

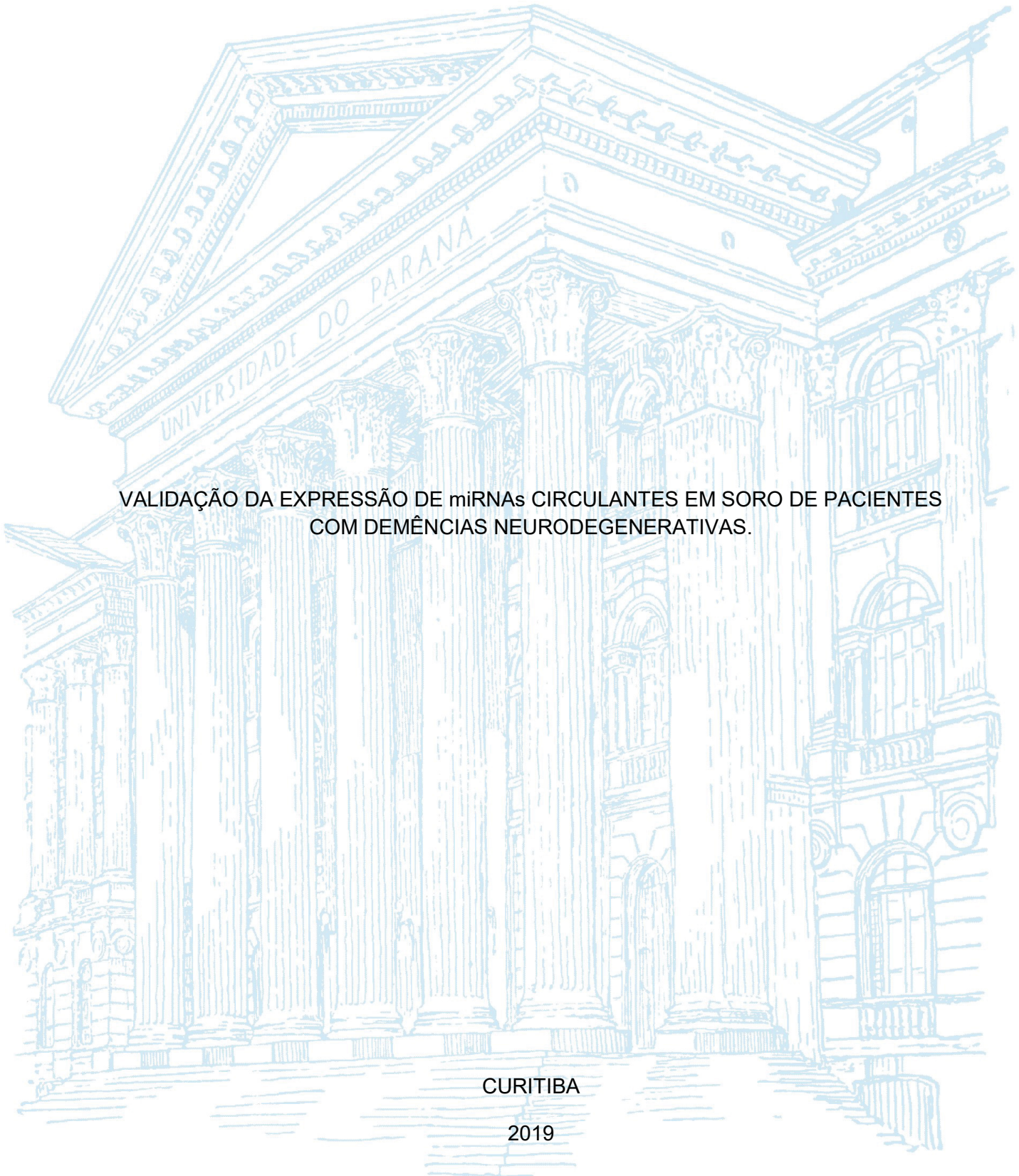
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA DE LOURDES SIGNORINI SOUZA

VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAs CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES
COM DEMÊNCIAS NEURODEGENERATIVAS.

