

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NICOLI RAMOS WEGNER

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miR-9 EM SORO DE PACIENTES COM  
DOENÇA DE ALZHEIMER

CURITIBA  
2016

NICOLI RAMOS WEGNER

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miR-9 EM SORO DE PACIENTES COM  
DOENÇA DE ALZHEIMER

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

Orientador: Prof Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues  
de Souza

Co-orientadora: Meire Silva Batistela

CURITIBA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais essa etapa concluída em minha vida.

Ao meu orientador Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, pela paciência e atenção.

Aos meus pais, Loreci e Edson por todo esforço, apoio e amor incondicional que sempre me proporcionaram.

A Meire, por ser tão atenciosa e ter me apresentado aos miRNAs.

A todo pessoal do Laboratório de Polimorfismo e Ligação, por sempre estarem disposto a ajudar.

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais comum na população senil e é responsável por mais da metade dos casos de neurodegeneração nessa faixa etária. Os indivíduos com essa patologia apresentam prejuízos principalmente nas funções cognitivas, sendo a memória a mais afetada. Atualmente o diagnóstico é apenas clínico e ocorre em sua grande maioria tardiamente. Na clínica os fármacos utilizados são direcionados apenas aos sintomas, uma vez que, até o momento, não existem medicamentos capazes de impedir a progressão da doença (morte neuronal), o que se deve em parte ao fato de que os mecanismos moleculares não são totalmente compreendidos. O estudo dos microRNAs (miRNAs) pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia da doença. Os miRNAs são pequenos RNAs (~22nt) não codificadores, capazes de regular a expressão gênica pós transcricionalmente. Desempenham papéis importantes em vias relacionadas ao desenvolvimento embrionário, envelhecimento cerebral, desenvolvimento neuronal e são associados a doenças neurodegenerativas como DA. Os miRNAs estão presentes em diversos tecidos e são estáveis nos biofluidos através dos quais circulam pelo organismo. Em estado patológico sua expressão é alterada, o que é refletido em sua concentração, a qual pode ser detectada nos biofluidos, como liquor, sangue, urina e saliva. Entre os diversos miRNAs que vem sendo estudados, o miR-9 é um candidato promissor. Está relacionado a importantes processos biológicos como neurogênese, diferenciação celular e glioblastomas, também há diversos estudos que mostram sua concentração alterada em DA. O objetivo deste trabalho é analisar a expressão do miR-9 em soro de pacientes e controles. Foram utilizados 50 indivíduos, 39 pacientes com DA e 11 idosos cognitivamente saudáveis. Os miRNAs presentes nas amostras foram extraídos, retrotranscritos e quantificados pelo método RT-qPCR. Através da comparação do Fold Change (FC), verificou-se que o miR-9 é significativamente mais expresso em soro de pacientes com DA quando comparado ao controle, resultado que corrobora com estudos anteriores. Também foi realizada a predição dos genes alvos do miR-9, *BACE1*, *REST* e *NF-kB* estão entre as centenas de alvos do miR-9 e podem estar envolvidos no processo de neuroinflamação e neurodegeneração.

Palavras-chaves: miR-9. Alzheimer. Demência

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	6
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
2.1	Demências .....	8
2.1.1	Definição.....	8
2.1.2	Classificação.....	9
2.1.3	Doença de Alzheimer .....	10
2.2	MicroRNAs .....	13
2.2.1	Aspectos Gerais .....	13
2.2.2	Biogênese e regulação da função .....	13
2.2.3	Mecanismo de silenciamento dos miRNAs.....	15
2.2.4	miRNAs circulantes .....	16
2.2.5	miR-9.....	16
2.2.6	Métodos de Detecção dos miRNAs .....	18
3.	JUSTIFICATIVA .....	20
4.	OBEJTIVOS .....	22
4.1	Geral: .....	22
4.2	Específicos:.....	22
5.	METODOLOGIA.....	23
5.1	Amostras .....	23
5.2	Extração do RNA total.....	23
5.3	Produção do cDNA.....	23
5.4	PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	24
5.5	miR-16 como controle endógeno .....	25
5.6	Método $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	25
5.7	Análise estatística .....	26
5.8	Análise dos mRNAs alvos do miR-9.....	26
6.	RESULTADOS .....	27
6.1	Expressão alterada do miR-9 em soro de pacientes com DA .....	27
6.2	CT e FC das amostras .....	28
6.3	CT médio miR-9 e CT médio miR-16 .....	29
6.4	Predição dos alvos do miR-9 .....	31
7.	DISCUSSÃO .....	32

7.1	Expressão do miR-9.....	33
7.2	miR-9 e genes relacionados.....	34
8.	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXOS .....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Placa senil e emaranhados neurofibrilares no hipocampo.....	11
Figura 2 -	A biogênese dos miRNAs. ....	14
Figura 3-	Esquema da interação do miRNA com o mRNA alvo .....	15
Figura 4-	Gráfico do FC do grupos DA e CI. ....	27
Figura 5-	Gráfico com os valores de CT do miR-9 para o grupo DA e controle. ....	30
Figura 6-	Gráfico com os valores de CT do miR-16 para o grupo DA e controle. ....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estudos de expressão do miR-9 em soro e LCR de pacientes com DA. ...	18
Tabela 2-	Valores de CT e FC do miR-9 e do miR-16 FC.....	28
Tabela 3-	Média do CT para o miR-9 e miR-16 para grupo DA e CI.....	29
Tabela 4-	Principais genes alvos do miR-9. ....	31

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é responsável pela maioria dos casos de demência na população senil e caracteriza-se como uma desordem neurodegenerativa progressiva (BASAVARAJU ; LENCASTRE 2016). Apresenta um início insidioso e a memória é a função cognitiva mais afetada (ALLEGRI *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002). Nos estágios iniciais geralmente o paciente apresenta perda de memória episódica e dificuldades na aquisição de novas habilidades, com a evolução da doença outras funções cognitivas, como cálculo, raciocínio abstrato e habilidades visuo-espaciais são prejudicadas (GALLUCCI-NETO *et al.*, 2005). O diagnóstico é clínico e auxiliado por testes e exames complementares, no entanto a confirmação de DA é alcançada apenas após o óbito a partir do exame histopatológico (GALLUCCI-NETO *et al.*, 2005). As intervenções farmacológicas utilizadas tratam apenas os sintomas clínicos, uma vez que, até o momento, não existem medicamentos capazes de impedir a progressão da doença (morte neuronal).

Apesar de a DA ser uma patologia cada vez mais comum e presente na sociedade, o entendimento dos seus aspectos genéticos e moleculares não está completamente elucidado, o que gera dificuldades no diagnóstico e no desenvolvimento de formas de tratamento efetivo.

Novas moléculas vêm sendo estudadas objetivando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese e progressão da doença, um exemplo são os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs (~22nt) não codificadores, capazes de regular a expressão gênica de animais e plantas, pela repressão da tradução ou degradação de mRNAs alvos (BARTEL *et al.*, 2004). Apesar da regulação pelos miRNAs a nível pós transcricional ser a mais comum e melhor entendida, foi visto nos últimos anos que os miRNAs tem a capacidade de ativar a expressão gênica direta ou indiretamente em resposta a diferentes tipos celulares e/ou em condições e na presença de cofatores específicos, exemplificando uma maneira pré-transcricional de regulação (ORANG; SAFARALIZADEH; BAVILI; 2014).

Os miRNAs têm sido relacionados à regulação de genes e vias associadas a doenças neurodegenerativas (LIU *et al.*, 2012) e vários miRNAs já foram identificados com sua expressão desregulada na DA, diversos deles implicados na regulação de genes chaves, incluindo o *APP* e *BACE1* (TAN *et al.*, 2013), cujas proteínas/enzimas participam da cascata amilóide que resulta na deposição de proteínas com ação neurotóxicas. O miR-9 encontra-se abundantemente no cérebro e está associado a importantes processos biológicos como: morfogênese, neurogênese, proliferação celular e glioblastoma (QIU;TAN.;ZENG.;2015). Sua concentração é significativamente alterada durante o envelhecimento e exibe uma mudança específica no seu perfil de expressão em diferentes regiões do cérebro de pacientes com DA. Na doença apresenta-se mais abundante no neocórtex, sugerindo algum tipo de papel regulatório no processo neurodegenerativo (SETHI *et al.*, 2009).

Os estudos envolvendo os miRNAs cresceram nos últimos anos, e a identificação dos miRNAs presentes no soro parece ser uma abordagem promissora devido: 1) a facilidade de acesso à amostra de sangue; 2) ao emprego de novos métodos de detecção cada vez mais sensíveis como a RT-qPCR; 3) ao fato de serem relativamente estáveis e seu perfil de expressão sofrer alteração em condições patológicas. Sendo assim o presente trabalho visa investigar a concentração do miR-9 em soro de pacientes com DA, para verificar se existe alteração em sua expressão, tendo em vista que as alterações fisiopatológicas que ocorrem no cérebro podem ser detectadas através dos miRNAs circulantes uma vez que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, via exossomos e circular no organismo através do sangue (soro).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Demências

#### 2.1.1 Definição e aspectos gerais

Demência ou Transtorno Neurocognitivo Maior é uma síndrome clínica caracterizada pelo declínio progressivo em múltiplos domínios cognitivos, de forma a comprometer as atividades sociais e ocupacionais do indivíduo acometido (NETO *et al.*, 2005; KNOPMAN *et al.*, 2001; FROTA *et al.*, 2011). Difere-se do Retardo Mental por ser uma condição adquirida e do *Delirium* pela sua persistência (FORNARI *et al.*, 2010).

De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana (DSM-IV), demência pode ser definida como uma síndrome na qual ocorre declínio da memória associado a déficit de pelo menos uma outra função cognitiva (linguagem, gnosis, praxias ou funções executivas) de forma a interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo (APA, 1994). Na quarta versão do Manual, para que a doença fosse classificada como demência era necessário que houvesse o comprometimento da memória (FROTA *et al.*, 2011), porém, esses critérios foram revistos na quinta versão (DSM-V) lançada em 2010, a qual propõe que para um indivíduo ser diagnosticado com demência não é necessário comprometimento da memória como via de regra e sim de dois ou mais domínios cognitivos (APA, 2013). Essa alteração aumentou a possibilidade de diagnóstico, visto que em algumas formas de demência como a Demência Fronto-Temporal a memória pode estar relativamente preservada nas fases iniciais (MCKHANN *et al.*, 2011).

