

DELALOY, C.; LIU, L.; LEE, J. A.; SU, H.; SHEN, F., et al. MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. **Cell Stem Cell**,v.6, n. 4, p. 323-335, 2010.

DELAY, C.; CALON, F.; MATHEWS, P.;HEBERT, S. S. Alzheimer-specific variants in the 3'UTR of Amyloid precursor protein affect microRNA function. **Mol Neurodegener**,v.6, n. 70, 2011.

DENK, J.; BOELMANS, K.; SIEGISMUND, C.; et al. MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer`s Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126423, 2015.

DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.;GREEN, R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. **Science**,v.331, n. 6017, p. 550-553, 2011.

DOCAGNE, F.; GABRIEL, C.; LEBEURRIER, N.; et al. Sp1 and Smad transcription factors co-operate to mediate TGF-beta-dependent activation of amyloid-beta precursor protein gene transcription. **The Biochemical journal**, v. 383, n. Pt 2, p. 393–9, 2004.

DONG, S.; DUAN, Y.; HU, Y.;ZHAO, Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. **Transl Neurodegener**,v.1, n. 1, p. 18, 2012.

DUGAS, J. C.; CUELLAR, T. L.; SCHOLZE, A.; ASON, B.; IBRAHIM, A., et al. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. **Neuron**,v.65, n. 5, p. 597-611, 2010.

EACKER, S. M.; DAWSON, T. M.;DAWSON, V. L. Understanding microRNAs in neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**,v.10, n. 12, p. 837-841, 2009.

EMRE, M.; AARSLAND, D.; BROWN, R.; et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 22, n. 12, p. 1689–707; quiz 1837, 2007.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.;VALE, F. A. C. Tratamento da doença de alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**,v.63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

ENGELS, B. M.;HUTVAGNER, G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. **Oncogene**,v.25, n. 46, p. 6163-6169, 2006.

ETHERIDGE, A.; LEE, I.; HOOD, L.; GALAS, D.;WANG, K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. **Mutat Res**,v.717, n. 1-2, p. 85-90, 2011.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.;FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs**. Annu Rev Biochem**,v.79, n. 351-379, 2010.

FACTORA, R. When do common symptoms indicate normal pressure hydrocephalus? **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 73, n. 5, p. 447–50, 452, 455–6 passim, 2006.

FELEKKIS, K.; TOUVANA, E.; STEFANOU, C.;DELTAS, C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. **Hippokratia**,v.14, n. 4, p. 236-240, 2010.

FENG, W.;FENG, Y. MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. **Sci China Life Sci**,v.54, n. 12, p. 1103-1112, 2011.

FERNÁNDEZ-SANTIAGO, R.; IRANZO, A.; GAIG, C.; et al. MicroRNA association with synucleinopathy conversion in rapid eye movement behavior disorder. **Annals of neurology**, v. 77, n. 5, p. 895–901, 2015.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.;SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**,v.9, n. 2, p. 102-114, 2008.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.;MCHUGH, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psychiatr Res**,v.12, n. 3, p. 189-198, 1975.

FORNARI, L. H. T.; GARCIA, L. P.; HILBIG, A.;FERNANDEZ, L. L. As diversas faces da síndrome demencial: como diagnosticar clinicamente?. **Scientia Medica** v.20, n. 2, p. 185-193, 2010.

FRISONI, G. B. Structural imaging in the clinical diagnosis of Alzheimer's disease: problems and tools. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**,v.70, n. 6, p. 711-718, 2001.

FUJIWARA, H.; HASEGAWA, M.; DOHMAE, N.; KAWASHIMA, A.; MASLIAH, E., et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. **Nat Cell Biol**,v.4, n. 2, p. 160-164, 2002.

GALLIA, G. L.; RIGAMONTI, D.; WILLIAMS, M. A. The diagnosis and treatment of idiopathic normal pressure hydrocephalus. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 7, p. 375–381, 2006.

GALLUCCI-NETO, J.; TAMELINI, M. G.;FORLENZA, O. V. Diagnóstico diferencial das demências. **Revista de Psiquiatria Clínica**,v.32, n. 119-130, 2005.

GARCIA-PTACEK, S.; KRAMBERGER, M. G. Parkinson Disease and Dementia. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 29, n. 5, p. 261–70, 2016.

GEEKIYANAGE, H.; JICHA, G. A.; NELSON, P. T.;CHAN, C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. **Exp Neurol**,v.235, n. 2, p. 491-496, 2012.

GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nat Rev **Neurosci**,v.2, n. 7, p. 492-501, 2001.

GOUVEIA, E.J. As alterações cognitivas na Doença de Parkinson: Défice Cognitivo, Demência e Aspectos Neuropsiquiátricos Associados.130 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Anterior, 2008.

GRACE, E. A.; RABINER, C. A.;BUSCIGLIO, J. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease. **Neuroscience**,v.114, n. 1, p. 265-273, 2002.

GUERREIRO, R.; ESCOTT-PRICE, V.; DARWENT, L.; et al. Genome-wide analysis of genetic correlation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of aging**, v. 38, p. 214.e7–10, 2016.

GUI, Y.; LIU, H.; ZHANG, L.; LV, W.; HU, X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, 2015.

HAMILTON, J. M.; SALMON, D. P.; GALASKO, D.; DELIS, D. C.; HANSEN, L. A., et al. A comparison of episodic memory deficits in neuropathologically-confirmed

Dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. **J Int Neuropsychol Soc**,v.10, n. 5, p. 689-697, 2004.

HAN, L.; COLE, M.; BELLAVANCE, F.; MCCUSKER, J.;PRIMEAU, F. Tracking cognitive decline in Alzheimer's disease using the mini-mental state examination: a meta-analysis. **Int Psychogeriatr**,v.12, n. 2, p. 231-247, 2000.

HARDING, A. J.; BROE, G. A.;HALLIDAY, G. M. Visual hallucinations in Lewy body disease relate to Lewy bodies in the temporal lobe. **Brain**,v.125, n. Pt 2, p. 391-403, 2002.

HARDY, J. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? **Proc Natl Acad Sci U S A**,v.94, n. 6, p. 2095-2097, 1997.

HARDY, J.;HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**,v.256, n. 5054, p. 184-185, 1992.

HEBB, A. O.; CUSIMANO, M. D. Idiopathic normal pressure hydrocephalus: a systematic review of diagnosis and outcome. **Neurosurgery**, v. 49, n. 5, p. 1166–84; discussion 1184–6, 2001.

HÉBERT, S. S.; HORRÉ, K.; NICOLAÏ, L.; et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer’s disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 17, p. 6415–20, 2008.

HEBERT, S. S.; PAPADOPOULOU, A. S.; SMITH, P.; GALAS, M. C.; PLANEL, E., et al. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. **Hum Mol Genet**,v.19, n. 20, p. 3959-3969, 2010.

HÉBERT, S. S.; WANG, W.-X.; ZHU, Q.; NELSON, P. T. A study of small RNAs from cerebral neocortex of pathology-verified Alzheimer’s disease, dementia with lewy bodies, hippocampal sclerosis, frontotemporal lobar dementia, and non-demented human controls. **Journal of Alzheimer’s disease**, v. 35, n. 2, p. 335–48, 2013.

HEGDE, A. N.; UPADHYA, S. C. Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1809, n. 2, p. 128–40, 2011.

HEMAN-ACKAH, S. M.; HALLEGGER, M.; RAO, M. S.; WOOD, M. J. A. RISC in PD: the impact of microRNAs in Parkinson’s disease cellular and molecular pathogenesis. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 6, p. 40, 2013.

HERRERA-JUNIOR, E.; CARAMELLI, P.;NITRINI, R. Estudo epidemiologico populacional de demencia na cidade de Catanduva, estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Psiquiatria Clínica**,v.25, n. 2 p. 70-73, 1998.

HIGUCHI, M.; TASHIRO, M.; ARAI, H.; OKAMURA, N.; HARA, S., et al. Glucose hypometabolism and neuropathological correlates in brains of dementia with Lewy bodies. **Exp Neurol**,v.162, n. 2, p. 247-256, 2000.

HOBSON, P.; MEARA, J. Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom. **Movement disorders**, v. 19, n. 9, p. 1043–1049, 2004.

HOLDORFF, B.; RODRIGUES E SILVA, A. M.;DODEL, R. Centenary of Lewy bodies (1912-2012). **J Neural Transm**,v.120, n. 4, p. 509-516, 2013.

HOSS, A. G.; LABADORF, A.; BEACH, T. G.; LATOURELLE, J. C.; MYERS, R. H. microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, p. 36, 2016.

HOSS, A. G.; LABADORF, A.; LATOURELLE, J. C.; et al. miR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 10, 2015.

HUANG, Y.;HALLIDAY, G. Can we clinically diagnose dementia with Lewy bodies yet? **Transl Neurodegener**,v.2, n. 1, p. 4, 2013.

ION TOTAL RNA-SEQ KIT V2 USER GUIDE. Life Technologies Corporation, 2013. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4476286.pdf. Acesso em: Ago/2014.

IRWIN, D. J.; LEE, V. M.-Y.; TROJANOWSKI, J. Q. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. Nature reviews**.** **Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 626–636, 2013.

IRWIN, D. J.; WHITE, M. T.; TOLEDO, J. B.; et al. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. **Annals of neurology**, v. 72, n. 4, p. 587–598, 2012.

JELLINGER, K. A. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. **Mov Disord**,v.18 Suppl 6, n. S2-12, 2003.

JELLINGER, K. A.; ATTEMS, J. Prevalence and impact of vascular and Alzheimer pathologies in Lewy body disease. **Acta neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 427–36, 2008.

JHA, S. K.; JHA, N. K.; KAR, R.; AMBASTA, R. K.; KUMAR, P. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades inParkinson's Disease. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 4, n. 2, p. 67–86, 2015.

JIANG, H.; HUANG, Y.; XU, H.; et al. Hypoxia inducible factor-1α is involved in the neurodegeneration induced by isoflurane in the brain of neonatal rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 3, p. 453–460, 2012.

JOHNSON, G. V.;STOOTHOFF, W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. **J Cell Sci**,v.117, n. Pt 24, p. 5721-5729, 2004.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KAPAKI, E.; PARASKEVAS, G. P.; ZALONIS, I.;ZOURNAS, C. CSF tau protein and beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease diagnosis: discrimination from normal

ageing and other dementias in the Greek population. **Eur J Neurol**,v.10, n. 2, p. 119-128, 2003.

KELLER, A.; BACKES, C.; HAAS, J.; et al. Validating Alzheimer's disease micro RNAs using next-generation sequencing. **Alzheimer's & dementia**, v. 12, n. 5, p. 565–76, 2016.

KHOO, S. K.; PETILLO, D.; KANG, U. J.; et al. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 2, n. 4, p. 321–31, 2012.

KIKO, T.; NAKAGAWA, K.; TSUDUKI, T.; et al. MicroRNAs in Plasma and Cerebrospinal Fluid as Potential Markers for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, n. 2, p. 253–259, 2014.