CURITIBA

2019



ISADORA DE LOURDES SIGNORINI SOUZA

VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAs CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES
COM DEMÊNCIAS NEURODEGENERATIVAS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de Souza.
Coorientadora: Dra. Meire Silva Batistela.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

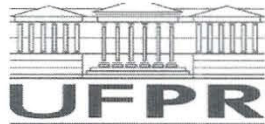
Souza, Isadora de Lourdes Signorini
Validação da expressão de miRNAs circulantes em soro de pacientes
com demências neurodegenerativas. / Isadora de Lourdes Signorini
Souza. – Curitiba, 2019.
77 p.: il.

Orientador: Ricardo L. R. de Souza
Coorientadora: Meire Silva Batistela

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Doença de Alzheimer 2. Doença de Parkinson 3. Biomarcadores 4.
Doença por corpos de Lewy 5. MicroRNAs I. Título II. Souza, Ricardo L.
R. III. Batistela, Meire Silva IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.8983



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

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 dissertação de Mestrado de **ISADORA DE LOURDES SIGNORINI SOUZA** intitulada: **VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAs CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES COM DEMÊNCIAS NEURODEGENERATIVAS.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Março de 2019.

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT

Avaliador Interno (UFPR)

LIYA REGINA MIKAMI

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente à minha mãe Mônica Signorini Marçal e ao meu pai Antônio Luiz de Souza que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram com amor e compreensão. Ao meu namorado Emanuel Teixeira da Silva, companheiro de todas as horas, que me apoiou emocionalmente durante todos esses anos, com amor, carinho, respeito e paciência.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza e a minha coorientadora Dr^a. Meire Silva Batistela que me orientaram com dedicação, cuidado, profissionalismo e serenidade, possibilitando que o atual trabalho, do qual me orgulho, fosse concluído com zelo e capricho.

A professora Dr^a Angelica Beater Winter Boldt que esteve presente desde o início do projeto e me apoiou ativamente durante todo o percurso, com ideias e conselhos, contribuindo com a doação de amostras, me possibilitando ter a experiência de participar da equipe de coleta. Agradeço a professora Angelica também por participar da minha banca de acompanhamento e aceitar a participar da minha banca de defesa. Não tenho como mensurar sua contribuição à minha formação.

Ao Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi que participou da minha banca de acompanhamento, durante os dois anos da minha trajetória, que com alto astral e confiança me ajudou com críticas construtivas que tornou este trabalho ainda mais completo.

A professora Dr^a Lupe Furtado Alle e a professora Dr^a Luciane Viater Tureck que me ajudaram compartilhando experiências e auxiliando nas resoluções de problemas, com paciência, preocupação e atenção.

Agradeço a Carla Daniela Sulzbach, colega de laboratório, por me ajudar no início de minha jornada, me ensinando e me acompanhando nos primeiros procedimentos de bancada, assim como por sua proatividade, boa vontade e disposição sempre que precisamos.

A todos os meus colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram, seja com dicas técnicas, conselhos pessoais ou tornando o ambiente de trabalho agradável e aconchegante.

À Universidade Federal do Paraná, ao departamento de Genética, aos professores que fizeram parte da minha formação, ao CNPq pelo fornecimento da bolsa, e ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação por toda sua estrutura e organização.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson com Demência (PDD) e Demência dos Corpos de Lewy (LBD) são patologias neurodegenerativas causadas pelo acúmulo cerebral de proteínas tóxicas. Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificadores que regulam a expressão gênica pós-transcricional, também envolvidos em doenças neurodegenerativas. Em um estudo anterior do nosso grupo, usando sequenciamento de nova geração, encontramos 278 miRNAs no soro cuja expressão diferiu entre essas três demências. O presente estudo teve como objetivo validar as diferenças observadas anteriormente por meio de amplificação quantitativa com sondas de hidrólise (tempo real) a partir de RNA retrotranscrito de DNA (RT-qPCR). Para este fim, a expressão dos miR-125a-5p, miR-30d-5p e miR-342-3p foi avaliada no soro de 17 amostras de idosos sem demência, 40 pacientes com DA, 7 com LBD e 10 com PDD, comparado à expressão de miR-16, como controle endógeno. O miR-125a-5p foi 2,7 vezes mais expresso no soro de pacientes com DA em comparação com controles idosos ($p = 9.217e-05$). Este microRNA apresenta uma boa opção de biomarcador para DA, com um valor de 0,82 (IC 95% = 0,71-0,92) para a área sob a curva ROC. Bases de dados como microrna.org permitiram a identificação de possíveis genes alvos para o miR-125a-5p (*ERBB2*, *ERBB3*, *ARID3B*, *TP53*, *VEGFA* e *BAK1*), cujos produtos desempenham um papel importante na regulação da homeostase do sistema nervoso central.