Além do comprometimento cognitivo o indivíduo com demência pode apresentar distúrbios emocionais e de comportamento como: alteração de humor (sintomas depressivos, euforia e instabilidade emocional), delírios, alucinações,

apatia, irritabilidade, desinibição, ansiedade, reações catastróficas, agressividade verbal e física, comportamento estereotipado, andar incessante, insônia, alterações no apetite e do comportamento sexual (CARAMELLI *et al.*, 2002).

As demências em geral são prevalentes em indivíduos em idade avançada, mas podem afetar pacientes em idade não senil (ALZHEIMER'S SOCIETY, 2016). Um estudo de meta-análise realizado por Prince *et al.*, (2013) estimou a prevalência de Demência em pessoas acima 60 anos no ano de 2010 e verificou diferentes porcentagens ao redor do mundo. Na Ásia a prevalência foi de 3,9%, na Europa 6,2%, nas Américas 6,5%, sendo 7% na América do Sul e 2,6% na África. O estudo também concluiu que ocorre um aumento exponencial de casos de demência com o aumento da idade e que a prevalência de demências é maior em mulheres quando comparadas aos homens, ambos em idade avançada (PRINCE *et al.*, 2013). Uma possível explicação para a maior incidência de demências em mulheres seria a maior expectativa de vida do sexo feminino e não por elas apresentarem algum fator de risco específico (HEBERT *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Classificação e diagnóstico

As demências podem ser classificadas de várias formas. Uma das maneiras diz respeito a sua reversibilidade. Dentro dessa classificação, as demências são 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, doenças infecciosas (sífilis e tuberculose), hidrocefalia de pressão normal, tumores, álcool, intoxicação medicamentosa e insuficiência renal, hepática, pulmonar e adrenal. Esse tipo de demência se for devidamente tratada têm grande chance de ter seu quadro revertido (BRUCKI *et al.*, 2011). As demências ditas irreversíveis são neurodegenerativas e progressivas, nesse grupo estão: a Doença de Alzheimer (DA), Demência por Corpos de Lewy (DCL), Demência Fronto Temporal (DFT), Demência Vascular (DV) e Demência Mista (DM) (FORNARI *et al.*, 2010).

O diagnóstico das demências é clínico, realizado através de uma avaliação cognitiva e funcional (ABREU, *et al.*, 2005). Para a avaliação cognitiva é utilizado o Mini-exame do estado mental (MEEM) (FOLSTEIN *et al.*, 1975) que serve como um teste de rastreio. O PFEFFER avalia as atividades de vida diária do paciente

(FORNARI *et al.*, 2010). Para classificar o grau de demência utiliza-se o Clinical Dementia Rating (CDR) desenvolvido inicialmente por Hughes *et al.*, (1982) e adaptado por Morris., (1993), o qual abrange as seguintes categorias: nenhuma, questionável, leve, moderada e grave (MORRIS, 1993).

Os exames laboratoriais auxiliam no diagnóstico e possibilitam identificar causas reversíveis de demência. Os exames incluem hemograma, níveis séricos de vitamina B12, reação sorológica para sífilis, função tireoidiana, hepática e renal (KNOPMAN *et al.*, 2001). A Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM) também amparam o diagnóstico, através de neuroimagens que podem revelar alterações nas estruturas cerebrais (BARBOSA *et al.*, 2002).

### 2.1.3 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a neurodegeneração mais comum na população em idade senil, responsável por mais da metade dos casos de demência na faixa etária igual ou superior a 65 anos (HERRERA-JUNIOR *et al.*, 1998). Macroscopicamente a DA se caracteriza por atrofia predominantemente cortical, sendo mais acentuada no lobo temporal, principalmente na formação do hipocampo. A atrofia leva ao aumento dos sulcos e fissuras e redução dos giros. Diferentes áreas corticais são comprometidas, mas não de forma simultânea. As áreas límbicas, paralímbicas e do córtex de associação são comprometidas desde os estágios iniciais da doença, já o córtex motor, o visual e o auditivo, por exemplo, são afetados em um curso mais avançado (BRUCKI *et al.*, 2011).

Microscopicamente, o cérebro de um paciente com DA apresenta redução no número de neurônios e de sinapses somados a duas alterações características da doença: formação de placas senis (deposito extracelular de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ )) e os emaranhados neurofibrilares (NFTs) (formados por acúmulo intracelular de proteína *tau* hiperfosforilada (p-tau))(REITZ *et al.*, 2011) (Figura 1).

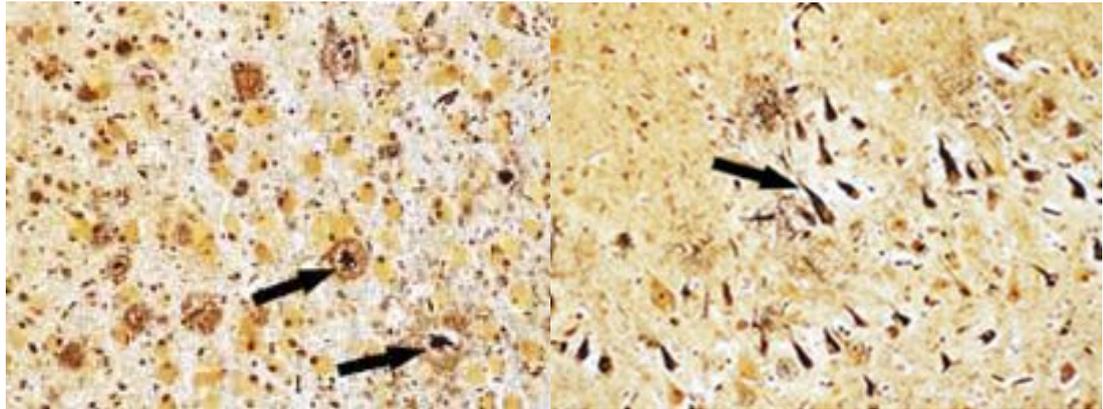


Figura 1- Placa senil (esquerda) e emaranhados neurofibrilares no hipocampo (direita). Disponível em < <http://www.alzheimermed.com.br/conceitos/neuropatologia>>. Acesso em 14/06/2016.

A etiologia da DA ainda não está completamente elucidada, atualmente há duas teorias. A primeira delas é chamada “Hipótese da cascata do amiloide” (HCA) que considera a deposição de A $\beta$  como o gatilho patológico inicial da doença. Na sequência ocorre a formação de NFTs, morte celular e conseqüente demência. Esta hipótese presume que a deposição de A $\beta$  pode explicar a patogênese de todos os tipos de DA (familiar e esporádica) (REITZ, 2012). No entanto, o mecanismo da causa das lesões pelo A $\beta$  nos neurônios ainda não está nitidamente definido (DE FELICE *et al.*, 2004).

A segunda teoria é chamada “Hipótese colinérgica da doença de Alzheimer”. Nesta, a degeneração de neurônios no núcleo basal de Meynert (projeções colinérgicas para o neocórtex) ocorre no início da doença e pode contribuir de forma significativa para o declínio cognitivo característico de pacientes com DA (WINKLER *et al.*, 1998). Essa disfunção colinérgica pode não estar diretamente relacionada com o prejuízo cognitivo da doença, interferindo de forma indireta com o processamento da atenção (FRANCIS *et al.*, 1999).

Na clínica, a DA apresenta um início insidioso com deterioração progressiva. A memória é a função cognitiva mais afetada. Nos estágios iniciais, geralmente o paciente apresenta perda de memória episódica e dificuldades na aquisição de novas habilidades. Com a evolução da doença outras funções cognitivas, como cálculo, raciocínio abstrato e habilidades visuo-espaciais são prejudicadas (GALLUCCI-NETO *et al.*, 2005). O paciente apresenta pobre julgamento e planejamento, dificuldade em completar tarefas (declínio das funções executivas), apraxia, alterações do ciclo sono-vigília, alterações comportamentais (irritabilidade e agressividade) e sintomas psicóticos. Nas fases mais avançadas da doença o

indivíduo tem incapacidade de deambular, falar e realizar cuidados pessoais (GALLUCCI-NETO *et al.*, 2005). Estudos demonstram que, em média, o paciente com DA diminui de 3 a 3,5 pontos anualmente na escala do MEEM (HAN *et al.*, 2000).

Geneticamente a doença de Alzheimer é dividida em duas formas: 1) Familiar (*early-onset familial AD* (EOFAD)) com herança Mendeliana e predominantemente de início precoce (antes dos 60 anos de idade) 2) Esporádica (*late-onset AD* (LOAD)) com menor ou nenhuma agregação familiar, ocorrendo geralmente em idade mais avançada (após os 60 anos de idade) (REITZ *et al.*, 2011).

A DA de início precoce pode ser explicada por mutações nos genes da *PSEN1* (presenilina 1) *PSEN2* (presenilina 2) e *APP* (precursor da proteína beta amiloide). A DA de início tardio (95% dos casos de DA) é uma doença multifatorial, assim apresentando vários fatores que juntos contribuem para o seu aparecimento. Entre os fatores genéticos, o alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE* é o que apresenta maior importância, este alelo está associado ao aumento do risco à doença. Porém, mesmo em indivíduos homocigotos para este gene, o desenvolvimento da DA não é uma certeza (LAWS *et al.*, 2003).

Na DA esporádica a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (BACHMAN *et al.*, 1993). Outros fatores biológicos e ambientais que ao interagirem podem contribuir para o surgimento da doença são: alterações no material genético (polimorfismos em genes relacionados), nível de escolaridade, presença de lesões traumáticas, estresse oxidativo e uso de drogas (HARDUY 1997; SMALL 1998). O uso de anti-inflamatórios não esteroides, consumo de vinho e café e também a prática de atividade física de forma regular são considerados fatores de proteção para DA (LINDASAY *et al.*, 2002).