KILLIANY, R. J.; GOMEZ-ISLA, T.; MOSS, M.; KIKINIS, R.; SANDOR, T., et al. Use of structural magnetic resonance imaging to predict who will get Alzheimer's disease. **Ann Neurol**,v.47, n. 4, p. 430-439, 2000.

KIRSCHNER, M.B.; EDELMAN, J.B.;. KAO, S. C-H.;.VALLELY, M. P.; VAN ZANDWIJK, N.; REID, G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. **Front Genet**, v. 4, n. 94, p. 1-13, 2013.

KNOPMAN, D. S.; DEKOSKY, S. T.; CUMMINGS, J. L.; CHUI, H.; COREY-BLOOM, J., et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**,v.56, n. 9, p. 1143-1153, 2001.

KÖVARI, E.; GOLD, G.; HERRMANN, F. R.; et al. Lewy body densities in the entorhinal and anterior cingulate cortex predict cognitive deficits in Parkinson's disease. **Acta neuropathologica**, v. 106, n. 1, p. 83–8, 2003.

KROL, J.; LOEDIGE, I.;FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat Rev Genet**,v.11, n. 9, p. 597-610, 2010.

KWAK, P. B.; IWASAKI, S.;TOMARI, Y. The microRNA pathway and cancer. **Cancer Sci**,v.101, n. 11, p. 2309-2315, 2010.

LAKS, J.; BATISTA, E. M.; GUILHERME, E. R.; CONTINO, A. L.; FARIA, M. E., et al. Prevalence of cognitive and functional impairment in community-dwelling elderly: importance of evaluating activities of daily living. **Arq Neuropsiquiatr**,v.63, n. 2A, p. 207-212, 2005.

LAU, L. M. L. DE; SCHIPPER, C. M. A.; HOFMAN, A.; KOUDSTAAL, P. J.; BRETELER, M. M. B. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. **Archives of neurology**, v. 62, n. 8, p. 1265–9, 2005.

LAU, P.; BOSSERS, K.; JANKY, R.; et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1613–1634, 2013.

LAU, P.; VERRIER, J. D.; NIELSEN, J. A.; JOHNSON, K. R.; NOTTERPEK, L.;HUDSON, L. D. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. **J Neurosci**,v.28, n. 45, p. 11720-11730, 2008.

LEBRÃO, M. L.;LAURENTI, R. Saúde, bem-estar e envelhecimento: o estudo SABE no Município de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**,v.8, n. 2, p. 127-141, 2005.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.;AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**,v.75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S., et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**,v.23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEIDINGER, P.; BACKES, C.; DEUTSCHER, S.; et al. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. **Genome biology**, v. 14, n. 7, p. R78, 2013.

LI, H.; RUAN, J.;DURBIN, R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. **Genome Res**,v.18, n. 11, p. 1851-1858, 2008.

LI, R.; YU, C.; LI, Y.; LAM, T. W.; YIU, S. M., et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. **Bioinformatics**,v.25, n. 15, p. 1966-1967, 2009.

LINDSAY, J.; LAURIN, D.; VERREAULT, R.; HEBERT, R.; HELLIWELL, B., et al. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **Am J Epidemiol**,v.156, n. 5, p. 445-453, 2002.

LIPPA, C. F.; JOHNSON, R.;SMITH, T. W. The medial temporal lobe in dementia with Lewy bodies: a comparative study with Alzheimer's disease. **Ann Neurol**,v.43, n. 1, p. 102-106, 1998.

LIU, N. K.;XU, X. M. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders. **Physiol Genomics**,v.43, n. 10, p. 571-580, 2011.

LIU, N.; LANDREH, M.; CAO, K.; ABE, M.; HENDRIKS, G. J., et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila. **Nature**,v.482, n. 7386, p. 519-523, 2012.

LOPES, M. A.; HOTOTIAN, S. R.; BUSTAMANTE, S. E.; AZEVEDO, D.; TATSCH, M., et al. Prevalence of cognitive and functional impairment in a community sample in Ribeirao Preto, Brazil. **Int J Geriatr Psychiatry**,v.22, n. 8, p. 770-776, 2007.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S.; et al. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

LOVESTONE, S.; REYNOLDS, C. H.; LATIMER, D.; DAVIS, D. R.; ANDERTON, B. H., et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. **Curr Biol**,v.4, n. 12, p. 1077-1086, 1994.

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

MACIOTTA, S; MEREGALLI, M; TORRENTE, Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci,** v.7, n. 265, 2013.

MANDELKOW, E.; VON BERGEN, M.; BIERNAT, J.;MANDELKOW, E. M. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. **Brain Pathol**,v.17, n. 1, p. 83-90, 2007.

MANOLOPOULOS, K. N.; KLOTZ, L.-O.; KORSTEN, P.; BORNSTEIN, S. R.; BARTHEL, A. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 11, p. 1046–1052, 2010.

MARTIN PRINCE, A.; WIMO, A.; GUERCHET, M.; et al. World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An AnAlysIs of prevAlence, IncIDence, cosT AnD TrenDs, 2015.

MATTILA, P. M.; RÖYTTÄ, M.; TORIKKA, H.; DICKSON, D. W.; RINNE, J. O. Cortical Lewy bodies and Alzheimer-type changes in patients with Parkinson's disease. **Acta neuropathologica**, v. 95, n. 6, p. 576–82, 1998.

MATTSSON, N. CSF biomarkers in neurodegenerative diseases. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 49, n. 3, p. 345–52, 2011.

MCGIRT, M. J.; WOODWORTH, G.; COON, A. L.; et al. Diagnosis, Treatment, and Analysis of Long-term Outcomes in Idiopathic Normal-Pressure Hydrocephalus. **Neurosurgery**, p. 699–705, 2005.

MCKEITH, I. G. Dementia with Lewy bodies. **Br J Psychiatry**,v.180, n. 144-147, 2002.

MCKEITH, I. G.; DICKSON, D. W.; LOWE, J.; EMRE, M.; O'BRIEN, J. T., et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. **Neurology**,v.65, n. 12, p. 1863-1872, 2005.

MCKEITH; FAIRBAIRN, A.; PERRY, R.; THOMPSON, P.;PERRY, E. Neuroleptic sensitivity in patients with senile dementia of Lewy body type. **BMJ**,v.305, n. 6855, p. 673-678, 1992.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.;STADLAN, E. M. 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. 939-944, 1984.

MELO, L. M.; BARBOSA, E. R.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, n. 4, p. 176–183, 2007.

MERDES, A. R.; HANSEN, L. A.; JESTE, D. V.; GALASKO, D.; HOFSTETTER, C. R., et al. Influence of Alzheimer pathology on clinical diagnostic accuracy in dementia with Lewy bodies. **Neurology**,v.60, n. 10, p. 1586-1590, 2003.

MESTDAGH, P.; HARTMANN, N.; BAERISWYL, L.; et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p. 809–815, 2014.

MiRBase Database, Versão 21.0. http://www.mirbase.org/search.shtml. Acesso em: Ago/14.

MORIN, R.; BAINBRIDGE, M.; FEJES, A.; HIRST, M.; KRZYWINSKI, M., et al. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. **Biotechniques**,v.45, n. 1, p. 81-94, 2008.

MORMONT, E.; LAURIER-GRYMONPREZ, L.; BAISSET-MOULY, C.;PASQUIER, F. [The profile of memory disturbance in early Lewy body dementia differs from that in Alzheimer's disease]. **Rev Neurol** (Paris),v.159, n. 8-9, p. 762-766, 2003.

MORRISON, A. S.;LYKETSOS, C. The pathophysiology of Alzheimer's Disease and directions in treatment. **Advanced Studies in Nursing** v.3, n. 8, p. 256-270, 2005.

MULDER, C.; SCHOONENBOOM, S. N.; WAHLUND, L. O.; SCHELTENS, P.; VAN KAMP, G. J., et al. CSF markers related to pathogenetic mechanisms in Alzheimer's disease. **J Neural Transm**,v.109, n. 12, p. 1491-1498, 2002.

MÜLLER, M.; KUIPERIJ, H. B.; CLAASSEN, J. A.; KÜSTERS, B.; VERBEEK, M. M. MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 1, p. 152–8, 2014.

MUNOZ, L.; AMMIT, A. J. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 3, p. 561–8, 2010.

MYERS, C. E. Memory Loss and the Brain. http://www.memorylossonline.com/glossary/hippocampus.html. Acesso em: 10/08/2013

NEARY, D. Classification of the dementias. **Reviews in Clinical Gerontology**,v.9, n. 1, p. 55-64, 1999.

NEEF, D.; WALLING, A. D. Dementia with Lewy bodies: an emerging disease. American family physician, v. 73, n. 7, p. 1223–9, 2006.

NITRINI, R. Epidemiologia da doença de Alzheimer. In: O. V. FORLENZA & P. CARAMELLI. **Neuropsiquiatria Geriátrica**. Atheneu, 2000.

NITRINI, R.; LEFÈVRE, B. H.; MATHIAS, S. C.; CARAMELLI, P.;CARRILHO, P. E. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**,v.52, n. 4, p. 457-465, 1994.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.

OKAZAKI, H.; LIPKIN, L. E.;ARONSON, S. M. Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriparesis in flexion. **J Neuropathol Exp Neurol**,v.20, n. 237-244, 1961.

OLIVEROS, J. C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. BioinfoGP, CNB-CSIC. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html.

OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.;LUND, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Mol Cell**,v.30, n. 4, p. 460-471, 2008.

OZSOLAK, F.;MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nat Rev Genet**,v.12, n. 2, p. 87-98, 2011.

PARASKEVOPOULOU, M. D.; GEORGAKILAS, G.; KOSTOULAS, N.; et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W169–73, 2013.

PAULA, V. D. J. R. D.; GUIMARÃES, F. M.; DINIZ, B. S.;FORLENZA, O. V. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, Tau protein or both? **Dementia & Neuropsychologia** v.3, n. 3, p. 188-194, 2009.

PEREIRA, R. M.; MAZETI, L.; LOPES, D. C. P.; PINTO, F. C. G. Hidrocefalia de pressão normal: visão atual sobre a fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. **Arq. bras. neurocir**, v. 31, n. 1, 2012.

PETILLO, D.; OREY, S.; TAN, A. C.; FORSGREN, L.; KHOO, S. K. Parkinsons Disease-related Circulating microRNA Biomarkers——a Validation Study. **Medical Science** 2015, Vol. 2, Pages 7-14, 2015.

PFEFFER, R. I.; KUROSAKI, T. T.; HARRAH, C. H., JR.; CHANCE, J. M.;FILOS, S. Measurement of functional activities in older adults in the community. **J Gerontol**,v.37, n. 3, p. 323-329, 1982.

PICK, A. Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. **Prager Medicinische Wochenschrift**,v.17, n. 165-167, 1892.

PLA, A.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Autophagy Constitutes a Protective Mechanism against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153097, 2016. Public Library of Science.

POSTINA, R. Activation of α-secretase cleavage. **Journal of neurochemistry**, p. 46–54, 2012.

PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; WIMO, A.; RIBEIRO, W.;FERRI, C. P. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimers Dement**,v.9, n. 1, p. 63-75 e62, 2013.

PUCCIONI-SOHLER, M.; MACHADO, L. D. R.; CANUTO, R.; TAKAYANAGUI, O. M.; ALMEIDA, S. M. D.;LIVRAMENTO, J. A. Coleta do Líquido Cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**,v.60, n. 3A, p. 681-684, 2002.

QIAN, M.; SHEN, X.; WANG, H. The Distinct Role of ADAM17 in APP Proteolysis and Microglial Activation Related to Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 4, p. 471–482, 2016.

QIU, L.; TAN, E. K.; ZENG, L. microRNAs and Neurodegenerative Diseases. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 888, p.85–105, 2015.

RAJAPAKSHA, T. W.; EIMER, W. A.; BOZZA, T. C.; VASSAR, R. The Alzheimer's β-secretase enzyme BACE1 is required for accurate axon guidance of olfactory sensory neurons and normal glomerulus formation in the olfactory bulb. **Molecular neurodegeneration**, v. 6, p. 88, 2011.

RAUK, A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? **Dalton Transn**. 10, p. 1273-1282, 2008.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C., et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. **Nature**,v.403, n. 6772, p. 901-906, 2000.

REISBERG, B.; DOODY, R.; STOFFLER, A.; SCHMITT, F.; FERRIS, S.;MOBIUS, H. J. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**,v.348, n. 14, p. 1333-1341, 2003.

RELKIN, N.; MARMAROU, A.; KLINGE, P.; BERGSNEIDER, M.; BLACK, P. M. Diagnosing idiopathic normal-pressure hydrocephalus. **Neurosurgery**, v. 57, n. 3 Suppl, p. S4–16; discussion ii–v, 2005.

RIGOUTSOS, I. New tricks for animal microRNAS: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. **Cancer Res**,v.69, n. 8, p. 3245-3248, 2009.

RUSS, C.; LOVESTONE, S.; POWELL, J. Identification of genomic organisation, sequence variants and analysis of t...: Busca integrada ao Acervo UFPR. **Molecular Psychiatry**, v. 7, p. 104–109, 2002.

SAINI, H. K.; GRIFFITHS-JONES, S.;ENRIGHT, A. J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v.104, n. 45, p. 17719-17724, 2007.

SALA FRIGERIO, C.; LAU, P.; SALTA, E.; et al. Reduced expression of hsa-miR-27a-3p in CSF of patients with Alzheimer disease. **Neurology**, v. 81, n. 24, p. 2103–6, 2013.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; HAAPASALO, A.; SOININEN, H.; HILTUNEN, M. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 118, n. 4, p. 460–74, 2011.

SATOH, J.-I.; KINO, Y.; NIIDA, S. MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease from Public Data. **Biomarker insights**, v. 10, p. 21–31, 2015.

SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R.; VALLADA, H. P.; CREPALDI, A. L.; PASTOR-VALERO, M., et al. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in Sao Paulo, Brazil. **Int Psychogeriatr**,v.20, n. 2, p. 394-405, 2008.

SCHELTENS, P.; FOX, N.; BARKHOF, F.;DE CARLI, C. Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. **Lancet Neurol**,v.1, n. 1, p. 13-21, 2002.

SCHONROCK, N.; MATAMALES, M.; ITTNER, L. M.;GOTZ, J. MicroRNA networks surrounding APP and amyloid-beta metabolism--implications for Alzheimer's disease. **Exp Neurol**,v.235, n. 2, p. 447-454, 2012b.

SCHONROCK, N.;GOTZ, J. Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease. **Cell Mol Life Sci**,v.69, n. 21, p. 3543-3559, 2012a.

SCHRATT, G. Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. **Curr Opin Neurobiol**,v.19, n. 2, p. 213-219, 2009.

SELBACH, M.; SCHWANHAUSSER, B.; THIERFELDER, N.; FANG, Z.; KHANIN, R.;RAJEWSKY, N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**,v.455, n. 7209, p. 58-63, 2008.

SHEINERMAN, K. S.; UMANSKY, S. R. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 150, 2013.

SIEGEL, G.; SABA, R.;SCHRATT, G. microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. **Curr Opin Genet Dev**,v.21, n. 4, p. 491-497, 2011.

SMALL, G. W. The pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Clin Psychiatry**,v.59 Suppl 9, n. 7-14, 1998.

SMITH, P. Y.; DELAY, C.; GIRARD, J.; PAPON, M. A.; PLANEL, E., et al. MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. **Hum Mol Genet**,v.20, n. 20, p. 4016-4024, 2011.

SØRENSEN, S. S.; NYGAARD, A.-B.; CHRISTENSEN, T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer’s disease and other types of dementia - an exploratory study. **Translational neurodegeneration**, v. 5, p. 6, 2016.

SOTO, C.; SATANI, N. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 1, p. 14–24, 2011.

SPILLANTINI, M. G.; CROWTHER, R. A.; JAKES, R.; HASEGAWA, M.;GOEDERT, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v.95, n. 11, p. 6469-6473, 1998.

SUN, B. K.;TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol**,v.59, n. 5, p. 725-737; quiz 738-740, 2008.

TAGANOV, K. D.; BOLDIN, M. P.; CHANG, K. J.;BALTIMORE, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v.103, n. 33, p. 12481-12486, 2006.

TAKEDA, S.; SATO, N.; MORISHITA, R.; BALIN, B. J.; TORRES-ALEMAN, I. AGING NEUROSCIENCE Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy, 2014.

TAKEUCHI, H.; MIZOGUCHI, H.; DOI, Y.; et al. Blockade of Gap Junction Hemichannel Suppresses Disease Progression in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21108, 2011.

TALMAT-AMAR, Y.; ARRIBAT, Y.; REDT-CLOUET, C.; FEUILLETTE, S.; BOUGE, A. L., et al. Important neuronal toxicity of microtubule-bound Tau in vivo in Drosophila. **Hum Mol Genet**,v.20, n. 19, p. 3738-3745, 2011.

TAN, L.; YU, J. T.;HU, N. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol**,v.47, n. 1, p. 382-393, 2013.

TAN, L.; YU, J.-T.; LIU, Q.-Y.; et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 336, n. 1-2, p. 52–6, 2014.

TAVARES, A.;AZEREDO, C. Demência com corpos de Lewy: uma revisão para o psiquiatra. **Revista de Psiquiatria Clínica**,v.30, n. 1, p. 29-34, 2003.

TESSEUR, I.; WYSS-CORAY, T. A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. **Current Alzheimer research**, v. 3, n. 5, p. 505–13, 2006.

THAL, L. J.; KANTARCI, K.; REIMAN, E. M.; KLUNK, W. E.; WEINER, M. W., et al. The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**,v.20, n. 1, p. 6-15, 2006.

TSUANG, D.; LEVERENZ, J. B.; LOPEZ, O. L.; HAMILTON, R. L.; BENNETT, D. A., et al. APOE epsilon4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies. **JAMA Neurol**,v.70, n. 2, p. 223-228, 2013.

UNITED-NATIONS. World Population to reach 10 billion by 2100 if Fertility in all Countries Converges to Replacement Level.D. o. E. a. S. Affairs: Press Release, 2011.

VALLELUNGA, A.; RAGUSA, M.; MAURO, S. DI; et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 156, 2014.

VASCONCELLOS, L. F. R.; PEREIRA, J. S. Parkinson's disease dementia: Diagnostic criteria and risk factor review. **Journal of clinical and experimental neuropsychology**, v. 37, n. 9, p. 988–993, 2015.

VERAS, R.;MURPHY, E. The mental health of older people in Rio de Janeiro. **International Journal of Geriatric Psychiatry**,v.9, n. 4, p. 285–295, 1994.

VLACHOS, I. S.; PARASKEVOPOULOU, M. D.; KARAGKOUNI, D.; et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported

miRNA:mRNA interactions. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D153–9, 2015.

WACKER, P.; NUNES, P. V.;FORLENZA, O. V. Delirium: uma perspectiva histórica. **Revista de Psiquiatria Clínica**,v.32, n. 3, p. 97-103, 2005.

WALDEMAR, G.; DUBOIS, B.; EMRE, M.; GEORGES, J.; MCKEITH, I. G., et al. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. **Eur J Neurol**,v.14, n. 1, p. e1-26, 2007.

WALKER, Z.; JAROS, E.; WALKER, R. W.; LEE, L.; COSTA, D. C., et al. Dementia with Lewy bodies: a comparison of clinical diagnosis, FP-CIT single photon emission computed tomography imaging and autopsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**,v.78, n. 11, p. 1176-1181, 2007.

WALLIN, A. K.; BLENNOW, K.; ANDREASEN, N.;MINTHON, L. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. **Dement Geriatr Cogn Disord**,v.21, n. 3, p. 131-138, 2006.

WANG, C.; YU, J.-T.; MIAO, D.; et al. Targeting the mTOR signaling network for Alzheimer’s disease therapy. **Molecular neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 120–35, 2014.

WANG, W.; KWON, E. J.;TSAI, L. H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. **Learn Mem**,v.19, n. 9, p. 359-368, 2012.

WANG, X.; SHEN, Y.;CHEN, W. Progress in frontotemporal dementia research. Am J **Alzheimers Dis Other Demen**,v.28, n. 1, p. 15-23, 2013.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.;SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**,v.10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WATKINS, P. B.; ZIMMERMAN, H. J.; KNAPP, M. J.; GRACON, S. I.;LEWIS, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **JAMA**,v.271, n. 13, p. 992-998, 1994.

WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–41, 2010.

WEISSMILLER, A. M.; WU, C.; CHAO, M.; et al. Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. **Translational Neurodegeneration**, v. 1, n. 1, p. 14, 2012.

WHITEHOUSE, P. J.; PRICE, D. L.; STRUBLE, R. G.; CLARK, A. W.; COYLE, J. T.;DELON, M. R. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. **Science**,v.215, n. 4537, p. 1237-1239, 1982.

WHITWELL, J. L.;JACK, C. R., JR. Comparisons between Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration, and normal aging with brain mapping. **Top Magn Reson Imaging**,v.16, n. 6, p. 409-425, 2005.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.;DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**,v.11, n. 3, p. 228-234, 2009.

WITWER, K. W. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. **Clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 56–63, 2015.

YEKTA, S.; SHIH, I. H.;BARTEL, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. **Science**,v.304, n. 5670, p. 594-596, 2004.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.;CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**,v.17, n. 24, p. 3011-3016, 2003.

ZHAO, N.; JIN, L.; FEI, G.; ZHENG, Z.; ZHONG, C. Serum microRNA-133b is associated with low ceruloplasmin levels in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 20, n. 11, p. 1177–80, 2014.

ZHAO, X.; HE, X.; HAN, X.; YU, Y.; YE, F., et al. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. **Neuron**,v.65, n. 5, p. 612-626, 2010.