Palavras Chaves: Doença de Alzheimer; Doença de Parkinson com Demência; Demência com Corpos de Lewy; biomarcadores; miRNA circulante; análises *in silico*.

ABSTRACT

The Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease with Dementia (PDD) and Lewy Bodies Dementia (LBD) are neurodegenerative pathologies caused by brain accumulation of toxic proteins. miRNAs are small non-coding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression, also involved in neurodegenerative diseases. In a previous study of our group, using next generation sequencing, we found 278 miRNAs in serum whose expression differed among these three dementias. The present study aimed to validate the previously observed differences by means of quantitative amplification with hydrolysis probes (real time) from DNA retrotranscribed RNA (RT-qPCR). To this end, the expression of miR-125a-5p, miR-30d-5p and miR-342-3p was evaluated in serum of 17 samples from elderly subjects without dementia, 40 patients with AD, 7 with LBD and 10 with PDD , compared to miR-16 expression, as endogenous control. Results: MiR-125a-5p was 2.7-fold more expressed in serum of patients with AD, compared to elderly controls ($p = 9,217e-05$). This microRNA presents a good biomarker option for AD, with a value of 0.82 (95%CI=0.71-0.92) for the area under the ROC curve. Databases as Microna.org allowed the identification of possible target genes for miR-125a-5p (*ERBB2*, *ERBB3*, *ARID3B*, *TP53*, *VEGFA* and *BAK1*), whose products play an important role in the regulation of homeostasis of the nervous system.

Keywords: Alzheimer's disease; Parkinson's Disease with Dementia; Dementia with Lewy Bodies; biomarkers; circulating miRNA; analyzes *in silico*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de um neurônio saudável e um neurônio de paciente com doença de Alzheimer	p. 5
Figura 2 – Cérebro mostrando hemisfério normal e afetado por Alzheimer.....	p. 6
Figura 3 – Propagação da proteína A β da proteína Tau em cérebros de pacientes afetados com Alzheimer.....	p. 6
Figura 4 – Distribuição da proteína α -sinucleína em cérebro de pacientes com patologia de Lewy.....	p. 8
Figura 5 – Biogênese dos miRNAs.....	p. 13
Figura 6 - Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-125a-5p.....	p. 17
Figura 7 - Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-30d-5p.....	p. 17
Figura 8 - Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-342-3p.....	p. 18
Figura 9 - Matriz de Confusão, da curva ROC.....	p. 25
Figura 10 - Boxplot referente ao hsa-miR-30d-5p, comparando os valores de FC entre os grupos; Controle, DA, DCL e DPD.....	p. 29
Figura 11 - Boxplot referente ao hsa-miR-342-3p, comparando os valores de FC entre os grupos; Controle, DA, DCL e DPD.....	p.30
Figura 12 – Boxplot referente ao hsa-miR-125a-5p, comparando os valores de FC entre os grupos; Controle e DA	p. 32
Figura 13 - Gráfico referente ao hsa-miR-125a-5p, mostrando a relação entre os valores de FC e densidade dos grupos; Controle DA.....	p. 33
Figura 14 - Curva ROC de sensibilidade e especificidade para o hsa-miR-125a-5p.....	p. 35
Figura 15 – Via KEEG de identificação e genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p relacionados à doença de Alzheimer.....	p. 37
Figura 16 – Quantidade do gene <i>APP</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 39
Figura 17 – Quantidade do gene <i>APP</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 39
Figura 18 – Quantidade do gene <i>ATP2A2</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 40
Figura 19 – Quantidade do gene <i>ATP2A2</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 41
Figura 20 – Quantidade do gene <i>ATP5A1</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 41
Figura 21 – Quantidade do gene <i>ATP5A1</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 42
Figura 22 – Quantidade do gene <i>ATP5G2</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 43
Figura 23 – Quantidade do gene <i>ATP5G2</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 43
Figura 24 – Quantidade do gene <i>COX7A2</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 44
Figura 25 – Quantidade do gene <i>COX7A2</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 44
Figura 26 – Quantidade do gene <i>NDUFB6</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 45
Figura 27 – Quantidade do gene <i>NDUFB6</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 46
Figura 28 – Quantidade do gene <i>NDUFS7</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 46
Figura 29 – Quantidade do gene <i>NDUFS7</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 47