Atualmente não existem drogas no mercado que tenham o peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) ou a proteína *tau* como alvos. O tratamento é apenas sintomático, os fármacos utilizados têm como alvo o sistema colinérgico e glutamatérgico, já que em DA ocorre a redução dos níveis de acetilcolina e aumento da atividade do glutamato (CASEY *et al.*, 2010). Os inibidores colinesterásicos (galantamina, donepezil e rivastigmina) são utilizados nas fases leve e moderada, os antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA (memantina) nas fases moderada e grave da doença (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

## 2.2 MicroRNAs

### 2.2.1 Aspectos Gerais

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores responsáveis por regular a expressão gênica pós-transcricionalmente. Possuem o tamanho de aproximadamente 20 nucleotídeos e ligam-se as regiões 3'UTR, sequência codificadora ou 5'UTR de seus mRNA alvos, levando a inibição da tradução ou a degradação da molécula alvo (ALMEIDA *et al.*, 2011). Apesar da regulação pelos miRNAs a nível pós transcricional ser a mais comum e melhor entendida, foi visto nos últimos anos que os miRNAs tem a capacidade de ativar a expressão gênica direta ou indiretamente em resposta a diferentes tipos celulares e/ou em condições e na presença de cofatores específicos, exemplificando uma maneira pré-transcricional de regulação (ORANG; SAFARALIZADEH; BAVILI; 2014).

Estima-se que 30% do genoma codificador de proteínas tenha sua função regulada pelos miRNAs (FILIPOWICZ *et al.*, 2008). Já foram descritas 2.600 sequências de miRNAs maduros (miRBase datase, versão 21). Estudos funcionais indicam que os miRNAs participam de importantes processos celulares dos seres humanos como a diferenciação e a proliferação celular. Em patologias como cânceres e desordens neurológicas a concentração dessas moléculas encontra-se alterada (FILIPOWICZ *et al.*, 2008; FELEKKIS *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2011).

Resultados experimentais e abordagens computacionais indicam que um determinado miRNA é capaz de silenciar centenas de mRNAs (SELBACH *et al.*, 2008). Estudos mostram que há processos do desenvolvimento que são regulados por um único miRNA específico, porém a grande maioria é regulado por vários miRNAs, que separadamente causam um efeito modesto mas que em conjunto levam a alterações no fenótipo celular (BAEK *et al.*, 2008; SELBACH *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são transcritos praticamente da mesma maneira que os genes codificadores para proteínas. A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, e uma menor fração deles que se localiza dentro de regiões de repetição no genoma são transcritos pela RNA polimerase III (LEE *et al.*, 2004). Os transcritos primários (pri-miRNAs) chegam a medir milhares de nucleotídeos e são

modificados de maneira similar ao que ocorre com os transcritos que codificam para proteínas. É feita a adição do 5'cap e da cauda poli A na extremidade 3'. O pri-miRNA é processado primeiramente no núcleo pela RNase III, Drosha e então como pre-miRNA é exportado para o citoplasma, onde será clivado pela enzima Dicer, que gera uma fita de aproximadamente 22nt, fita dupla (WINTER et al., 2009).

Esse pequeno RNA dupla fita se liga ao complexo chamado miRISC (complexo de silenciamento induzido por miRNAs) com a proteína Argonaute (AGO) como um de seus componentes (KROL et al., 2010). Na sequência, 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 o silencia (DJURANOVIC et al., 2011) (Figura 2).

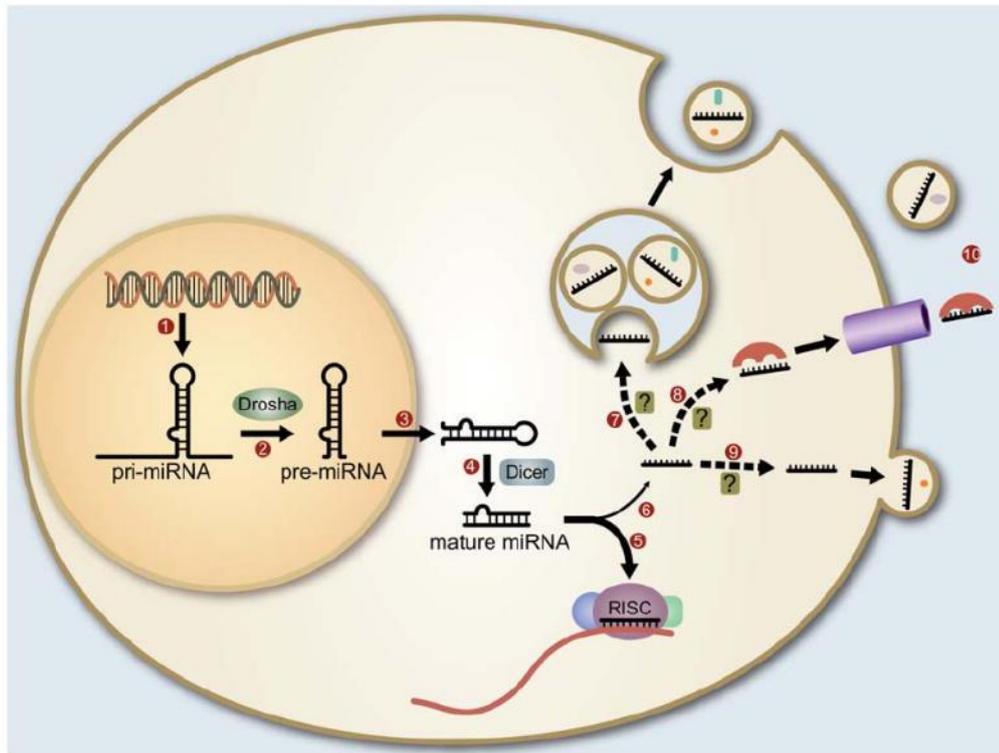


Figura 2 - A biogênese dos miRNAs. 1) Transcrição do pri-miRNA pela RNA pol II ou III. 2) No núcleo, os pri-miRNAs são processados pela Drosha produzindo grampos de pre-miRNAs 3) os quais são exportados ao citosol 4) pre-miRNAs são processados pela Dicer em uma fita dupla de miRNA maduro de 19-24 nucleotídeos. 5) Uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo RISC onde pode regular a expressão de mRNAs alvos. 6) A outra fita será degradada ou possivelmente preparada para ser exportada da célula. 7) Alguns miRNAs são encontrados empacotados em exossomos 8) exportados na presença de proteínas ligadoras ou 9) em micropartículas 10) Uma vez

no espaço extracelular os miRNAs podem ser importados por outras células ou degradados por RNases (ETHERIDGE *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Mecanismo de ação dos miRNAs

A função dos miRNAs é regular a expressão gênica pós transcricional, para isso existem dois mecanismos que são baseados no grau de complementariedade das bases do miRNA e do mRNA alvo (SUN *et al.*, 2008). Quando essas duas moléculas apresentam complementariedade completa ou quase completa ocorre a clivagem do mRNA entre os resíduos 10 e 11. Após esse processo o miRNAs permanece intacto e pode regular outros mRNAs alvos. Porém para a grande maioria dos casos, o pareamento entre essas duas moléculas ocorre de forma imperfeita, resultando na repressão da tradução do mRNA. Para que ocorra o silenciamento é necessário um pareamento de bases contínuo do 2º ao 8º nucleotídeo da extremidade 5' do miRNA com o mRNA, esta região é chamada de sequência semente ou “seed sequence” (FABIAN *et al.*, 2010) (Figura 3). Os sítios de ligação dos miRNAs se encontram na sua grande maioria na região 3' UTR do mRNA, embora a ligação também possa ocorrer na região 5' UTR e regiões codificadoras (OROM *et al.*, 2008).

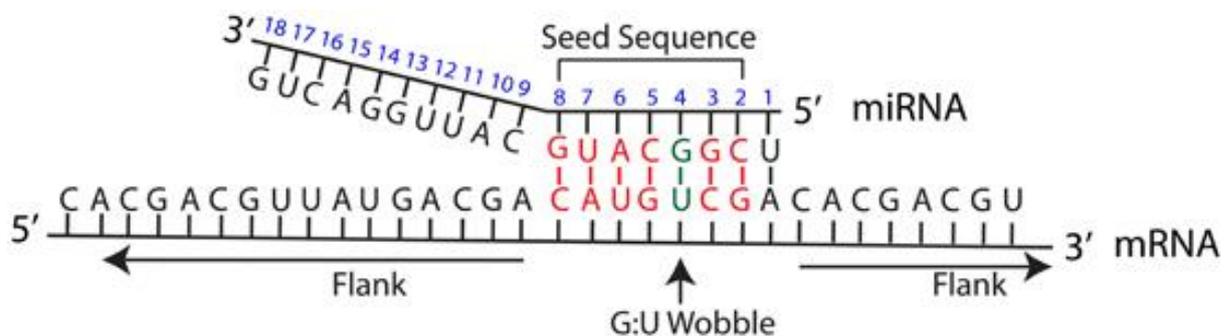


Figura 3- Esquema da interação do miRNA com o mRNA alvo. A sequência semente refere-se aos nucleotídeos no miRNA na posição 2-8. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00023/full>>. Acesso em 05/12/2016.

O processo de repressão ainda não está totalmente elucidado, estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que a repressão da tradução ocorre principalmente nos estágios de iniciação e/ ou alongação ou então facilitam a deadenilação e degradação da mRNA (FABIAN *et al.*, 2010). Para que o miRNA exerça seu papel de forma correta e satisfatória, sua função deve ser regulada, essa regulação ocorre

principalmente no momento da sua transcrição, mas pode também acontecer após a transcrição (ETHERIDGE *et al.*, 2011).

#### 2.2.4 miRNAs circulantes

Os miRNAs podem circular pelo corpo através dos biofluidos, como por exemplo pela corrente sanguínea (soro/plasma) (KUMAR ; REDDY 2016). Para que os miRNAs circulantes sejam protegidos das RNases presentes nesse ambiente, os mesmos são empacotados em microvesículas, exossomos ou corpos apoptóticos. Podem ser encontrados também em associação com a família da proteína Argonauta ou com complexos lipoproteicos (HDL) (TURCHINOVICH *et al.*, 2011).