ZONG, Y.; WANG, H.; DONG, W.; QUAN, X.; ZHU, H., et al. miR-29c regulates BACE1 protein expression. **Brain Res**,v.1395, n. 108-115, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 - Mini-Exame do Estado Mental - MEEM

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL
(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/ ____/ ____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO
- Dia da semana (1 ponto) .....( )
- Dia do mês (1 ponto) .....( )
- Mês (1 ponto) .....( )
- Ano (1 ponto) .....( )
- Hora aproximada (1 ponto) .....( )
- Local específico (aposento ou setor) (1 ponto) .....( )
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto) .....( )
- Bairro ou rua próxima (1 ponto) .....( )
- Cidade (1 ponto) .....( )
- Estado (1 ponto) .....( )

MEMÓRIA IMEDIATA
- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta .....( )

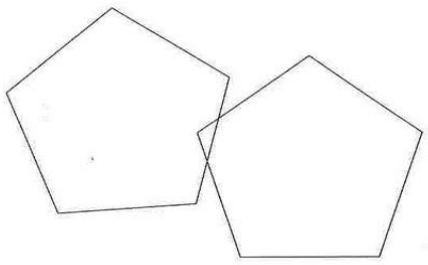
  Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO
- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto) .....( )
  (alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

EVOCAÇÃO
- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra) .....( )

LINGUAGEM
- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos) .....( )
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá) (1 ponto) .....( )
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão (3 ptos) .....( )
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto) .....( )
- Escrever uma frase (1 ponto) .....( )
- Copiar um desenho (1 ponto) .....( )

ESCORE: (____/30)



ANEXO 2 – Escala Geriátrica de Depressão - GDS

ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESSÃO (GDS-15 E GDS-5)

Paciente:_____ Data: _____

GDS-5	01. Você está satisfeito, de modo geral, com sua vida?	SIM	**NÃO**	GDS-15
	02. Você tem ficado aborrecido com frequência?	**SIM**	NÃO	
	03. Você se sente inútil do jeito que está hoje?	**SIM**	NÃO	
	04. Você prefere mais ficar em casa do que sair e fazer coisas novas?	**SIM**	NÃO	
	05. Você se sente sem esperança da situação atual em que se encontra?	**SIM**	NÃO	
	06. Você tem medo que alguma coisa de ruim lhe aconteça? (Sempre está a cabeça)	**SIM**	NÃO	
	07. Você se sente frequentemente desamparado?	**SIM**	NÃO	
	08. Você acha que é maravilhoso estar vivo agora?	SIM	**NÃO**	
	09. Você acha que sua vida está vazia?	**SIM**	NÃO	
	10. Você acha que a maioria das pessoas está melhor que você? (estado geral)	**SIM**	NÃO	
	11. Você acha que tem mais problemas de memória do que a maioria? (mesma idade)	**SIM**	NÃO	
	12. Você deixou muitos de seus interesses e atividades? (abriu mão nos últimos tempos)	**SIM**	NÃO	
	13. Você está de bom humor a maior parte do tempo?	SIM	**NÃO**	
	14. Você se sente cheio de energia?	SIM	**NÃO**	
	15. Você se sente feliz a maior parte do tempo?	SIM	**NÃO**	

Total: _____

Pontuação:

- Os escores inferiores a 05 são normais;
- Entre 05 e 10 indicam depressão leve a moderada;
- Escores maiores que 10 indicam depressão grave.

ANEXO 3 - Atividades instrumentais de vida diária - PFEFFER

ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA – PFEFFER

Paciente:_____ Data: _____

01. Ele(a) manuseia seu próprio dinheiro?	0 1 2 3
02. Ele(a) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para a casa sozinho(a) ?	0 1 2 3
03. Ele(a) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?	0 1 2 3
04. Ele(a) é capaz de preparar uma comida?	0 1 2 3
05. Ele(a) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?	0 1 2 3
06. Ele(a) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?	0 1 2 3
07. Ele(a) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos familiares, feriados?	0 1 2 3
08. Ele(a) é capaz de manusear seus próprios remédios?	0 1 2 3
09. Ele(a) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta pra casa?	0 1 2 3
10. Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?	0 1 2 3
	Total: _____/30

Pontuação:

- 0 - Normal, ou nunca fez, mas poderia fazê-lo agora;
- 1 - Faz com dificuldades, ou nunca o fez e agora teria dificuldade;
- 2 - Necessita de ajuda;
- 3 - Não é capaz.

ANEXO 4 – Avaliação Clínica de Demência – CDR

Demência	Nenhuma CDR 0	Questionável CDR 0,5	Leve CDR 1	Moderada CDR 2	Grave CDR 3
Memória	Sem perda da memória; esquecimento inconstante	Esquecimento leve consistente, relembra parcialmente eventos. "Esquecimento Benigno".	Perda moderada da memória, mais acentuada para eventos recentes. Interferência nas atividades da vida diária.	Perda grave da memória; com retenção apenas de dados fortemente consolidados; novos dados são rapidamente perdidos.	Perda grave da memória; apenas fragmentos permanecem.
Orientação	Orientação plena.	Orientação plena, exceto dificuldade branda com datas.	Dificuldade moderada com datas, orientado quanto ao "espaço" onde se realiza o exame; pode apresentar desorientação geográfica.	Dificuldade grave com datas; desorientação usual quanto ao tempo. Permanece quanto ao espaço.	Orientação apenas em relação a pessoas.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia, incluindo atividades comerciais e financeiras; capacidade de julgamento adequado quando comparada ao desempenho anterior.	Incapacidade leve para resolver problemas, identificar similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada no manejo de problemas, identificação de similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente preservado.	Enorme incapacidade para manejar problemas, similaridades e diferenças. Julgamento social comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Funcionalmente independente ao nível usual de trabalho, compras, atividades voluntárias e grupos sociais.	Leve incapacidade nestas atividades.	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades, ainda que possa se engajar em algumas. Parece normal quando casualmente inspecionado.	Sem pretensão de manter funções independentes fora do domicílio. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora do domicílio.	Parece muito doente para ser levado para fora do domicílio.
Atividades domésticas e passatempo	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual bem mantidos	Vida doméstica, passatempo e interesse intelectual levemente comprometidos.	Incapacidade leve, porém definitiva, para atividades do lar. Abandono de atividades mais difíceis e passatempos complicados. Outros interesses abandonados.	Somente as ações simples estão preservadas; interesse restrito.	Ausência de atividades significantes no domicílio.
Cuidado Pessoal	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Plenamente capaz de manter auto-cuidados.	Necessita de "incentivo".	Requer assistência no vestuário, higiene e manejo de itens pessoais.	Requer muita ajuda no cuidado pessoal; incontinência frequente.

ANEXO 5 - Termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta de LCR

(Conforme CNS, Resolução 466 de 12/12/12).

Título do Estudo: ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MicroRNAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER, DEMÊNCIA POR CORPOS DE LEWY E DEGENERAÇÃO LOBAR FRONTOTEMPORAL.

Nome:
Data:

O Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar deste projeto de pesquisa, pois frequenta o Ambulatório de Disfunção Cognitiva do setor de Neurologia do Hospital de Clínicas, UFPR. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.
A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Objetivo do Estudo

O objetivo deste estudo é avaliar marcadores presentes no Líquido cefalorraquidiano (líquido da espinha) e no sangue, a fim de diferenciar os vários tipos de demências.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados a coleta do líquido cefalorraquidiano (líquido da espinha) e do sangue, dos quais serão extraídos os microRNAs para a pesquisa.
De sangue serão coletados aproximadamente10ml com material descartável e por técnico treinado. O líquido cefalorraquidiano (líquido da espinha) será coletado por punção lombar (nas costas) com uso de anestésico no local, material estéril e realizado por profissional treinado (médico) com larga experiência. O volume retirado será de aproximadamente 15ml.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

O principal risco pela coleta de líquido cefalorraquidiano (líquido da espinha) é dor de cabeça transitória com duração de alguns dias, porém só ocorre em cerca de 5% dos casos. Essa dor de cabeça melhora com repouso e uso de analgésicos (medicamentos para dor) comuns. Para retirada do líquido da espinha serão usadas agulhas de punção lombar, descartáveis (próprias para isto), que não causam traumatismo e diminuem o risco de dor de cabeça. Os casos que desenvolverem dor de cabeça serão tratados e acompanhados. Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos.
O Senhor (a) pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios para o participante

O benefício dos participantes será unicamente a contribuição científica que possa surgir com os resultados da pesquisa, no qual seu material foi fundamental para concretização, não havendo nenhum benefício de ordem financeira. O material poderá, no entanto, contribuir futuramente para a determinação de novos biomarcadores (microRNAs) capazes de auxiliar no diagnóstico das demências.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, o senhor (a) somente participa se quiser. A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico. Após assinar o consentimento, o senhor (a) terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.
Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo são: Dr. Ricardo L. R. de Souza, MSc. Meire S. Batistela, (Departamento de Genética, UFPR – 3361-1554/3361-1730/9664-3506 – Meire); Dr. Sérgio M. de Almeida (Hospital de Clínicas, UFPR) e Dr. Mauro Piovezan (Hospital de Clínicas, UFPR). O Senhor (a) também pode entrar em contato pelos e-mails: lehtonen@ufpr.br e mebatistela@gmail.com.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal_____
Pesquisador Responsável_____
Orientador_____ Orientado_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar do estudo intitulado "ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MicroRNAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER, DEMÊNCIA POR CORPOS DE LEWY E DEGENERAÇÃO LOBAR FRONTOTEMPORAL".

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa.

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição. Receberei uma via assinada e datada deste documento. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

_____

Nome do Voluntário em Letra de Forma

_____

Assinatura do Responsável Legal

_____

Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento

ANEXO 6 – Termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta de sangue

Eu .....ou responsável por..... ....., autorizo a participação na pesquisa: **"ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO BCHE, APOE, SLITRK3, NEP E GENES DA FAMÍLIA MLR HUMANA E A DOENÇA DE ALZHEIMER"**. Concordo com o armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas futuras nos termos citados na Carta de Informação. Tenho pleno conhecimento dos procedimentos que serão submetidos conforme descritos anteriormente. Assino o presente termo, após ter lido a Carta de Informação, entendido e não ter mais nenhuma dúvida.

Curitiba, ... de ..... de 2013

Ass.:.....

RG:.....

Data:.....Telefone:.....

☐ _____

☐ Controle idoso

☐ D. A.

Nome:.....

Local de Nascimento:.....

Data de nascimento:.....Idade:.....

Cor:.....Descendência .....

Medicamentos em uso:.....

.....

.....

Fuma?.....

Consome álcool:.....

Doenças anteriores:.....

´.....

.....

Doenças na família (genéticas ou senis):.....

.....

.....

Parentes com demência (qual):.....

Profissão:.....

Quando apareceram os primeiros sinais de demência:.....

Quais foram os sintomas:.....

.....

.....

.....

Mudanças de comportamentos/personalidade (quais).....

.....

.....

Donw na família?:.....

Exame clínico neurológico:.....

.....