Figura 30 – Quantidade do gene <i>ERBB2</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 49
Figura 31 – Quantidade do gene <i>ERBB2</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 50
Figura 32 – Quantidade do gene <i>ERBB3</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 50
Figura 33 – Quantidade do gene <i>ERBB3</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 51
Figura 34 – Quantidade do gene <i>ARID3B</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 52
Figura 35 – Quantidade do gene <i>ARID3B</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 52
Figura 36 – Quantidade do gene <i>TP53</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 53
Figura 37 – Quantidade do gene <i>TP53</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 53
Figura 38 – Quantidade do gene <i>VEGFA</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 54
Figura 39 – Quantidade do gene <i>VEGFA</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 55
Figura 40 – Quantidade do gene <i>BAK1</i> nos diferentes tecidos corporais.....	p. 56
Figura 41 – Quantidade do gene <i>BAK1</i> nas diferentes estruturas cerebrais.....	p. 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Critérios diagnósticos de demência conforme o DSM-V.....p. 3.
- Tabela 2** - Características clínicas da Doença de Parkinson com Demência, Demência com corpos de Lewy e Doença de Alzheimer.....p. 10
- Tabela 3** - Número total de amostras de soro sanguíneo, de pacientes com demências e de controles, estocadas no laboratório de Polimorfismos da UFPR.....p. 21
- Tabela 4** - Relação de amostras coletadas para validação por RT-qPCR, que já foram sequenciadas por NGS.....p. 22
- Tabela 5** - Número de amostras utilizadas total para a validação por RT-qPCR
.....p. 23
- Tabela 6** - Combinação entre grupos (CTRL, DA, DPD e DCL) para comparação da expressão diferencial dos hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-342-3p.....p. 23
- Tabela 7** - Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes com demência (DA, DPD e DCL) em relação ao grupo controle de idosos cognitivamente saudáveis (CTRL).....p. 27
- Tabela 8** - Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes, comparando as diferentes demências duas a duas (DAXDPD, DAXDCL e DPDxDCL).....p. 28
- Tabela 9** - Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes, comparando DA x CTRL.....p. 32
- Tabela 10** - Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes DA x CTRL em amostras sequenciadas por NGS e por qPCR.....p. 34
- Tabela 11** - Genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p, sua localização cromossômica, Vias KEGG de identificação, método Tarbase.....p. 37
- Tabela 12** - Genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p, associado à doença de Alzheimer, bases de dados miRecords; miRTarBase; Target Scan Human e miRDB.....p. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

AChE – *Acetylcholinesterase*

ADAM17 - *Metallopeptidase domain 17*

APOE - Apolipoprotein E

APP - *Amyloid beta precursor protein*

ARID3B - *AT-rich interaction domain 3B*

ATP2A2 – *ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 2*

ATP5A1 – *ATP synthase F1 subunit alpha*

ATP5G2 – *ATP synthase membrane subunit c locus 2*

A β - Peptídeo β -amilóide

BACE1 - Beta-secretase 1

BAK1 – *BCL2 antagonist/killer 1*

BDNF - *Brain derived neurotrophic factor*

CDR - *Clinical dementia rating* (Avaliação clínica da demência)

CL - Corpos de Lewy

COX7A2L – *Cytochrome c oxidase subunit 7A2 like*

Ct – *Cycle Threshold*

CTRL - Controle de idosos cognitivamente saudáveis

DA - Doença de Alzheimer

DCL - Demência de 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

DV - Demência Vascular

ERBB2 - *rb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ERBB3 - *rb-b2 receptor tyrosine kinase 3*

FC - *Fold Change*

GDS - *Geriatric depression scale* (Escala de depressão geriátrica)

HITS-CLIP - *High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*

KEGG - *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MAPT - *Microtubule associated protein tau*

MEEM - Mini exame do estado mental

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNA

NDUFB6 – *NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6*

NDUFS7 – *NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S7*

NFTs – *Neurofibrillary Tangles* (Emaranhado Neurofibrilares).