Mudanças na expressão dos miRNAs circulantes podem estar diretamente ligadas a patologias, devido a sua participação no processo de produção e degradação de proteínas com ação tóxica (EACKER *et al.*, 2009). Um exemplo disso é a possível detecção de alterações nos níveis de miRNAs na circulação devido a danos cerebrais (ALVARES *et a.*, 2011) . Os miRNAs podem ser detectados no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) e no sangue (plasma/soro) por serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica carregados pelos exossomos (ALVAREZ *et al.*, 2011).

Os miRNAs presentes no soro podem permanecer estáveis após serem expostos a condições severas que normalmente degradariam a maioria dos RNAs como: fervura, níveis baixos e altos de pH, estocagem prolongada e ciclos de congelamento e descongelamento (CORTEZ *et al.*, 2011). Apesar de sua estabilidade ser um ponto positivo ao seu emprego como biomarcador, sua baixa concentração em fluidos como plasma/soro e LCR dificulta seu isolamento e quantificação (WANG *et al.*, 2014).

#### 2.2.5 miR-9

O miR-9 chamou a atenção dos neurologistas devido a sua sequência altamente conservada em animais bilaterais e sua alta e específica expressão no Sistema Nervoso Central (SNC) em vertebrados (COOLEN; KATZ; BALLY-CUIF; 2013). Através de estudos com modelos de espécies vertebradas foi mostrado sua função altamente conservada, especialmente na regulação da proliferação de células progenitoras neurais (COOLEN; KATZ; BALLY-CUIF; 2013).

Em humanos, o miR-9 encontra-se em altas concentrações no cérebro e está associado a importantes processos biológicos como: morfogênese, neurogênese, proliferação celular e glioblastoma (QIU; TAN; ZENG; 2015). Sua expressão é verificada no neocórtex, retina e hipocampo fetal (QIU; TAN; ZENG; 2015). Sua concentração é significativamente alterada durante o envelhecimento e exibe uma mudança específica em seu perfil de expressão em diferentes regiões do cérebro de pacientes com DA. Em DA está mais abundante no neocórtex, sugerindo algum tipo de papel regulatório no processo degenerativo (SETHI P, *et al.*, 2009).

O miR-9 é codificado por três genes diferentes, localizados nos loci 1q22, 5q14.3 e 15q26.1, todos contêm ilhas CpG em suas regiões promotoras (LEHMANN *et al.*, 2008). Sua hipermetilação e menor expressão têm sido demonstrada em diversos estudos com câncer (BANDRES *et al.*, 2009; HILDEBRANDT *et al.*, 2010; LUJAMBIO *et al.*, 2008; SENYUK *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2011). Até então sabe-se que o miR-9 é regulado pelo NF- $\kappa$ B (QIU; TAN; ZENG; 2015) e apresenta centenas de alvos, entre eles estão: o receptor de fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGFR1), CDK6, receptor de homeobox 2 de tipo caudal (CDX2), NF $\kappa$ B1, sirtuína 1 (SIRT1) e fator de transcrição de silêncio RE1 (REST). O miR-9 atua como um guardião de células neuronais impedindo a acumulação de laminina e progerina, oferecendo assim aos pacientes com síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford alguma proteção contra a neurodegeneração (NISSAN *et al.*, 2012.; VAN DEN HOVE *et al.*, 2014). O miR-9 também regula negativamente o receptor nuclear TLX ou o subgrupo 2 do grupo E do receptor nuclear 2 (NR2E1), para promover a diferenciação neural e prevenir a proliferação de células estaminais (VAN DEN HOVE *et al.*, 2014.; FEMMINELLA; FERRARA; RENGÓ 2015 ; LUKIW *et al.*, 2012)

Diversos estudos demonstraram alteração do miR-9 em diferentes áreas cerebrais de pacientes com DA (LUKIW., 2007; COGSWELL *et al.*, 2008; HÉBERT *et al.*, 2008). Lukiw (2007) encontrou a expressão do miR-9 elevada no hipocampo (LUKIW., 2007), já Cogswell *et al.*, (2008) mostrou que a expressão do miR-9 está diminuída no giro frontal (COGSWELL *et al.*, 2008). Em análise do córtex de pacientes com DA esporádica, Hébert *et al.*, (2008) demonstraram a diminuição da expressão de diversos miRNAs entre eles o miR-9 (HÉBERT *et al.*, 2008), e em estudo com modelo animal, o miR-9 foi encontrado menos expresso em cultura de células hipocámpais com A $\beta$  e em ratos transgênicos ( A $\beta$ 42 E APP23) (SCHONROCK *et al.*, 2010).

Em relação aos miRNAS em biofluidos, o LCR, e sangue (soro/plasma) de pacientes com DA já foram utilizados no estudo de expressão de miRNAs circulantes (GEEKIYANAGE *et al.*, 2012; ALEXANDROV *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2014). A tabela 1 resume os resultados encontrados referentes a expressão do miR-9 em soro e LCR de pacientes com DA e idosos cognitivamente saudáveis (CI).

Tabela 1- Estudos de expressão do miR-9 em soro e LCR de pacientes com DA.

Fonte	Grupo de estudo	Metologia	Expressão	Referência
Soro	CI=7 (H=4 ; M=3) DA=7 (H=2 ; M=5)	RT-qPCR	Diminuída	Geekiyange <i>et al.</i> , 2012
Soro	CI=150(H=75 ; M=80) DA=105(H=57;M=48)	RT-qPCR	Aumentada	Tan <i>et al.</i> , 2014
LCR	CI=6 AD=6	Microarranjo	Aumentada	Alexandrov <i>et al.</i> , 2012

Doença de Alzheimer (DA), Controle Idoso (CI), Homem (H), Mulher (M).

### 2.2.6 Métodos de Detecção dos miRNAs

A concentração de miRNA detectada em fluidos biológicos depende de fatores biológicos e técnicos. Os fatores enquadrados como biológicos são: 1) níveis de miRNA nos diferentes tecidos 2) a quantidade que o miRNA é excretado e secretado para o espaço extracelular 3) sua forma de transporte (exossomos, vesículas e complexos proteicos e/ou lipídicos) 4) capacidade de atravessar barreiras 5) estabilidade e meia vida na corrente sanguínea. Já os fatores técnicos incluem a) variabilidade durante a coleta e estocagem dos fluidos corporais b) métodos usados para a extração dos miRNAs c) a presença de fatores variados nos fluidos corporais que podem afetar a purificação dos miRNAs e a realização da RT-PCR ou SNG d)Validação dos resultados (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013).

A PCR Quantitativa em Tempo Real de Transcrição Reversa (RT-qPCR) e o Sequenciamento de Nova Geração (SNG) são os métodos atualmente mais utilizados para detectar os miRNAs circulantes (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013). A técnica do SNG apresenta a vantagem de conseguir quantificar muitos miRNAs

simultaneamente, dessa maneira é utilizado quando o objetivo é identificar e verificar a expressão de todos os miRNAs presentes em fluídos de pacientes comparado aos controles (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013). Dessa maneira, o SNG se apresenta como uma boa ferramenta tanto para a identificação de novos miRNAs quanto para a detecção de variações em suas sequências, como diferentes isoformas e outros tipos de pequenos RNAs. Entretanto, o SNG possui baixa sensibilidade, os miRNAs encontrados como diferencialmente expressos por essa técnica devem ser submetidos a validação por ensaios individuais por métodos mais sensíveis, entre eles RT-qPCR, para que, dessa maneira, possam ser úteis para fins diagnósticos (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013)

Quando o objetivo é analisar apenas alguns miRNAs candidatos relacionados a doenças usando amostras com volume reduzido a RT-qPCR oferece uma maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na detecção de níveis baixos de miRNA circulante (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013).

Entretanto, os resultados encontrados no SNG e no RT-qPCR para um mesmo miRNA podem apresentar pouca sobreposição (MOLDOVAN *et al.*, 2014; MESTDAGH *et al.*, 2014) o que dificulta a identificação de miRNAs confiáveis que possam passar para a fase de validação e ser efetivamente usados como biomarcadores não invasivos.

### 3. JUSTIFICATIVA

A incidência de demências aumenta a cada ano, principalmente na população senil. O déficit cognitivo associado à diminuição da independência nas atividades de vida diária prejudica não só a qualidade de vida do paciente, mas também de seus cuidadores. A DA é a principal causa de demência em idosos, afetando mais de 25 milhões de pessoas ao redor do mundo e até 2050 é esperado que 1 a cada 85 pessoas desenvolvam a doença.

Patologicamente a DA é caracterizada pela formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares que causam prejuízos nas funções cognitivas, com ênfase na memória. Apesar da DA precoce ter sido associado a diversas mutações, como nos genes *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* pouco se sabe sobre os aspectos genéticos envolvidos na DA esporádica. O alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE* é considerado como fator de risco a doença, aumentando de 5-20% a chance do desenvolvimento da patologia.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular outras moléculas vêm sendo estudadas com o objetivo de se entender melhor os aspectos gênicos e fisiopatológicos da doença. Os miRNAs são RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente e estão envolvidos em importantes vias do sistema nervoso central, além de estarem associados a doenças neurodegenerativas, como a DA. Nos últimos anos surgiram diversos estudos que demonstraram miRNAs desregulados em DA, diversos deles implicados na regulação de genes chaves como o *APP* (codifica a proteína precursora amiloide) e gene *BACE1* (codifica a enzima  $\beta$ -secretase, responsável pela clivagem da proteína APP na via amiloidogênica).

O miR-9 é encontrado em alta concentração no cérebro, onde participa de importantes processos biológicos como neurodiferenciação, proliferação e migração, ainda é associado com neurogênese, morfogênese, padrão de desenvolvimento e glioblastoma. Sua concentração é significativamente alterada durante o desenvolvimento e envelhecimento e apresenta mudanças de expressão específicas em diferentes regiões no cérebro de DA. Sendo assim o presente trabalho visa investigar a concentração do miR-9 em soro de pacientes com DA, para verificar se existe alteração em sua expressão, tendo em vista que as alterações

fisiopatológicas que ocorrem no cérebro podem ser detectadas através dos miRNAs circulantes uma vez que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, via exossomos e circular no organismo através do sangue (soro).