.....

Alimentação:…..……

Sono:……...……

Escolaridade.....

Responsável:.....

Resposta ao inibidor: .....

Horário tomou inibidor: .....

Efeito colateral ao inibidor:.....

Data da coleta de sangue:.....

OBS:.....

Peso:..... Altura:.....C.A.:.....

Dados laboratoriais:

Responsáveis:

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Msc. Daiane Priscila Simão-Silva

Dr. Mauro Piovezan

Prontuário N. _____

ANEXO 7 – Extração de RNA total com kit mirVana™ PARIS™

- Instruções pré-extração (só a 1ª vez):

1) Adicionar **375µl** de **2-mercaptoetanol** ao frasco **"2X Denaturing Solution"**, mexer bem e marcar no frasco que o reagente já foi adicionado.

   Obs: 2X Denaturing Solution pode solidicar a 4ºC, se for o caso, aquecer a 37ºC antes de usar para homogeneizar (pode deixar a temperatura ambiente por até 1 mês).

2) Adicionar **21ml** de **etanol 100%** no frasco **"miRNA Wash Solution 1"** mexer bem e marcar no frasco que o reagente já foi adicionado.
3) Adicionar **40ml** de **etanol 100%** no frasco **"Wash Solution 2/3"** mexer bem e marcar no frasco que o reagente já foi adicionado.

- Extração de RNA Total:

*Pré-aquecer a solução eluente a 95ºC (alíquotas separadas).

*Descongelar o álcool 100%, deixar a temperatura ambiente.

1) Adicionar **"2X Denaturing Solution"** no mesmo volume que a amostra em um tubo de 1,5ml, homogeneizar bem e incubar por 5 minutos no gelo. *Obs: volume máximo de amostra + solução desnaturante = 625µl. Obs2: se o volume da amostra for menor que 100µl, acrescentar "Cell Disruption Buffer" para aumentar o volume.*

2) Adicionar **"Acid-Phenol:Chlorophorm"** em igual volume da amostra + solução desnaturante (Por ex: amostra 200 µl, solução desnaturante 200µl, total 400µl, adicionar 400µl de Acid-Phenol:Chlorophorm.)
3) Colocar no vortex de 30 a 60 segundos para misturar bem
4) Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima (≥ 10,000 xg) a temperatura ambiente para separar em fases aquosa e orgânica. Se não estiver bem separado, centrifugar novamente.
5) Remover a fase aquosa (a de cima) e colocar em um novo tubo. Olhar o volume retirado.
6) Adicionar 1.25 volumes de etanol 100% à fase aquosa e misturar bem. (ex: se foi recolhida na fase aquosa 300 ul, acrescentar 375µl de etanol)

7) Separar um tubo coletor e um filtro para cada amostra (nomeá-los adequadamente). Pipetar a solução + etanol no filtro (máximo de 700µl por vez, repetir este passo mais de uma vez se volume maior)
8) Centrifugar por 30 segundos para descer todo o líquido da coluna. Descartar o líquido e repetir a centrifugação com o restante do líquido (se houver).
9) Adicionar 700µl de **"miRNA Wash Solution 1"** no filtro e centrifugar por 15 segundos. Descartar o líquido resultante e recolocar o filtro no tubo.
10) Adicionar 500µl de **"Wash Solution 2/3"** no filtro e centrifugar por 15 segundos.
11) Repetir o item 10.
12) Depois de descartar o líquido resultante, centrifugar por 1 minuto para retirar todo o líquido remanescente no filtro.
13) Transferir o filtro para um novo tubo coletor e adicionar no filtro 100µl de solução eluente (pré-aquecida a 95ºC) e fechar a tampa. Centrifugar por 30 segundos para recolher o RNA. **ATENÇÃO: Este líquido contém o RNA, cuidado para não descartar!!!**
14) Estocar o RNA a -80ºC ou mais frio.
15) Medir concentração e pureza no NanoDrop

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Artigo de revisão

International Journal of Neuroscience, 2016; Early Online: 1–12
Copyright © 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
ISSN: 0020-7454 print / 1543-5245 online
DOI: 10.1080/00207454.2016.1209754

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW ARTICLE

An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases

Meire Silva Batistela, Nalini Drieli Josviak, Carla Daniela Sulzbach, and Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Genetics Department, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil

Circulating cell-free microRNAs (miRNAs) are stable in many biological fluids and their expression profiles can suffer changes under different physiological and pathological conditions. In the last few years, miRNAs have been proposed as putative noninvasive biomarkers in diagnosis, prognosis and response to treatment for several diseases, including neurodegenerative disorders as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). Cognitive and/or motor impairments are usually considered for establishing clinical diagnosis, and at this stage, the majority of the neurons may already be lost making difficult attempts of novel therapies. In this review, we intend to survey the circulating cell-free miRNAs found as dysregulated in cerebrospinal fluid, serum and plasma samples in AD and PD patients, and show how those miRNAs can be useful for early and differential diagnosis. Beyond that, we highlighted the miRNAs that are possibly related to common molecular mechanisms in the neurodegeneration process, as well those miRNAs related to specific disease pathways.

KEYWORDS: microRNA, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, noninvasive biomarkers, biological fluids

Introduction

Neurodegenerative diseases (ND) are a group of various disorders characterized by gradual and progressive loss of neuronal cells, leading to nervous system dysfunction. Both the region and extension as the type of neurons affected by cellular death reflect in cognitive, behavioral and/or motor symptoms, which are quite specific to each disease [1].

Late onset ND represent a major public health concern once global population is rapidly aging. Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most prevalent ND among the elderly and bring considerable burden on individuals and their families [2]. Finding biomarkers that allow an accurate diagnosis as soon as possible preferably before the massive loss of neurons and appearance of clinical symptoms is crucial for the development of effective treatments [3].

**MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs responsible for regulating gene expression post-transcriptionally. Recently, miRNAs have been described in body fluids as circulating cell-free entities and used as noninvasive biomarkers both in the diagnosis, prognosis and response to treatment for several diseases [4]. Therefore, this review intends to provide an overview of how circulating cell-free miRNAs can be useful as biomarkers for AD and PD early and differential diagnosis. Moreover, we hope this survey can help researchers to select circulating cell-free miRNAs candidates for future studies using body fluids, once it provides an updated review for a field which constantly advances.

Received 26 January 2016; revised 9 June 2016; accepted 3 July 2016; publish online 20 July 2016.

Correspondence: Meire Silva Batistela, Genetics Department, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil. Email: mebatistela@ufpr.br

MicroRNAs as putative noninvasive biomarkers

A biomarker is objectively measured and used to assess the health (e.g. normal aging) and pathological processes as well as pharmacological responses to therapeutic interventions [5]. Biomarker's sensitivity, specificity and ease of use are the most important factors that ultimately define their usefulness in diagnostic purposes [6].

miRNAs are a class of small RNAs (approximately 22 nucleotides in length) involved in the post-transcriptional regulation. These noncoding RNAs, which are transcribed from either intra- or intergenic regions, modulate gene expression by cleavage or translational repression of mRNA via base complementarity [7]. In the last years, miRNAs have been detected in a variety of biological fluids such as in the blood plasma and serum, urine, saliva, tears, breast milk and cerebrospinal fluid (CSF) (reviewed in [8]). Furthermore, a number of studies have reported miRNAs as stable in body fluids and their expression profiles can suffer changes under different physiological and pathological conditions, so they can be useful as noninvasive biomarkers in diagnosis, prognosis, and response to treatment [9–12].

Circulating cell-free miRNAs can be usually packaged in microvesicles, exosomes or apoptotic bodies, as well be associated with Argonaute protein family or lipoprotein complexes (high density lipoprotein [HDL]), and thereby are resistant to RNases present in extracellular environments [13,14]. Serum miRNAs remain stable after being exposed to severe conditions that would normally degrade most RNAs, such as boiling, very low or high pH levels, extended storage and 10 freeze–thaw cycles [15]. Despite its stability, their low enrichment in fluids as in plasma/serum and the CSF can difficult isolation and quantification of circulating cell-free miRNAs [16].

Commercial kits based on acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform lysis followed by column precipitation can be used to isolate miRNAs from body fluids samples. These kits allow the purification of total RNA preserving the small fraction or perform the isolation of enriched small RNAs (<200 nt, including miRNAs) directly, being both approaches suitable depending on requirements for downstream methodologies [17]. Glycogen or linear acrylamide can be used as nucleic acid co-precipitants (or carriers) in order to improve miRNA recovery, as well synthetics spiked-ins (e.g. cel-miR-39) for quality control of RNA isolation [18]. Burgos et al. adapted miRNA isolation in order to increase small RNA recovery by repeating the aqueous extraction during the phenol–chloroform purification in the commercial kits assessed [19].

Although the sizes and relative abundance of ribosomal RNAs can be used to assess the integrity of RNAs enriched intracellularly by RNA integrity number, there is no consensus in the literature to gauge the quality of isolated miRNAs from body fluids [20,21]. To measure the total miRNA yield is also problematic and represents an obstacle in establishing the amount of RNA input for downstream purposes. Lack of uniformity in the initial miRNA quantities may complicate sample-to-sample comparison and the results between different platforms [22]. Due to the low RNA amounts in the biological fluids compared to cells and tissues, to assure they are free of any cell fragments (including hemolysis) will avoid the profiling of intracellular miRNAs instead the circulating cell-free panels [23].

There are many methodological approaches available to detect the circulating cell-free miRNAs (reviewed in [24]). Currently, the most frequently adopted have been the reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) (RT-qPCR) and the next generation sequencing (NGS). When the goal is profiling the expression of hundreds of miRNAs in a single experiment, both the RT-qPCR-based arrays and the NGS are suitable. However, these methodologies may not be sufficiently sensitive and, for this reason, potential biomarkers found as dysregulated in these screening approaches have to be validated by individual RT-qPCR assays in different and larger cohorts in order to be considered useful for diagnostic purposes [4].

The advantage of the NGS compared to RT-qPCR-based arrays is that the expression profiling is not restricted to known miRNAs and exhibits the highest discerning power for identifying novel miRNAs. Moreover, NGS can be used to uncover sequence variants and different isoforms of miRNAs as well other types of small RNAs [25]. On the other hand, NGS data analysis pipeline requires an advanced computational infrastructure and bioinformatics support [24]. When the aim is to assess a few miRNAs disease-related candidates using small samples volumes, single assays of RT-qPCR offers high sensitivity, specificity and reproducibility in detecting low levels of circulating cell-free miRNAs and performs quantification with a high dynamic range [2,26]. The main problem related to this methodology is the lack of a suitable endogenous control for normalization of miRNAs found in body fluids samples [27].

Both RT-qPCR and NGS techniques have been largely used and showed considerable ability in detecting profiles of miRNAs in patients compared to control groups. Nevertheless, the slight overlap in results between these two platforms [24,28] makes difficult the identification of reliable miRNAs that can advance to validation phases and effectively be used as noninvasive biomarkers.