NGS – *Next Generation Sequencing*

NL – Neuritos de Lewy

PAR-CLIP - *Photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*

PFEFFER – Atividade instrumental de vida diária

pri-miRNA – Transcrito primário do miRNA

PSEN 1 – *Presenilin 1*

PSEN 2 - *Presenilin 2*

p-tau – Proteína Tau fosforilada

RT-qPCR – PCR Quantitativa em Tempo Real

RNAse - Ribonucleases

SNCA – *Synuclein Alpha*

TCLE – termo de consentimento livre esclarecido

TP53 - *Tumor Protein p53*

t-tau – Proteína Tau total

VEGFA – *Vascular endothelial growth factor A*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 1
2 REVISÃO DE LITERATURA	p. 3
2.1 Demências	p. 3
2.1.1 Doença de Alzheimer.....	p. 4
2.1.2 Demência com Corpos de Lewy.....	p. 8
2.1.3 Doença de Parkinson com Demência.....	p. 10
2.2 miRNAs	p. 12
2.2.1 Aspectos gerais.....	p. 12
2.2.2 miRNAs e sua relação com processos neurais e neurodegenerativos.....	p. 14
2.2.3 miRNAs como biomarcadores para doenças neurodegenerativas.....	p.14
2.3 hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-342-3p como candidatos para o diagnóstico diferencial de DA, DCL, DPD e de controles cognitivamente saudáveis	p.16
2.3.1 hsa-miR-125a-5p.....	p. 16
2.3.2 hsa-miR-30d-5p.....	p. 17
2.3.3 hsa-miR-342-3p.....	p. 18
3 JUSTIFICATIVA	p. 19
4 OBJETIVOS	p. 20
4.1 Objetivo Geral.....	p. 20
4.2 Objetivos Específicos.....	p. 20
5 MATERIAIS E MÉTODOS	p. 21
5.1 Características gerais das amostras.....	p. 21
5.2 Validação de miRNAs previamente verificados como diferencialmente expressos.....	p. 22
5.3 Validação independente de miRNAs.....	p. 22
5.4 Extração de RNA total e análise da qualidade.....	p. 23
5.5 Produção de cDNA.....	p. 24
5.6 PCR Quantitativa em Tempo Real.....	p. 24
5.7 Análises estatísticas.....	p. 24

5.8 Testes de sensibilidade e especificidade.....	p. 25
5.9 Análise <i>in-silico</i> dos genes alvos do miR-125a-5p.....	p. 26
6 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	p. 27
6.1 Validação da expressão dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p.....	p. 27
6.1.1 Comparação da expressão dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p em soro de pacientes com demências em relação ao grupo controle.....	p. 27
6.1.2 Comparação da expressão dos dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p entre os grupos de pacientes com as diferentes demências.....	p. 27
6.2 Validação da expressão do miRNA hsa-miR125a-5p.....	p. 31
6.2.1 Comparação da expressão do miRNA hsa-miR125a-5p em soro de pacientes com demências em relação ao grupo controle.....	p. 31
6.2.2 Comparação entre os resultados de expressão encontrados por RT-qPCR e por NGS para o hsa-miR125a-5p.....	p. 34
6.2.3 Análise de predição da sensibilidade e especificidade do hsa-miR125a-5p por curva ROC.....	p. 35
6.2.4 Análise <i>in-silico</i> : Predição dos principais alvos do hsa-miR-125a-5p e sua relação com as vias da doença de Alzheimer.....	p. 36
7 CONCLUSÕES.....	p. 57
REFERÊNCIAS	p. 58
ANEXOS.....	p. 69

1 INTRODUÇÃO

Demência é o nome dado para um conjunto de síndromes clínicas caracterizadas pelo declínio progressivo de uma ou mais áreas do domínio cognitivo, levando ao comprometimento ocupacional e social do indivíduo afetado (Araújo&Neto, 2013; APA, 2014). A idade é o principal fator de risco, acometendo idosos, geralmente a partir dos 60 anos (APS/AB do Brasil, 2016). Essa relação entre idade e o desenvolvimento de demências está associada às modificações morfológicas e ao declínio funcional e fisiológico, que ocorre no cérebro dos idosos, decorrentes do processo de envelhecimento, podendo levar à neurodegeneração (Schlindwein-Zanini, 2010).

Com o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento populacional, elevou-se a prevalência de demências na população e elas tornaram-se um problema de saúde pública que deve ser investigado. A prevalência brasileira média é mais elevada do que a mundial (Burlá *et al.*, 2013), o que torna o estudo sobre o processo natural de envelhecimento e doenças associadas, extremamente importantes no contexto atual (Brucki *et al.*, 2011).