## 4. OBEJTIVOS

### 4.1 Geral:

Avaliar o miRNA candidato 9 como um possível biomarcador para a Doença de Alzheimer.

### 4.2 Específicos:

- Avaliar a expressão do miRNA candidato miR-9 na Doença de Alzheimer, utilizando amostras de soro, por meio da técnica RT-qPCR.
- Comparar a expressão do miR-9 do soro de pacientes com DA com idosos cognitivamente normais.
- Fazer a predição dos alvos do miR-9 a fim de avaliar se estão envolvidos com vias relacionadas a neurodegeneração e demência.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Amostras

Participaram do estudo 50 indivíduos, sendo 39 pacientes com DA e 11 idosos cognitivamente saudáveis (CI). Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e a coleta de soro só foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo1) pelo próprio paciente ou pelo responsável legal. Foram aplicados aos pacientes os testes e escalas psicológicas (MEEM, GDS, PFEFFER, e CDR) que dão suporte ao diagnóstico. Os controles utilizados foram coletados de idosos acompanhantes dos pacientes, cognitivamente normais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas (número do parecer 746.345).

As amostras de soro foram coletadas no Ambulatório de Disfunção Cognitiva do Setor de Neurologia do Hospital de Clínicas e levadas ao Laboratório de Polimorfismo e Ligação. Foram coletados aproximadamente 4 ml de sangue de cada indivíduo em tubo estéril com ativador de coágulo, e após o processamento (centrifugação por 20 minutos a 5.000 rpm) foram estocados 1,5 ml de soro a temperatura de -80°C. As amostras de soro foram verificadas quanto ao grau de hemólise com auxílio do equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). As amostras são consideradas hemolisadas se a absorbância a 414 nm for maior que 0,2 e, portanto, 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).

### 5.2 Extração do RNA total

Os miRNAs foram extraídos do soro com auxílio por meio do kit de extração mirVana™ PARIS™ (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 2).

### 5.3 Produção do cDNA

A reação de retrotranscrição (RT) foi padronizada com a metade da quantidade dos reagentes informadas nas instruções do fabricante do kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Foram adicionados ao RNA: tampão 10 x *RT Buffer*, 100mM *dNTPs Mix*, primers específicos (miR-9 ou miR-16), enzima transcriptase reversa *MultiScribe®* (50 U/μL), água livre de RNase (H2O DEPC) e inibidor de RNases. Foi utilizado também um controle negativo da RT (água DEPC ao invés de RNA) para cada primer em questão.

Cada reação de RT (uma amostra por tubo) possui um volume final de 7,5 μl, sendo composto por: 5μl de MIX<sup>1</sup> + 2,5 μl da amostra (ou água DEPC para o controle negativo).

<sup>1</sup>O MIX é composto por:

- 2,07 μl H2O DEPC
- 0,08 μl 100mM dNTP
- 0,5 μl enzima transcriptase reversa *MultiScribe®*
- 0,75 μl tampão *RT Buffer* (10x)
- 0,10 μl Inibidor de RNase
- 1,5 μl Primer específico miRNA de interesse

A RT foi realizada no termociclador *Mastercycler gradient (Eppendorf)*. As etapas do programa são apresentadas abaixo conforme indicado pelo manual do fabricante:

- 16°C por 30 minutos
- 42 °C por 30 minutos
- 85°C por 5 minutos
- O tubo contendo o cDNA deve ser deixado a 4°C até estocagem em freezer a -20°C

#### 5.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada nos equipamentos ViiA™ 7 e StepOne™ pelo método de detecção TaqMan®, em placas de 96 poços. Cada miRNA foi amplificado a partir

de um ensaio específico Kit TaqMan® MicroRNA Assays (*Applied Biosystems*) e as reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições:

- 3,8µl H<sub>2</sub>O DEPC
- 5µl (de enzima, nucleotídeos e demais reagentes para amplificação)
- 0,5µl primer + sonda

Cada amostra foi amplificada em triplicatas técnicas em um SUB-MIX composto por:

- 27,9 µl do MIX + 2,1 µl (cDNA) = 30 µl

A triplicata técnica foi dividida em 3 poços de 10 µl cada e submetidas ao seguinte ciclo de amplificação: 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, extensão a 60°C 1 minuto. A expressão relativa do miR-9 (gene alvo) foi normalizada contra o controle endógeno miR-16 (gene referência), usando método  $\Delta\Delta CT$  demonstrado abaixo:

#### 5.5 miR-16 como controle endógeno

Para que os dados encontrados na RT-qPCR sejam confiáveis, correções devem ser feitas para variações entre reações introduzidas durante as etapas entre preparação da amostra e amplificação. O emprego do gene controle endógeno (EC), o qual deve ser expresso de forma estável através do conjunto de amostras de teste, dentro do design do experimento é um método de normalização efetiva (DAVOREN *et al.*, 2008). O miR-16 foi identificado como um confiável normalizador (DAVOREN *et al.*, 2008) sendo neste trabalho usado como EC.

#### 5.6 Método $2^{-\Delta\Delta CT}$

O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  é utilizado para calcular a mudança relativa na expressão de determinado gene através da RT-qPCR (LIVAK *et al.*, 2001). Durante os ciclos de amplificação da RT-qPCR o software gera um gráfico que fornece o valor de Ct (*“Cycle Threshold”*) que se refere ao número de ciclos de amplificação necessários para que o *“threshold”* (limiar de detecção) seja alcançado. Para determinar o nível de expressão, a diferença ( $\Delta$ ) entre o Ct do alvo e do controle é mensurada.

O resultado final do método  $\Delta\Delta CT$  é apresentado como valor de *Fold Change* (FC) da expressão do gene (miR-9) em uma amostra alvo (grupo DA) em relação ao grupo controle normalizada por um miRNA referência (miR-16). A expressão do miR-9 é apresentada em x-vezes (*fold change* - FC) no soro de pacientes com DA em comparação com as amostras de idosos cognitivamente normais, indicando quantas vezes esse miRNA está mais expresso ( $> 1$ ), inalterado ( $= 1$ ), ou menos expresso ( $< 1$ ).

Fórmula do Fold change :

$$FC = 2^{-(CT \text{ alvo} - CT \text{ ref}) - (CT \text{ médio alvo} - CT \text{ médio ref})}$$

### 5.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas na plataforma R (R Core Team, (2016)) significância para  $p < 0,05$ . Os gráficos foram gerados através do pacote Lattice.

### 5.8 Análise dos mRNAs alvos do miR-9

Foi gerada uma lista de genes alvos do miR-9 com o auxílio da plataforma R (pacote multiMiR), utilizando os bancos de dados miRecords, miRTarBase e TarBase.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Expressão alterada do miR-9 em soro de pacientes com DA

Através do teste Wilcoxon rank sum foi realizada a comparação entre os FC das amostras no grupo DA e CI, que mostrou que o miR-9 se encontra significativamente mais expresso ( $p=0,004406$ ) em DA quando comparado ao CI. A Figura 4 mostra a diferença de FC entre os grupos DA e CI, evidenciando maior FC no grupo DA.

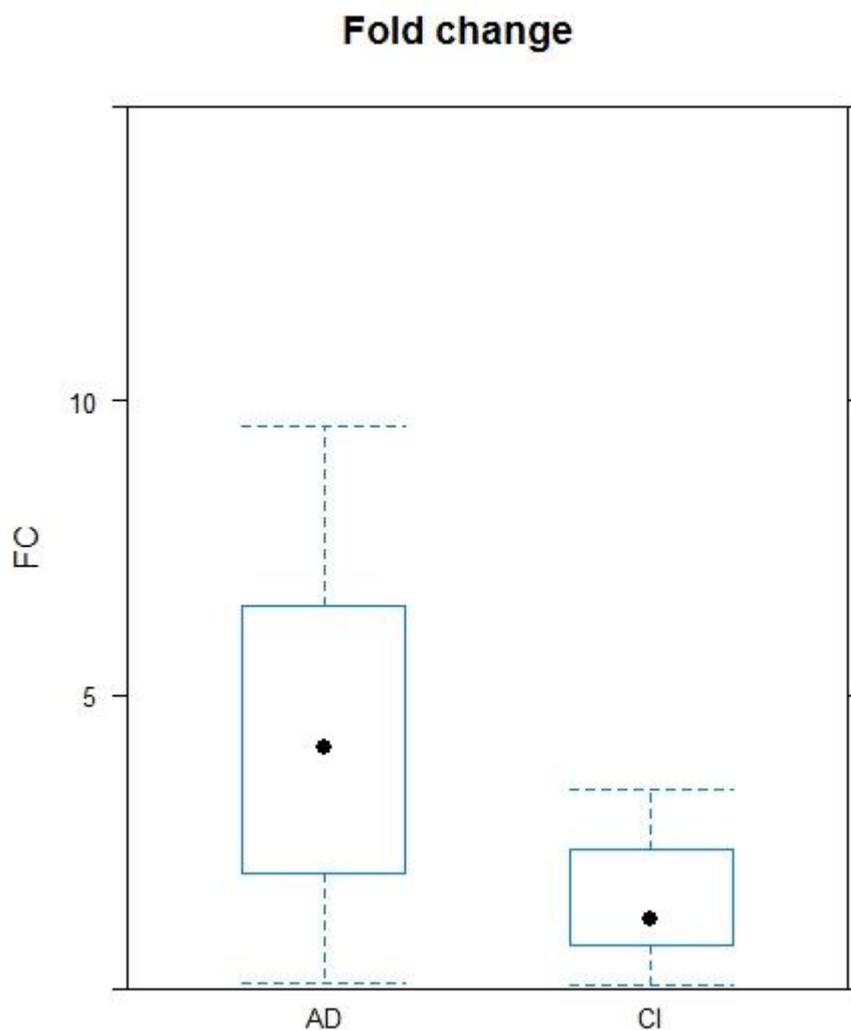


Figura 4- Gráfico do FC nos grupos DA e CI.