Circulating cell-free miRNAs in neurodegenerative diseases

Several miRNAs have been implicated in the regulation of genes and pathways associated with neurodegeneration [29]. A common feature of many ND is the accumulation of toxic proteins in the brain, for example, the β-amyloid peptide and the hyperphosphorylated tau in AD patients and α-synuclein inclusions of Lewy

bodies/neurites in PD [30–32]. The mechanism by which toxic proteins leads to neuronal death remains unclear, even though the misregulation of pro-survival proteins mediated by miRNAs has been described as one possible mechanism [33].

MiRNAs can act on many stages in production and degradation of toxic proteins and changes in their expression can be directly related to the pathology. When deregulation is established, it may be the beginning of a process of neuronal death and subsequent development of a neurodegenerative condition [33]. Changes in miRNAs expression, as a consequence of cellular damage and brain injury, can be detected in the CSF and in the blood plasma/serum [24], since these miRNAs are able to cross the blood brain barrier transported by exosomes [34].

Therefore, searching for these miRNAs in body fluids could be a powerful tool towards the diagnosis of ND [4]. The following topics are focused on describing the main circulating cell-free miRNAs that have already been found in body fluids of AD (Table 1) and PD patients (Table 2).

Alzheimer's disease

AD is the most common form of neurodegenerative illness leading to dementia and often onsets elderly after age 65. Until 2050, it is expected that 1 in 85 people will be affected by this condition globally [62]. The neurodegenerative process usually commits the hippocampus initially and spreads to the cortical areas as the disease progresses. This pathological brain area distribution reflects early clinical symptoms, as the cognitive (memory most frequently) and behavioral impairments, with relative preservation of sensorial and motors functions until the latest stages of the disease. These impairments associated with incapacities in daily living, occupation or social interaction defines the term dementia [63]. Histopathological hallmarks of AD are Aβ peptides aggregates in senile plaques extracellularly and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) formed by hyperphosphorylated tau protein. Their brain quantities and distribution allow definitive diagnosis by examination of brain tissue at autopsy [64].

Peptides Aβ-42, total-tau and phosphorylated tau of NFTs have been used in clinical practice to differentiate AD cases from normal aging with a sensitivity and specificity of over 85% [65,66]. However, issues, including sample collection, transportation, storage, inconsistency of data analysis and high test costs, bring a real need for discovering new classes of biomarkers [67].

CSF is a clear biological fluid that is continuously produced by the choroid plexus and flows in the ventricles within the brain and around the surface of the brain and spinal cord, being absorbed into the venous system [68]. When the purpose is searching for circulating cell-free miRNAs in ND such as AD, CSF is a good choice once reflecting pathological changes, giving informative signals besides the brain tissue itself [43].

Cogswell et al. were first to detect miRNAs in the CSF of AD patients and their changes in expression patterns compared with the control group. The miRNAs miR-146-b, miR-181a-5p and miR-182-5p were found downregulated while miR-138-5p was upregulated. In addition to the CSF, the authors verified this same miRNA highly expressed in the hippocampus of brain patients, the main area committed in earlier stages of AD pathology [35].

Alexandrov et al. found miRNAs to be the most abundant class of nucleic acids in the CSF, even compared to Aβ peptides. Moreover, expression analysis showed upregulation of miRNAs miR-9, miR-125b, miR-155 and miR-146a in the CSF of AD patients [46]. Müller et al. found contradictory results regarding miR-146a expression in the CSF. Analysis made by RT-qPCR revealed that levels of miR-146a were significantly decreased in AD compared with control samples and that even minute amounts of contamination with blood cells (less than 100 erythrocytes per mL) might lead to "falsely elevated" CSF levels. Therefore, the authors suggested always to determine and taken into account the number of blood cells in the CSF samples when measuring miRNA levels [37]. Even after attesting CSF for absence of blood contamination, Denk et al. found a high expression of miR-146a [43].

Since focusing on a single miRNA may lead to controversial results in some cases (as seen with miR-146a) [43,46,37, 42], techniques profiling hundreds of miRNAs simultaneously have been used in order to identify a miRNAs-based signature that can differentiate AD cases from age-matched controls with good sensibility and specificity [43,47,51,52]. Denk et al. applied RT-qPCR-based array technology to profile 1178 miRNAs expression in the CSF of 22 AD patients and 28 controls. Using a panel of three miRNAs (miR-100, miR-103 and miR-375) in combination with CSF protein markers, it was possible to positively classify controls and AD cases with 96.4% and 95.5% accuracy, respectively [43].

Burgos et al. assessed profiles of miRNAs in post-mortem serum and CSF from the same individuals for the first time. All miRNAs found as differently expressed in the CSF were significantly downregulated, whereas 85% of the miRNAs identified in serum were upregulated in AD subjects compared to neurologically normal age-similar controls (Table 1). Two miRNAs were overlapped between CSF and serum profiles (miR-127-3p and miR-184), even though the direction of expression did not correlate (Table 1). One of the miRNAs found in low levels in CSF of patients compared to controls

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Table 1. Circulating cell-free miRNAs reviewed as differentially expressed in body fluids for AD compared to control groups.

Body fluid	Methodology	MiRNA	Change	Cohort	Reference
CSF	RT-qPCR	miR-138-5p	Up	20	[35]
		miR-146-b, miR-181a-5p,miR-182-5p	Down		
		miR-27a-3p	Down	39/33	[36]
		miR-146a	Down	40	[37]
		miR-125b, miR-29a	Up	38	[38]
		miR-384	Down	95	[39]
		miR-135a-5p, miR-200b	Down	78	[40]
		miR-210	Down	68	[41]
		miR-29a, miR-29b	Up	20	[42]
		miR-125b, miR-146a, miR-34a	Down		
	RT-qPCR-based array	miR-100, miR-146a,miR-296,miR-3622b-3p, miR-4467, miR-505, miR-766	Up	50	[43]
		miR-103, miR-1274a, miR-219, miR-375, miR-708-5p	Down		
	RT-qPCR-based array and RT-qPCR validation	miR-125b, miR-26b	Down	13/45	[44]
		miR-16-2, miR-331-5p, miR-136-3p, miR-29c	Down	102	[45]
		miR-132-5p, miR-485-5p, miR-151	Up		
	Microarray	miR-9-5p, miR-155, miR-146a, miR-125b	Up	12	[46]
	NGS	miR-181a-3p, miR-181b-5p, miR-101-5p, miR-10a-5p, miR-124-3p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-134, miR-136-3p, miR-136-5p, miR-138-5p, miR-139-5p, miR-181a-5p, miR-199b-5p, miR-218-5p, miR-3200-3p, miR-323a-3p, miR-326, miR-329, miR-33b-5p, miR-377-5p, miR-381, miR-410, miR-431-3p, miR-433, miR-488-3p, miR-495, miR-598, miR-708-3p, miR-708-5p, miR-769-5p, miR-873-5p, miR-874, miR-9-3p, miR-95, miR-9-5p, miR-127-3p, miR-184	Down	147	[47]
Serum	RT-qPCR	miR-384	Down	95	[39]
		miR-135a-5p, miR-200b	Down	78	[40]
		miR-210	Down	68	[41]
		miR-137, miR-181c, miR-29a, miR-29b, miR-9-5p	Down	14	[48]
		miR-9-5p	Up	255	[49]
		miR-125b, miR-181c	Down		
	RT-qPCR-based array and RT-qPCR validation	miR-125b, miR-23a, miR-26b	Down	13/45	[44]
	NGS and RT-qPCR validation	miR-143, miR-146a, miR-31, miR-93	Down	17/96	[50]
		miR-1306-5p, miR-15b-3p, miR-342-3p	Down	49/60	[51]
		miR-101-3p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-143-3p, miR-15a-5p, miR-18b-5p, miR-20a-5p, miR-30e-5p, miR-355-5p, miR-361-5p, miR-424-5p, miR-582-5p, miR-93-5p	Up		
		miR-191-5p, miR-342-3p, miR-885-5p, miR-98-5p, miR-let-7d-5p, miR-483-3p	Down	100/313	[52]
	NGS	miR-125a-3p, miR-125b-1-3p, miR-1285-3p, miR-1307-5p, miR-135a-5p, miR-219-2-3p, miR-22-5p, miR-30c-2-3p, miR-3176, miR-34b-3p, miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-671-3p, miR-873-3p, miR-887, miR-127-3p, miR-184	Up	147	[47]
		miR-182-5p, miR-21-5p, miR-375	Down		
Plasma	RT-qPCR	miR-146a, miR-34a	Down	20	[42]
		miR-15a	Up	12	[53]
		miR-34c-5p	Up	233	[54]
	Nanostring (48) and RT-qPCR validation (48/37)	miR-142-3p, miR-15b-5p, miR-191-5p, miR-7g-5p, miR-let-7d-5p, miR-301a-3p, miR-545-3p	Down	48/48/37	[9]

Table 2. Circulating cell-free miRNAs reviewed as differentially expressed in body fluids for PD compared to control groups.

Body fluid	Methodology	MiRNA	Change	Cohort	Reference
CSF	NGS	miR-19a-3p, miR-19b-3p, let-7g-3p, miR-10a-5p, miR-136-3p, miR-873-3p, miR-431-3p, miR-433, miR-127-3p, miR-132-5p, miR-485-5p, miR-128, miR-409-3p, miR-370, miR-212-3p, miR-1224-5p, miR-4448	Up Down	145	[47]
	RT-qPCR-based array and RT-qPCR validation	miR-103a, miR-30b, miR-16-2, miR-26a, miR-331-5p, miR-153, miR-132-5p, miR-485-5p, miR-127-3p, miR-409-3p, miR-433, miR-370, miR-7g-3p, miR-873-3p, miR-136-3p, miR-10a-5p	Up	102	[45]
		miR-1, miR-22, miR-29, miR-374, miR-119a, miR-126, miR-151, miR-28, miR-301a, miR-19b-3p, miR-29c	Down		
Serum	NGS	miR-30e-3p, miR-30a-3p, miR-338-3p miR-16-2-3p, miR-1294	Up Down	145	[47]
	RT-qPCR-based array and RT-qPCR validation	miR-29a, miR-19b-3p, miR-29c	Down	30/60/130	[55]
		miR-24	Up	11/50	[56]
		miR-30c, miR-148b	Down		
	RT-qPCR	miR-29a, miR-29c, miR-19b-3p	Down	104	[57]
		miR-133b	Down	92	[58]
Plasma	Microarray and RT-qPCR	miR-505, miR-1826	Up	64/72/46	[59]; [60]
		miR-450b-3p, miR-626	Down		
	RT-qPCR-based array and RT-qPCR validation	miR-331-5p	Up	24/56	[61]

was miR-9. Its expression actually decreases with the increase of other markers of disease progression [47]. Moreover, miR-9 was significantly dysregulated in the hippocampus and temporal lobe neocortex of AD patients and, for this reason, it may play a pathological role in AD [35,69–71].