A doença de Alzheimer (DA) e a demência vascular (DV) são as formas de demência mais comuns nos idosos, seguida pela demência com corpos de Lewy (DCL) e demência associada à doença de Parkinson (DPD) (Caramelli & Barbosa, 2002; APS/AB do Brasil, 2016). A DA, sozinha, representa aproximadamente 40% dos casos de demências em idosos (Alzheimer's Association, 2016). Ela causa neurodegeneração na região hipocampal e cortical do cérebro, resultando em declínio progressivo da memória, seguido do declínio de outras funções cognitivas (Stoyanova, 2014; Goedert, 2015). A DCL se caracteriza por flutuações e declínios cognitivos, sintomas parkinsonianos, alucinações, comprometimento da memória e da atenção (Carvalho & Coutinho, 2002; Goldman *et al.*, 2014). A DCL é uma demência pouco compreendida, devido sua grande sobreposição de sintomas com a DA e com a DPD (Guerreiro *et al.*, 2016). A Doença de Parkinson (DP) resulta principalmente da perda de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra, acarretando em sintomas motores como, bradicinesia, tremor em repouso, rigidez muscular, instabilidade postural, *freezing*, festinação, distonia e discinesias e também sintomas não motores como, mudanças no humor, apatia, ansiedade, diminuição no controle do impulso, outros problemas comportamentais, diminuição da capacidade olfativa, problemas no ciclo sono-vigília e problemas cognitivos, podendo afetar atenção, funções executivas e a memória. Pode surgir, com o progresso da doença, quadros de demências, caracterizando a DPD (Beitz, 2014; Goldman *et al.*, 2014).

O provável diagnóstico dessas demências é feito por meio da história clínica e do perfil neuropsicológico do paciente, além de exames laboratoriais e exames de neuroimagem estrutural. Porém, o diagnóstico definitivo só pode ser feito com análise histopatológica do tecido cerebral *post-mortem* (Gallucci-Neto *et al.*, 2005; Barbosa *et al.* 2006). A dificuldade em acessar o cérebro, em vida, junto às sobreposições clínicas dos sintomas, dificultam o diagnóstico preciso e o tratamento adequado desses transtornos (Babilone *et al.*, 2017).

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificadores, envolvidos na regulação gênica pós-transcricional, por meio da degradação ou silenciamento de seu mRNA alvo. Os miRNAs possuem papel crucial em vários processos biológicos e sua expressão desregulada parece estar associada às disfunções neurológicas e processos neurodegenerativos (Kumar *et al.*, 2013; Leidinger *et al.* 2013). Os miRNAs têm sido detectados de maneira estável, em diversos fluidos biológicos, como no sangue. Sua expressão pode sofrer alterações em determinadas patologias, sendo eles então considerados bons biomarcadores para vários tipos de doenças, incluindo as neurodegenerativas (Carlsen *et al.*, 2013; Etheridge *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2013; Pereira, 2015; Batistela *et al.* 2017). Alguns estudos relacionam os miRNAs a modelos de resistência ao estresse e a neurodegeneração, colocando-os como possíveis alvos terapêuticos, evidenciando assim sua contribuição (Basavaraju & De Lencastre, 2016).

Em trabalho anterior de nosso grupo (Batistela, 2016), foram identificados por sequenciamento de nova geração (NGS), uma série de miRNAs diferencialmente expressos no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de idosos com DA, DCL e DPD. Dentre os miRNAs identificados, se destacaram o hsa-miR-125a-5p, o hsa-miR-30d-5p e o hsa-miR-342-3p, que estavam superexpressos, de maneiras específicas, em cada uma dessas três demências. Sendo assim, o objetivo do atual trabalho foi validar, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), a expressão desses três miRNAs, circulantes no soro sanguíneo, de pacientes com DA, DCL e DPD, afim de observar se corroboram os resultados anteriores. Os resultados podem ajudar a reforçar a possibilidades do uso desses miRNAs como biomarcadores eficientes para o diagnóstico diferencial dessas demências. A técnica de RT-qPCR que foi escolhida principalmente por motivos econômicos, se mostra uma boa opção para a validação de miRNAs diferencialmente expressos e já conhecidos (Sheinerman & Umansky, 2013; Wegner, 2016; Batistela *et al.*, 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA.