## 6.2 CT e FC das amostras

Os valores de CT (*“Cycle Threshold”*) do miRNA candidato (miR-9) e do miRNA referência (miR-16) e o FC estão representados na Tabela 2. Os menores valores de CT do miR-9 nas amostras de DA demonstra sua maior expressão nesse grupo. De acordo com o método, quanto maior a concentração inicial do gene, menor o número de ciclos de amplificação necessários para que seja alcançado o limiar de detecção.

Tabela 2- Valores de CT do miR-9 e do miR-16 para todas as amostras e valores de FC.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>CT miR-9</b>	<b>CT miR-16</b>	<b>Grupo</b>	<b>FC</b>
04	39,975	25,961	AD	3,162
C7	38,760	24,925	AD	3,580
C8	37,528	27,199	AD	40,680
11	37,602	25,185	AD	9,567
28	NA	26,683	AD	NA
46	40,044	23,605	AD	0,589
61	39,385	24,099	AD	1,309
63	38,384	23,917	AD	2,311
79	37,374	24,404	AD	6,519
95	37,922	28,045	AD	55,651
120	37,401	25,749	AD	16,254
131	38,242	26,350	AD	13,768
133	37,384	23,476	AD	3,403
121	36,622	25,260	AD	19,882
136	36,502	23,667	AD	7,162
142	38,460	30,711	AD	NA
143	37,189	20,797	AD	0,608
144	35,575	22,584	AD	6,425
157	35,207	23,707	AD	18,054
C9	35,852	21,031	AD	1,807
13	34,721	20,970	AD	3,794
C18	35,707	22,069	AD	4,104
59	40,604	21,637	AD	0,102
93	35,914	22,620	AD	5,208
105	37,922	23,955	AD	3,267
130	37,133	22,452	AD	1,991
140	36,217	21,104	AD	1,476

151	36,092	22,030	AD	3,058
152	37,561	22,549	AD	1,583
154	37,860	21,719	AD	0,724
155	34,630	21,154	AD	4,593
63	36,840	22,749	AD	2,996
71	34,936	21,514	AD	4,767
75	36,060	22,778	AD	5,253
76	36,153	23,111	AD	6,203
77	35,885	20,933	AD	1,650
78	34,954	21,857	AD	5,971
79	36,248	24,529	AD	15,516
80	36,846	23,628	AD	5,491
153	37,080	23,644	CI	NA
154	38,893	23,819	CI	1,517
155	38,897	24,657	CI	2,703
158	41,908	22,307	CI	0,066
159	40,545	24,741	CI	0,914
160	38,629	22,548	CI	0,755
165	39,288	23,199	CI	0,751
166	37,978	24,706	CI	NA
156	34,740	20,838	CI	3,417
163	36,351	23,566	CI	NA
164	34,282	19,675	CI	2,096

### 6.3 CT médio miR-9 e CT médio miR-16

Os valores da média do CT do miR-9 e miR-16 para o grupo DA e CI são mostrados na Tabela 3, sendo o CT médio do miR-9 menor do que o CT médio do miR-16. As Figuras 5 e 6 mostram a distribuição dos CTs do miR-9 e miR-16, respectivamente, encontrados nos grupos DA e CI. Os valores médio do CT do miR-16 para DA e CI são praticamente iguais (Tabela 3), o que está de acordo com o esperado, pelo fato que o miR-16 foi utilizado como gene de referência (controle endógeno) e não deve ter sua concentração alteração entre os pacientes com DA e idosos cognitivamente saudáveis.

Tabela 3-Média do CT para o miR-9 e miR-16 para grupo DA e CI.

<b>GRUPO</b>	<b>MÉDIA CT miR-9</b>	<b>MÉDIA CT miR-16</b>
DA	37,044	23,608
CI	38,054	23,064

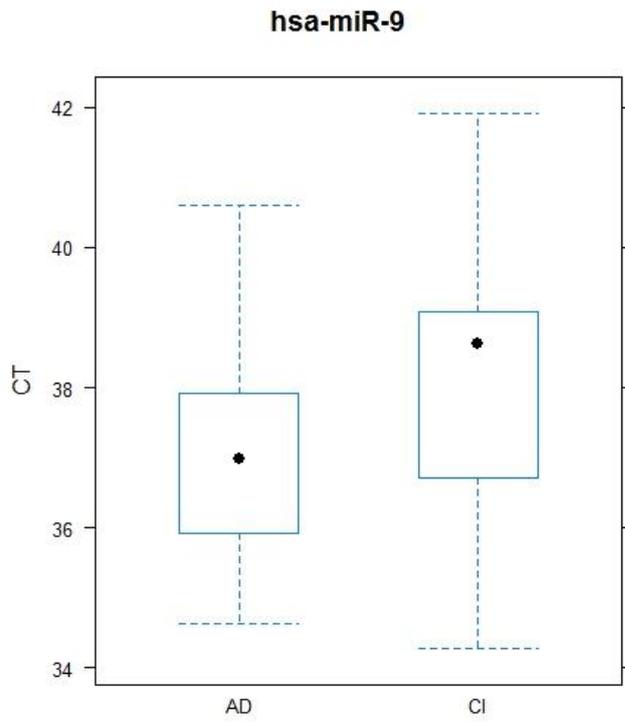


Figura 5- Gráfico com os valores de CT do miR-9 para o grupo DA e CI.

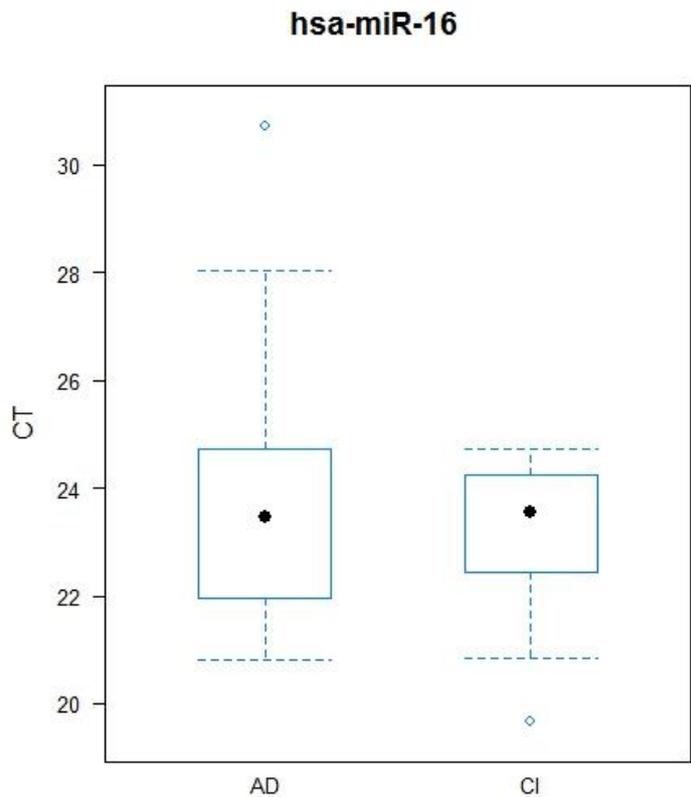


Figura 6- Gráfico com os valores de CT do miR-16 para o grupo DA e CI.

#### 6.4 Predição dos alvos do miR-9

Com auxílio da plataforma R foi realizada a predição dos alvos do miR-9. Os principais alvos se encontram na tabela 4.

Tabela 4- Principais genes alvos do miR-9.

<b>GENE ALVO</b>	<b>VIA ENVOLVIDA</b>	<b>EXPRESSÃO miR-9</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>BACE1</i>	Via amiloidogênica	Tendência a menor expressão	Western-Blot	Hébert <i>et al.</i> , 2007
<i>NTRK3</i>	Proliferação celular em neuroblastoma	Aumentada	Ensaio de Luciferase	Laneve <i>et al.</i> , 2007
<i>REST</i>	Interação com a proteína Huntingtina (Doença de Huntington)	Diminuída	Ensaio de sensor fenotípico	Packer <i>et al.</i> , 2008
<i>NF-KB1</i>	Inflamação aguda (Câncer de ovário)	Diminuída	Western-Blot/ Intensidade de fluorescência	Guo <i>et al.</i> , 2009

<i>NR2E1</i>	Proliferação e diferenciação celular	Aumentada	Luciferase Northern blot RT-Qpcr Western blot	Zhao <i>et al.</i> , 2009
<i>SIRT1</i>	Diferenciação celular	Aumentada	Ensaio de Luciferase RT-qPCR Western blot	Saunders <i>et al.</i> , 2010

## 7. DISCUSSÃO

## 7.1 Expressão do miR-9

O papel dos miRNAs vêm sendo estudado em diversas patologias, como por exemplo, DA. De todos os miRNAs conhecidos quase 70% deles estão expressos no cérebro, porém alguns poucos são considerados como “*brain enriched*” ou enriquecidos no cérebro (NOWAK ; MICHLEWSKI 2013). Esses miRNAs, que se encontram altamente expressos no tecido cerebral, entre eles o miR-9, possuem papéis chave na regulação de diversos processos biológicos importantes como: plasticidade sináptica, neurogênese e diferenciação (KUMAR; REDYY 2016). A identificação dos miRNAs em modelos de resistência à estresse e neurodegeneração demonstra sua contribuição nessas vias e os coloca como possíveis novos alvos terapêuticos (BASAVARAJU ; ALEXANDRE 2016).

Os miRNAs além de moduladores da atividade celular em estados patológicos e não patológicos, são liberados das células e circulam nos biofluidos corporais: LCR, sangue, soro, plasma, saliva e urina (BURMISTROVA *et al.*, 2007; JOHN; SANDER; MARKS 2006). Os miRNAs circulantes são relativamente estáveis e podem ser considerados como possíveis biomarcadores para a avaliação de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, envelhecimento, neurodegeneração e sua progressão (DU ; ZAMORE 2005 ; JOHN; SANDER; MARKS 2006 ; LIU *et al.*, 2009).