Despite the great potential of CSF regarding its proximity to the brain, the ability to identify biomarkers in less invasive procedures, for example, in blood tests, has been the focus of many studies [9,48,50,72]. Dong et al. proposed a panel of four miRNAs (miR-143, miR-146a, miR-31 and miR-93) as noninvasive blood serum biomarkers for AD diagnosis. These miRNAs were identified in a two-phase study using NGS for screening phase and hydrolysis probe-based RT-qPCR for validation [50]. Other studies used same approach and found more miRNAs' signatures in human serum that could potentially be used in order to discriminate AD patients from non-demented controls [51,52].

Instead of serum samples, Kumar et al. identified a 7-miRNA signature (all downregulated) in plasma samples (Table 1). This panel was able to differentiate AD subjects from normal controls with more than 95% accuracy. Beyond that, with the aim to identify potential pathways that were enriched for targets of these miRNAs, the authors performed a pathway analysis approach. They identified, among others, axonal guidance, actin cytoskeleton and clathrin-mediated endocytosis signaling pathways, all of them showing some pathological link to AD [9].

In addition to profiling analysis, numerous studies are based on selecting specific miRNAs based on candidate targets and related pathways in disease, as possible candidate biomarkers [41,54,73–75]. *APP* and *BACE1* genes encode amyloid precursor protein (APP) and β-secretase enzyme (BACE1), respectively. Both proteins are related to Aβ peptides accumulation in senile plaques [76]. Bioinformatic analysis revealed that miR-384 can potentially target the 3'-untranslated regions (UTRs) of APP and BACE1. Therefore, Liu et al. intended to evaluate the effects of miR-384 on APP and BACE1 expression and to assess the levels of miR-384 in AD patient's samples. They found serum/plasma, as well as CSF samples of AD patients had lower miR-384 levels, compared with the control group. Furthermore, transfection with miR-384 mimic oligonucleotide in primary mouse hippocampal neurons and SH-SY5Y cells decrease significantly both mRNA and protein

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

expression of BACE-1 and APP. All these findings lead them to suggest that miR-384 may play a role in the development of AD and may be a potential noninvasive biomarker for diagnosing AD [39].

The miR-210 modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, which is found in lower levels in AD patients [40,77]. Those decreased levels could result in brain injuries under hypoxia conditions by reducing brain angiogenesis, neuroprotection and brain microvascular permeability to nutrients [77]. Moreover, miR-210 regulates directly the expression of brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). This gene encodes a member of the nerve growth factor family of proteins, which is found overexpressed in AD individuals with slower cognitive decline [78,79]. Zhu et al. demonstrated by RT-qPCR that miR-210 levels were lower in the CSF and serum of AD patients compared to control group, and suggested its differential expression may affect disease processes [41].

Parkinson's disease

PD is the second most common neurodegenerative disorder after AD [80]. Its pathogenesis involves loss of neurons in the substantia nigra of the midbrain, especially those dopaminergic, and the presence of Lewy bodies/neuritis in various brain regions, causing motor dysfunctions and multiple non-motor clinical issues. Clinical diagnosis of PD is essentially based on four cardinal symptoms: tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability [81]. At the time of onset of these symptoms, necessary to establish the diagnosis, about 60%–70% of patient's dopaminergic neurons could be already lost. A laboratorial test able to detect PD is still not available; therefore, the availability of molecular biomarkers would facilitate diagnosis, especially if applicable in latent disease [59].

To date, there are only few studies identifying cell-free circulating miRNAs in body fluids of PD patients (Table 2) [47,55,56,57,58,59,60,61]. Khoo et al. found a 4-miRNA plasma signature by microarray and RT-qPCR methodologies. MiRNAs miR-1826/miR-450b-3p (pair), miR-626 and miR-505 were able to differentiate PD patients from a control group with predictive power of 91% sensitivity, a 100% specificity [59]. The authors tried to replicate these results using a new cohort in a validation study. They used an improved detection method (including a non-biased pre-amplification step in quantitative real-time PCR). However, the predictive power was lower compared with their previous study (83% sensitivity and 75% specificity) [60].

Cardo et al. also aimed to characterize plasma miRNA profile in PD patients and healthy controls in order to determine its usefulness as a PD biomarker. They searched for plasma candidate miRNAs by analyzing 384 miRNAs from three pools of PD patients and three pools of controls, using RT-qPCR-based array. They further evaluated the expression of seven miRNAs found as dysregulated (miR-181c, miR-331-5p, miR-193a-3p, miR-196b, miR-454, miR-125a-3p and miR-137) in 31 patients and 25 controls (including the pool samples). Only miR-331-5p was validated as PD-candidate biomarker. Bioinformatic analysis predicted several miR-331-5p target sites although none of them has been functionally validated. Among them, they highlighted those that were involved in molecular pathways associated with the nervous system [61]. In a similar approach, Vallelunga et al. identified and validated the low expression of serum miR-30c and miR-148b in PD patients ($N = 25$) in comparison with control group ($N = 25$) [56].

In addition to AD patients, Burgos et al. also evaluated the postmortem CSF and serum samples from the PD individuals [47]. They profiled 67 samples from PD subjects and 78 from neurologically normal controls using NGS. Several miRNAs were shown as dysregulated both in CSF and serum samples (Table 2). Regarding the CSF results, 14 miRNAs were downregulated, whereas three were upregulated in PD, compared to controls. Only five miRNAs were identified as differentially expressed in serum samples from PD patients (miR-30e-3p, miR-30a-3p and miR-338-3p upregulated, and miR-16-2-3p and miR-1294 downregulated) and none of them was present in the CSF samples. In conclusion, the authors suggested that although both body fluids have provided a good panel of miRNA that could differentiate cases from controls, the miRNAs detected in CSF were able to cluster patients slightly more effectively than miRNAs detected in serum [47].

Gui et al. evaluate exosomal miRNAs isolated from CSF of 47 PD patients and found sixteen miRNAs upregulated and 11 downregulated compared to control group (Table 2). From these, only miR-1 and miR-19b-3p were validated and significantly reduced in independent samples while the miRNAs miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p and let-7g-3p were significantly upregulated. Several pathways including the neurotrophin signaling, mTOR signaling, ubiquitin mediated proteolysis, dopaminergic synapse and glutamatergic synapse were predicted using DIANA-miRPath, a miRNA pathway analysis web-server [45].

The idiopathic form of PD comprises the majority of cases, although mutations in leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) gene has been related as the most frequent genetic causes of sporadic and familial late-onset PD [82]. Botta-Orfila et al. analyzed blood serum samples aiming to determine a miRNA profile from 10 idiopathic Parkinson's disease (IPD) patients, 10 PD patients' carriers of the *LRRK2* G2019S mutation (LRRK2 PD) and 10 controls by using RT-qPCR arrays. They found

four miRNAs downregulated of which miR-29a and miR-29c were identified for both IPD and LRRK2 PD groups, while miR-19b and -19a were less expressed specifically for IPD and LRKK2 PD, respectively. A combination of miR-29c, miR-29a and miR-19b was able to differentiate IPD from controls, with a sensitivity of 73% and specificity of 78% [55].

Fernandez-Santiago et al. identified miR-19b as less expressed in PD patients compared to controls, five years before the onset of motor symptoms. Rapid eye movement sleep behavior disorder (RBD) is considered a specific clinical marker of the prodromal stage of synucleinopathies (including PD), since risk for conversion is 38% at 6 years of follow-up [83]. In a longitudinal study, the authors evaluated the levels of miR-29c, miR-29a, miR-19a and miR-19b in RBD patients before and after the conversion to PD. According to previous study [55], these miRNAs were downregulated in diagnosed PD patients, compared to the control group. However, miR-19b levels started to decrease years before the conversion, suggesting this miRNA as a potential biomarker to predict, among RBD patients, those with higher chances to progress to PD [57].

Overlapped and specific miRNAs in neurodegenerative diseases

In a search for reliable miRNAs-signatures in ND using case-control studies, the miRNAs found as dysregulated may be related to common molecular mechanisms in neurodegeneration (e.g. dysfunction and destruction of synapses, neurite retraction and neuronal death [84]) rather than specific diseases pathways, difficulting the differential diagnosis. Table 3 shows some of the many cell-free circulating miRNAs revised in this article, highlighting those overlapping between AD and PD body fluids as well as those that were exclusives for each ND, including validated brain targets and related pathways. Since relatively few studies search for circulating cell-free miRNAs in ND published so far, the vast majority of overlapped miRNAs are from the Burgo's study [47], which analyzed samples from both AD and PD patients.

The miRNA miR-29a has already been shown as upregulated in AD CSF [37,42], as well as downregulated in the serum of AD and PD patients [48,55,57] (Tables 1 and 2). Besides body fluids, miR-29a was found downregulated in AD and upregulated in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) brains, another type of neurodegenerative condition (although the results were not validated by RT-qPCR for ALS) [85]. Neuron navigator 3 (*NAV3*) gene was predicted as one of the miR-29a targets and is largely expressed in the nervous system. Also, Shioya et al. investigated, by immunohistochemistry, that the *NAV3* mRNA immunolabeling was most intense in neurons presenting with degenerating morphology in AD brains, suggesting that underexpression of miR-29a affects neurodegenerative processes by upregulating NAV3 and possibly other miR-29a targets in AD brains [85]. Roshan et al. suggested miR-29a as an important determinant of neuronal cell survival in the brain, since miR-29a knockdown mice brains showed massive cell death in large regions of the hippocampus and cerebellum by several fold upregulation of voltage-dependent anion channel1 (*VDAC1*) mRNA [86]. *VDAC1* is known by its contribution to apoptosis, even though the exact mechanism needs to be elucidated [104]. The miR-29a was also predicted to be involved in the regulation of the *REST* gene, which is implicated in Huntington's disease (HD) pathology [87].

Like miR-29a, the miR-132 was also found as aberrantly expressed both in AD and PD body fluids (Tables 1 and 2) and previously reported as an important regulator of the onset of synaptic integration in newborn neurons, and in cortical synaptic transmission and synaptic plasticity in knockout mice [105,106]. Lack of miR-132 leads to a reduced dendritic complexity and spine density while overexpression has the opposite effect. A significant increase in the survival of newborn neurons was also demonstrated when a timely directed overexpression approach was used [106]. Other relevant study regarding miR-132 was conducted by Yang et al. They showed that miR-132 participates in the differentiation of embryonic stem cells in dopamine neurons by directly regulating the expression of Nurr1 [89]. This important transcription factor has already been described as critical in the development and maintenance of the midbrain dopaminergic system, and its dysfunction may have a pathological role in PD [107].

Considering that many miRNAs could be involved in common neurodegeneration mechanisms, one good approach for differential diagnosis is to search for specific miRNA dysregulation in disease-related pathways. The evidence that a single miRNA can influence several target genes in many pathological processes may complicate but not invalidate this attempt.