Entre os biofluidos o soro parece ser uma boa fonte para a obtenção de miRNAs, principalmente devido ao fácil acesso a amostra (KUMAR ; REDYY 2016). Vários estudos utilizaram miRNAs no soro com o objetivo de possivelmente os empregar como biomarcadores em DA (GEEKIYANAGE *et al.*, 2012; GALIMBERTI *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2015). No presente estudo, foi analisada a expressão do miR-9 em soro de 50 indivíduos, 39 pacientes com DA e 11 idosos cognitivamente saudáveis. O miR-9 foi encontrado significativamente mais expresso no soro de pacientes com DA quando comparado ao grupo controle. Esse resultado corrobora com estudo de Tan *et al.*, (2014), que comparam a expressão de vários miRNAs do soro entre eles o miR-9, em 105 pacientes com DA e 155 controles (TAN *et al.*, 2014). Em contrapartida Geekiyanage *et al.*, (2012) encontraram o miR-9 menos expresso em soro de DA quando comparados aos controles, ambos os grupos com 16 indivíduos (GEEKIYANAGE *et al.*, 2012). Em ambos os estudos o método de detecção foi a RT-qPCR (TAN *et al.*, 2014;

GEEKIYANAGE *et al.*, 2012) . Utilizando a metodologia do microarranjo, Alexandrov *et al.*, (2012) analisaram a expressão do miR-9 em LCR de 6 pacientes com DA em comparação com 6 idosos cognitivamente saudáveis, o miRNA foi visto como menos expresso no LCR dos pacientes ( ALEXANDROV *et al.*, 2012).

A discordância nos resultados encontrados para um mesmo miRNA, como por exemplo nos estudos de Tan *et al.*, (2014) e Geekiyanage *et al.*, (2012), em que ambos analisaram o miR-9 em soro e através da RT-qPCR e obtiveram resultados diferentes pode ser atribuída a diversas variáveis, como o tamanho e homogeneidade da amostra (no que se refere a idade, sexo, etnia) e ao estágio da patologia. A metodologia como: métodos de detecção (RT-qPCR, microarranjo, sequenciamento), seleção de controles adequados e a normalização da técnica também afetam os resultados encontrados (BATISTELA *et al.*, 2016).

## 7.2 miR-9 e genes relacionados

A descoberta dos miRNAs revelou uma nova maneira de regular a expressão gênica. A função dos miRNAs é parcialmente influenciada pela sua localização, como foi visto em estudos anteriores envolvendo desenvolvimento neuronal e plasticidade com diferentes miRNAs expressos em compartimentos neuronais distintos (JEFFRIES *et al.*, 2011 ; OLDE *et al.*, 2012).

O miR-9 é codificado por três genes diferentes (LEHMANN *et al.*, 2008; OMURA *et al.*, 2008) e é altamente expresso no hipocampo fetal. No cérebro com DA é visto menos expresso (KRICHEVSKY *et al.*, 2003) e a adição de peptídeos A $\beta$  em cultura primária de neurônios diminui sua expressão (KRICHEVSKY *et al.*, 2003). Entre os alvos do miR-9 se encontram os genes *BACE1*, *REST* e *NF-kB1* e outros.

O acúmulo do peptídeo A $\beta$  caracteriza patologicamente a DA. No tipo familiar, mutações nos genes *APP* e *PSEN* são associadas a essa deposição (ROVELET-LECRUX *et al.*, 2006). Na DA esporádica, que é responsável pela vasta maioria dos casos da doença, a causa do acúmulo do peptídeo A $\beta$  é pouco conhecida. Sabe-se que o aumento da expressão *BACE1* é observado em DA (YANG *et al.*, 2003) e que esse gene codifica a BACE1/B secretase, enzima que cliva *APP*, etapa limitante para a produção do peptídeo A $\beta$ . O aumento da expressão do *BACE1* é sugerido como um importante fator de risco na DA esporádica e vários mecanismos tentando explicar como isso ocorre estão sendo propostos (LI *et al.*, 2004). O miR-9 tem como um de seus alvos o gene *BACE1* (Tabela 4). Hébert *et al.*,

(2007) observaram uma tendência a diminuição da expressão do miR-9 em linhagem celular neuronal de camundongos que apresentavam alta expressão de *BACE1*, porém esse resultado difere do que foi encontrado nesse trabalho (alta expressão), sendo necessários mais estudos envolvendo a expressão do miR-9 e seu real papel na regulação da expressão de *BACE1* (HÉBERT *et al.*, 2007).

O fator de transcrição REST é um repressor de genes neuronais durante o desenvolvimento embrionário (CHONG *et al.*, 1995). Packer *et al.*, (2008) estudou a relação de REST e do miR-9 na Doença de Huntington (DH) e mostrou que miR-9/miR-9\* têm como alvo dois componentes do complexo REST: miR-9 apresenta como alvo REST e o miR-9\* o CoREST (PACKER *et al.*, 2008).

Neurônios maduros e saudáveis apresentam REST expresso em baixas concentrações e sequestrado no citoplasma (em parte pela interação com a proteína Huntingtina (Htt) (ZUCCATO *et al.*, 2003)). REST sendo um gene alvo do miR-9 (Tabela 4) possui ERM (Elementos de Reconhecimento para miRNA) para o miR-9. Em contrapartida o transcrito primário do miR-9 possui sequência R1 (sequência ocupada por REST para repressão), o que demonstra uma dupla regulação negativa (PACKER *et al.*, 2008) entre o miR-9 e REST.

Em DA, REST é perdido do núcleo e encontrado em vesículas autofágicas (LU *et al.*, 2014). Em estudo de LU *et al.*, (2014) foi visto que regiões relacionadas a DA, como neurônios do pré-frontal e hipocampo apresentam significativa redução de REST nucleares. Em contraste, em regiões não afetadas pela doença como cerebelo e giro denteado, não foi observada redução significativa de REST nuclear, demonstrando que a redução de REST está associada com DA (LU *et al.*, 2014). Encontramos nesse trabalho, miR-9 mais expresso em soro de DA, porém não há na literatura estudos com REST sérico, para podermos sugerir associação entre miR-9 e REST nesse biofluido.

DA é caracterizada pela formação de placas amiloides insolúveis, que ativam a micróglia gerando uma robusta resposta inflamatória (LANDREATH; GEAGHAN 2009). Os receptores do tipo Toll (TLR) participam do reconhecimento dos agregados proteicos com ação neurotóxica (A $\beta$  e tau hiperfosforiladas) que resulta na ativação de moléculas pró-inflamatórias (LANDREATH; GEAGHAN 2009). A resposta mediada por esses receptores tem um papel benéfico, estimulando a fagocitose e a liberação de produtos neurotóxicos (A $\beta$ ) (LANDREATH ; GEAGHAN

2009). Existem diversos tipos de TRL e vários deles têm sido relacionados a indução do miR-9 em caso de injúria cerebral, como AVC (VARTANIAN ; POORE 2010).

Como foi visto no presente trabalho o miR-9 se encontra mais expresso em soro de DA, o que pode ser um efeito da desregulação do processo inflamatório cerebral, o qual inicialmente tem um papel de combate a patógenos e injúrias (depósito de proteínas com ação neurotóxica) e que se torna crônico. Um dos alvos no miR-9 é o NF-KB1 (Tabela 4), que é o principal regulador do processo inflamatório (GUO *et al.*, 2009). O NF-KB1 tem um papel chave na amplificação da resposta inflamatória, devido a sua resposta aos estímulos pró inflamatórios como TNF- $\alpha$  que em (GRANIC *et al.*, 2009) DA têm sua concentração significativamente aumentada. A estimulação dos receptores de TNF- $\alpha$ , pode levar a ativação de NF-KB o qual tem sites de ligação nas regiões promotoras de *APP* e *BACE*. O aumento da expressão desses dois genes resulta no aumento da síntese de peptídeo A $\beta$ , que em retorno pode ativar células da glia e aumentar o processo neuroinflamatório (GRANIC *et al.*, 2009).

## 8. CONCLUSÃO

- miR-9 se encontra significativamente mais expresso no soro de DA quando comparado ao controle.
- *BACE1*, *REST* e *NF-kB* são alguns dos genes alvo do miR-9.
- *BACE1* é considerado fator de risco para DA e o miR-9 participa de alguma maneira da regulação da sua expressão.
- *REST* pode estar envolvido com a regulação da expressão do miR-9 no soro.
- A alteração da expressão do miR-9 em soro pode ser efeito da desregulação do processo inflamatório cerebral, visto que o NF-kB1 é um dos alvos do miR-9.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I.D.; FORLENZA, O.V.; BARROS, H.L. Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia. **Rev. psiquiatr. clín.**, v. 32, p. 131-136, 2005.
- ALEXANDROV, P. N.; DUA, P.; HILL, J. M.; et al. MicroRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 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.
- ALVRAZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nat. Biotechnol.** 2011;29:341–345.
- APA. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)**, Washington DC: American Psychiatric Association, 1994.
- ALZHEIMER'S SOCIETY. Disponível em : <<https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents.php?categoryID=200120>> . Acesso em 10/12/16.
- APA, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-V. **APA**, 2013. Disponível em: <<https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>>. Acesso em 12/12/2016.
- BACHMAN, D. L.; WOLF, P. A.; LINN, R. T.; KNOEFEL, J. E.; COBB, J. L., et al. Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. **Neurology**,v.43, n. 3 Pt 1, p. 515-519, 1993.
- 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.
- BANDRES, E.; AGIRRE, X.; BITARTE, N.; et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 11, p. 2737–2743, 2009.
- 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.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**,v.116, n. 2, p. 281-297, 2004.