Proteolytic cleavage of APP by β- and γ-secretases results in Aβ peptide accumulation in the brain of AD patients and increased expression of APP, specifically associated with AD pathogenesis [108]. Expression of miR-101 was found downregulated in the anterior temporal cortex of sporadic AD brains [69,109] and miR-9 in the cortex, hippocampus and cerebellum [35,69]. Both miR-101 and miR-9 are known for regulating the APP pathway in AD brains (*APP* and *BACE1* gene targets, respectively) (Table 3). Inhibition of endogenous miR-101 increased APP levels, whereas miR-101 overexpression significantly reduced APP and Aβ deposition in rat hippocampal neurons [96]. This interaction of miR-101 and APP was demonstrated in human cell

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Table 3. Validated brain targets and related pathways of the circulating cell-free miRNAs surveyed as dysregulated exclusively in body fluids (BF) of AD or PD patients and those differentially expressed in both ND.

BF	miRNA	Validated brain targets	mRNA pathways (ND)	References
AD/PD	miR-29a	*NAV3, VDAC1, REST, BACE1*	Neurodegeneration (AD); neurite growth and neuronal connectivity (HD); beta-amyloid peptide accumulation (AD)	[69, 85–87]
	miR-29c	*DNMT3a*	Promoter of ischemic brain damage	[88]
	miR-132	*REST, NURR1, MAPT, SIRT1*	Neurite growth and neuronal connectivity (HD); dopamine neuron development and differentiation (PD); tau protein hyper-phosphorylation (DA)	[87, 89, 90]
	miR-433	*FGF20*	Survival of dopaminergic neurons (PD)	[91]
	miR-151	*NTRK3*	Modulator in the synaptic plasticity	[92]
	miR-10a	*SFRS1*	Neural differentiation	[93]
AD	miR-9	*BACE1, SIRT1*	Beta-amyloid peptide accumulation, tau protein post-translational modification (DA)	[69, 94]
	miR-384	*APP, BACE1*	Beta-amyloid peptide accumulation (DA)	[39]
	miR-219	*MAPT*	Represses tau synthesis at the post-transcriptional level (DA)	[95]
	miR-210	*VEGFA, BDNF*	Brain injuries under hypoxia, cognitive decline (DA)	[78, 79]
	miR-101	*APP, COX-2*	Beta-amyloid peptide accumulation, neuroinflammation (DA)	[96]
	miR-124	*BACE1*	Beta-amyloid peptide accumulation (DA)	[97]
	miR-34a	*MAPT*	Tau protein hyper-phosphorylation (DA)	[98]
PD	miR-133b	*PITX3*	Regulator of dopamine neurons (PD)	[99, 100]
	miR-153	*SNCA*	α-synuclein inclusions in Lewy Bodies (PD)	[101]
	miR-19a	*NEUROG1*	Inhibition of neuronal differentiation	[102]
	miR-19b	*RNF11*	Negative regulator of NF-κB and modulates neuronal response to toxicity (PD)	[103]

cultures too, suggesting a possible role for miR-101 in neuropathological conditions [110]. Besides Aβ pathway, miR-9 is also involved in the regulation of one member of a deacetylase family, *SIRT1* [94]. The reduction of Sirt1 mRNA correlates with the accumulation of hyperphosphorylated tau aggregates [111].

Since Aβ and tau aggregates are central players in the pathways implicated in AD, investigating miR-101 and miR-9 expression in body fluids, as showed in previous studies [47,51], can be useful to complete the miRNA-based signature for AD pathology. A similar approach can be used for miR-133b and PD differential diagnosis, since this miRNA was implicated in the differentiation and/or maintenance of dopaminergic neurons and was shown as downregulated in PD mouse models and in the sporadic PD brain (reviewed in [112]). The miR-153 is also involved in PD-related pathways and is upregulated in PD CSF patients [45]. This miRNA is expressed predominantly in the brain and was identified as playing a tuning role in the amount of alfa synuclein produced by binding to the 3′-UTR of α synuclein gene (*SNCA*) (Table 3), downregulating its mRNA and protein levels in the brain [101]. Alpha synuclein is a major component of Lewy bodies and an important hallmark of PD [113].

Another good approach for differential diagnosis is to search for miRNAs that are enriched in neurons of distinct brain areas characterized by pathological processes, as the hippocampus for AD and midbrain for PD [114].

Despite the increasing number of studies searching for circulating cell-free miRNAs in body fluids, miRNAs found as differentially expressed in the same ND is often discordant. Only 17 of 120 miRNAs reviewed for AD and 13 of 48 for PD were found as dysregulated in more than one reference. Besides, 13 miRNAs were in disagree regarding the direction of dysregulation (over- or downregulated) for the same body fluid in AD results. The lack of reproducibility can be attributable to many variables as the size and homogeneity of study population, including age, sex, ethnicity and the stage of diseases; selection of adequate controls; analytical methods, i.e. NGS, microarray or RT-qPCR; and different methods of normalization. In addition, results obtained by Satoh et al (2015), suggested data processing as a major factor affecting miRNA-panel results [115]. Standardized laboratory procedures and more studies evaluating quantitative miRNA expression obtained by different platforms [28] will be necessary to overcome these problems.

Even though array-based methodologies have been largely used for miRNAs profiling, it is important to point out that miRNAs found as aberrantly expressed in body fluids, especially in the blood stream, could be involved in several pathological processes (e.g. carcinogenesis) from different organs and, possibly, be selected as potential biomarkers for ND [116]. For validation, selecting miRNAs that are brain-enriched [117] or acting in disease-related pathways, increases the chances that

the differential expression of the miRNAs in the blood reflects brain-related processes [4].

There are few studies profiling miRNAs in more than one kind of neurodegenerative disease [47,85,118]. This allows a reliable comparison of the results in different disease groups, by similarity in sample collection, analytical methods and bioinformatic analysis. This experimental delineation will be crucial in order to discover miRNAs involved in common neurodegeneration pathways as well as those disease-related, and might be useful in early diagnosis of different types of ND, as AD and PD.

Conclusions and perspectives

ND include several central nervous system disorders characterized by the progressive loss of neural tissues, being AD and PD the most prevalent among the elderly. After cell death, the central nervous system cannot regenerate and for this reason, a cure for the ND is difficult after the disease progression to final stages [1]. Several attempts of anti-AD therapies failed using late-stage clinical cases [119–121]. With this in mind, achievement of the diagnosis as soon as possible is important once allows better patient's management, and more possibilities in discovering new treatments. MiRNA-based diagnosis has been used for this purpose including some studies that assess AD and PD patients in presymptomatic phases [57,117].

Therefore, circulating cell-free miRNAs can be considered as a tool for AD and PD diagnosis once they reflect the pathological process occurring in the brain tissue and have been described as differentially expressed in patients versus controls. However, to reach clinical practice, there is a real need in standardizing methodologies and analyses in order to assure easy accessibility, high specificity and sensitivity at low costs. In addition, more studies are necessary to define a miRNA-based signature that allows not only the detection of a degenerative process before the onset of clinical symptoms, but also differential diagnosis between AD and PD.

Declaration of Interest

The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

References

1. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, et al. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. Molecules 2014;19:6891–910.
2. Robinson L, Tang E, Taylor J-P. Dementia: timely diagnosis and early intervention. Bmj. 2015;350:1–6.
3. Jin XF, Wu N, Wang L, et al. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. Cell Mol Neurobiol 2013;33:601–13.
4. Sheinerman KS, Umansky SR. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. Frontiers Cell Neurosci 2013;7:1–10.
5. Atkinson AJJ, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001;69:89–95.
6. Henley SMD, Bates GP, Tabrizi SJ. Biomarkers for neurodegenerative diseases. Curr Opin Neurol 2005;18:698–705.
7. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genetics 2008;9:102–14.
8. Etheridge A, Gomes CPC, Pereira RW, et al. The complexity, function, and applications of RNA in circulation. Frontiers Genetics 2013;4:1–8.
9. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. PLoS One 2013;8:1–10.
10. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. Clin Chem 2008;54:482–90.
11. Katoh M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases. Frontiers Cell Dev Biol 2014;2:61.
12. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2013;65:1324–34.
13. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucl Acids Res 2011;39:7223–33.
14. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. Trends Biochem Sci 2012;37:460–5.
15. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids – the mix of hormones and biomarkers. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:467–77.
16. Wang W-T, Chen Y-Q. Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. J Hematology Oncol 2014;7:1–9.
17. Rao P, Benito E, Fischer A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. Frontiers Mol Neurosci 2013;6:1–13.
18. Duy J, Koehler JW, Honko AN, et al. Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. BMC Genomics 2015;16:1–9.
19. Burgos KL, Javaherian A, Bomprezzi R, et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. RNA 2013;19:712–22.
20. Li Y, Kowdley KV. Method for microrna isolation from clinical serum samples. Anal Biochem 2012;431:69–75.
21. Brunet-Vega A, Pericay C, Quilez ME, et al. Variability in microRNA recovery from plasma: comparison of five commercial kits. Anal Biochem 2015;488:28–35.
22. Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. Mutation Res 2011;717:85–90.
23. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. Frontiers Genetics 2013;4:1–8.
24. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, et al. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. J Cell Mol Med 2014;18:371–90.

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

APÊNDICE 2

Tabela 1 – miRNAs diferencialmente expressos entre as comparações no soro e LCR do mesmo grupo.

	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DA_S x DA_L	hsa-miR-142-5p	0,021	2,10E-05
	hsa-miR-125a-5p	3,66	0,00018
	hsa-miR-29b-2-5p	12,85	0,00034
	hsa-miR-708-5p	5,62	0,0018
	hsa-miR-26a-5p	2,54	0,0037
	hsa-miR-203a-5p	0,071	0,0038
	hsa-miR-205-5p	0,48	0,0067
	hsa-miR-342-3p	3,11	0,0095
	hsa-miR-16-5p	0,50	0,035
	hsa-let-7b-5p	0,45	0,042
	hsa-miR-143-3p	3,38	0,046
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DCL_S x DCL_L	hsa-miR-335-5p	0,011	3,45E-04
	hsa-miR-455-3p	0,01	0,00054
	hsa-miR-193b-3p	0,01	0,00151
	hsa-miR-31-5p	0,01	0,0033
	hsa-miR-106b-5p	0,02	0,0057
	hsa-miR-30d-5p	11,895	0,0066
	hsa-miR-744-5p	0,02	0,0088
	hsa-miR-4508	0,02	0,0136
	hsa-miR-423-3p	0,03	0,015
	hsa-miR-193b-5p	0,03	0,022
	hsa-miR-708-5p	15,44	0,028
	hsa-miR-152-3p	0,041	3,13E-02
	hsa-miR-4492	0,03	0,03958
	hsa-miR-190a-5p	0,04	0,04768
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
DPD_S x DPD_L	hsa-miR-215-5p	0,040	4,63E-04
	hsa-miR-22-3p	13,71	0,00251
	hsa-miR-574-3p	13,66	0,00493
	hsa-miR-197-3p	13,00	0,0067
	hsa-miR-660-5p	10,03	0,0146
	hsa-miR-195-5p	2,211	0,0365
	miRNA	***Fold Change***	**Valor de p**
CTRL_CS x CTRL_HPN	hsa-miR-93-5p	8,435	3,43E-03
	hsa-miR-205-5p	2,32	0,02531