- BASAVARAJU, M.; DE LENCASTRE, A. Alzheimer's disease: presence and role of microRNAs. **Biomolecular Concepts**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2016.
- BATISTELA, M. S.; JOSVIK, N. D.; SULZBACH, C. D.; DE SOUZA, R. L. R. An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **International Journal of Neuroscience**, 2016.
- 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.
- BURMISTROVA, O.; GOLTSOV, A.; ABRAMOVA, L.; et al. MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b (22q11). **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 72, n. 5, p. 578–582, 2007.
- CARAMELLI, P.; BARBOSA, M. T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Rev. Bras. Psiquiatr**, v. 24, p. 7-10, 2002.
- 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.
- CASEY, D.A.; DEMETRA, A.; O'BRIEN, J. Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective?. **P&T.**, v.35, p. 208-211, 2010.
- CHONG, J. A.; TAPIA-RAMIREZ, J.; KIM, S.; et al. REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. **Cell**, v. 80, n. 6, p. 949–957, 1995.
- COGSWELL JP, WARD J, TAYLOR L A, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **J. Alzheimers. Dis.** 2008;14:27–41.
- COOLEN, M.; KATZ, S.; BALLY-CUIF, L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. November, p. 220, 2013.
- CORTEZ, MA, BUESO-RAMOS C, FERDIN J, et al. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** 2011;8:467–477.
- DAVOREN, P. A.; MCNEILL, R. E.; LOWERY, A. J.; KERIN, M. J.; MILLER, N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. **BMC molecular biology**, v. 9, n. 1, p. 76, 2008.
- DE FELICE, F.G.; VIEIRA, M.N.; SARAIVA, L.M.; GARCIA-ABREU, J.; CHANG, L.; LIU, R.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; KLEIN, W.L.; FERREIRA, S.T. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer s disease: Inhibitors of Abeta oligomerization. **The FASEB J.**, v.18, p.1366-1372, 2004.
- DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.;GREEN, R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. **Science**,v.331, n. 6017, p. 550-553, 2011.

DONG, H.; LI, J.; HUANG, L.; et al. Serum MicroRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

DU, T.; ZAMORE, P. D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. **Development**, v. 132, n. 21, p. 4645–52, 2005.

EACKER SM, DAWSON TM, DAWSON VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. **Nat. Rev. Neurosci.** 2009;10:837–841

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S. et al. Treatment of Alzheimer's disease: recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 63, n. 4, p. 1104–1112, 2005.

ETHERIDGE ALTON et al. "Extracellular microRNA: A New Source of Biomarkers." *Mutation research* 717.1-2 (2011): 85–90. **PMC. Web.** 22 June 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.

FELEKKIS, K.; TOUVANA, E.; STEFANO, 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.

FEMMINELLA, G. D.; FERRARA, N.; RENGO, G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–5, 2015.

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

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. The several faces of dementia syndrome: How to diagnose clinically? **Scientia Medica**, v. 20, p. 185-193, 2010.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FROTA, N.A.F.; NITRINI, R.; DAMASCENO, B.P. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement. Neuropsychol.**, v.5, p. 5-10. 2011.

GALIMBERTI, D.; VILLA, C.; FENOGLIO, C.; et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 42, n. 4, p. 1261–1267, 2014.

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

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.

GRANIC, I.; DOLGA, A. M.; NIJHOLT, I. M.; VAN DIJK, G.; EISEL, U. L. M. Inflammation and NF- $\kappa$ B in Alzheimer's disease and diabetes. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 4, p. 809–821, 2009.

GUO, L.-M.; PU, Y.; HAN, Z.; et al. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF- $\kappa$ B1. **The FEBS journal**, v. 276, n. 19, p. 5537–46, 2009.

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.

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.

HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; MCCANN, J. J.; BECKETT, L. A.; EVANS, D. A. Is the Risk of Developing Alzheimer's Disease Greater for Women than for Men? **American Journal of Epidemiology**, v.153, n. 2, p. 132-136, 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.; DE STROOPER, B. MOLECULAR BIOLOGY: miRNAs in Neurodegeneration. **Science**, v. 317, n. 5842, p. 1179–1180, 2007.

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

HILDEBRANDT, M. A T.; GU, J.; LIN, J.; et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5724–5728, 2010.

HUGHES, C.P.; BERG, L.; DANZIGER, W.L.; COBEN, L.A.; MARTIN, R.L. A new clinical scale for the staging of dementia. **Br. J. Psychiatry**, v. 140, p. 566-572. 1982.

JEFFRIES, C. D.; FRIED, H. M.; PERKINS, D. O. Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. **Spring**, p. 675–686, 2011.

JOHN, B.; SANDER, C.; MARKS, D. S. Prediction of human microRNA targets. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 342, p. 101–113, 2006

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. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidenced based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 56, p. 1143-1153, 2001.

KRICHEVSKY, A. M.; KING, K. S.; DONAHUE, C. P.; KHRAPKO, K.; KOSIK, K. S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. **Rna**, p. 1274–1281, 2004.

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.

KUMAR, S.; REDDY, P. H. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 9, p. 1617–1627, 2016. Elsevier B.

LANDRETH, G.E.; REDD-GEAGHAN, E.G.; Toll-like receptors in Alzheimer's disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, 2009.

LAWS, S. M.; HONE, E.; GANDY, S.; MARTINS, R. N. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. **Journal of Neurochemistry**, v.84, p.1215-1236, 2003.

LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**. 2004.

LEHMANN, S. M.; KRÜGER, C.; PARK, B.; et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 827–835, 2012.

LI, R.; LINDHOLM, K.; YANG, L.-B.; et al. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3632–3637, 2004.

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.

- LIU, X.; NELSON, A.; WANG, X.; et al. MicroRNA-146a modulates human bronchial epithelial cell survival in response to the cytokine-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 1, p. 177–182, 2009. Elsevier Inc.
- LIU N, LANDREH M, CAO K, et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. **Nature**. 2012;482:519–523.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LU, T.; ARON, L.; ZULLO, J.; et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. **Nature**, v. 507, n. 7493, p. 448–454, 2014.
- LUJAMBIO, A.; CALIN, G. A; VILLANUEVA, A.; et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13556–13561, 2008.
- LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal , adult and Alzheimer ' s disease hippocampus. , v. 18, n. 3, p. 297–300, 2007.
- MCKHANN, G.M.; KNOPMAN, D.S.; CHERTKOW, H. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. **Alzheimer's & Dementia**, v.7, p.263–269, 2011.
- MESTDAGH P, HARTMANN N, BAERISWYL L, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. **Nat. Methods**. 2014;11:809–815.
- MOLDOVAN L, BATTE KE, TRGOVCICH J, et al. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. **J. Cell. Mol. Med**. 2014;18:371–390.
- NETO, J.G.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O.V. The Differential Diagnosis of Dementia. **Rev. Psiqu. Clín.**, v. 32, p. 119-130, 2005.
- NISSAN, X.; BLONDEL, S.; NAVARRO, C.; et al. Unique preservation of neural cells in hutchinson- gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA. **Cell Reports**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2012.
- NOWAK, J. S.; MICHLEWSKI, G. miRNAs in development and pathogenesis of the nervous system. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 4, p. 815–20, 2013.
- OLDE LOOHUIS, N. F. M.; KOS, A.; MARTENS, G. J. M.; et al. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 1, p. 89–102, 2012.
- 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.

PACKER, A. N.; XING Y.; HARPER S. Q.; JONES L.; DAVIDSON B.L. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. **J Neurosci**, 2008.

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

REITZ C.; BRAYNE C.; MAYEUX R.; MEDSCAPE. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurol.**, Mar., v. 7(3), p.137-52, 2011.

REITZ, C. Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2012, doi: 10.1155/2012/369808.

ROVELET-LECRUX, A.; HANNEQUIN, D.; RAUX, G.; et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. **Nature genetics**, v. 38, n. 1, p. 24–6, 2006.

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.

SENYUK, V.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; et al. Critical role of miR-9 in myelopoiesis and EVI1-induced leukemogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 14, p. 5594–9, 2013.

SCHONROCK, N.; KE, Y. D.; HUMPHREYS, D.; et al. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-?? **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

SETHI, P.; LUKIW, W. J. Micro-RNA abundance and stability in human brain: Specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. **Neuroscience Letters**, v. 459, n. 2, p. 100–104, 2009.

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, 2013.

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

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. 52–56, 2014. Elsevier B.V.

TSAI, K. W.; LIAO, Y. L.; WU, C. W.; et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. **Epigenetics**, v. 6, n. 10, p. 1189–1197, 2011.

VAN DEN HOVE, D. L.; KOMPOTIS, K.; LARDENOIJE, R.; et al. Epigenetically regulated microRNAs in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 4, p. 731–745, 2014. Elsevier Ltd.

VARTANIAN, K. B.; STENZEL-POORE, M. P. Toll-Like receptor tolerance as a mechanism for neuroprotection. **Translational Stroke Research**, v. 1, n. 4, p. 252–260, 2010.

TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic Acids Res.** 2011;39:7223–7233.

WANG W-T, CHEN Y-Q. Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. **J. Hematol. Oncol.** 2014;7:86.

WINKLER, J.; THAL, L.J.; GAGE, F.H.; FISHER, L.J. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, p. 555-567, 1998.

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.

YANG, L.-B.; LINDHOLM, K.; YAN, R.; et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 1, p. 3–4, 2003.

ZUCCATO, C.; TARTARI, M.; CROTTI, A.; et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. **Nature genetics**, v. 35, n. 1, p. 76–83, 2003.

**ANEXO 1-** Termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta de LCR  
(Conforme CNS, Resolução 196 de 10/10/96).

**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 aproximadamente 10ml 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.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

### **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 2 - 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 solidificar a 4°C, se for o caso, aquecer a 37°C 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 95°C (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 ( $\geq 10,000$  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  $\mu$ l, acrescentar 375  $\mu$ l de etanol)
- 7) Separar um tubo coletor e um filtro para cada amostra (nomeá-los adequadamente). Pipetar a solução + etanol no filtro (máximo de 700  $\mu$ l 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 700  $\mu$ l de “**miRNA Wash Solution 1**” no filtro e centrifugar por 15 segundos. Descartar o líquido resultante e recolocar o filtro no tubo.
- 10) Adicionar 500  $\mu$ l 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 100  $\mu$ l de solução eluente (pré-aquecida a 95°C) 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 -80°C ou mais frio.
- 15) Medir concentração e pureza no NanoDrop