2.1 Demências

De acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, em sua quinta versão (DSM-V), da Associação Psiquiátrica Americana (APA, 2014), demência ou transtorno neurocognitivo maior é o nome dado para um conjunto de síndromes clínicas caracterizadas pelo declínio progressivo de uma ou mais áreas do domínio cognitivo, evidenciados na tabela 1. Esses déficits levam ao comprometimento ocupacional e social do indivíduo afetado, interferindo em sua independência para as atividades de vida diárias (Araújo & Neto, 2013; APA, 2014). Além do comprometimento cognitivo, distúrbios comportamentais e emocionais como alterações de humor, depressão, euforia, apatia, irritabilidade, agressividade, ansiedade, desinibição, delírios, alucinações, alterações no apetite, no ciclo de sono e no comportamento sexual, também podem ser observados em indivíduos com demências (Caramelli & Barbosa, 2002; APA, 2014).

Tabela 1 – Critérios diagnósticos de demência conforme o DSM-V

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;
(6) Social.

FONTE: Adaptado de American Psychiatric Association (2014)

Segundo dados da Alzheimer's Society (2016), as demências são prevalentes em indivíduos senis a partir dos 60 anos, mas podem também afetar indivíduos de idade não avançada. O sistema nervoso é o sistema biológico mais afetado com o processo de senescência. As modificações morfológicas e mudanças neuropsicológicas que acometem o cérebro dos idosos, proveniente do processo natural de envelhecimento, ajuda a torná-los mais vulneráveis às demências (Schlindwein-Zanini, 2010). O cérebro dos idosos, se comparado ao dos jovens é, em média, menor e mais leve, há uma redução no número de neurônios e de sinapses, possui menor espessura das regiões corticais, decorrentes de giros mais finos e sulcos mais profundos. Esse quadro pode levar a déficits cognitivos e a existência de sintomas neuropatológicos e comportamentais (Schlindwein-Zanini, 2010; Souza *et al.*, 2011; APA, 2014). A prevalência das demências, em geral, é maior em

mulheres do que em homens, o que pode estar relacionado à sua maior expectativa de vida (Burlá, *et al.*, 2012; Prince *et al.*, 2013). Quando a demência afeta indivíduos de idade não senil, há fortes indícios de que sua origem seja genética; esse tipo de padrão é chamado de familiar (Alzheimer's Society, 2016).

As demências podem ser categorizadas em dois tipos; demências potencialmente reversíveis e irreversíveis. As demências potencialmente reversíveis representam a minoria dos casos, com uma frequência de aproximadamente 23%. Elas podem ser revertidas, se diagnosticadas com antecedência. São causadas principalmente por: efeitos colaterais de medicamentos, deficiência de vitamina B12, abuso de álcool, condições metabólicas, como hipotireoidismo, neoplasias, inflamações do sistema nervoso central, depressão, hidrocefalia de pressão normal, entre outros. Já as demências irreversíveis incluem as demências neurodegenerativas, sendo que a DV, a DA e a demência mista (DM), representam a maioria dos casos (Fornari *et al.* 2010; Brucki *et al.*, 2011). As demências neurodegenerativas se caracterizam por deposição anormal de agregados de proteínas específicas ou metabólitos tóxicos para o cérebro, assim como por um estado de inflamação crônica em regiões específicas do cérebro, que de forma progressiva podem levar a degeneração neuronal, a disfunção axonal e a atrofia cerebral (Lee, 2014a; Bhat *et al.*, 2015; Babiloni *et al.*, 2017).

O diagnóstico das demências é complexo e de difícil elucidação, devido a sobreposição de sintomas clínicos e ao fato de que o diagnóstico definitivo só pode ser feito com análise histopatológica do tecido cerebral *post-mortem* (Barbosa *et al.* 2006). Sendo assim, em vida, o diagnóstico provável se baseia na história de vida e manifestações clínicas dos pacientes, exames laboratoriais, exames de neuroimagem estrutural e testes psicológicos que auxiliem na detecção de componentes cognitivos e comportamentos alterados. Dentre os instrumentos neuropsicológicos frequentemente usados, estão os: Mini Exame de Estado Mental (MEEM), Escala Geriátrica de Depressão (GDS), Atividade Instrumental de Vida Diária (PFEFFER) e Avaliação Clínica de Demências (CDR) (Albert *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2014; Cecato & Martinelli, 2015; Melo & Barbosa, 2015; Batistela, 2016).

2.1.1 Doença de Alzheimer

A DA é a causa mais comum de demência, sendo responsável por até 40% dos casos entre a população idosa (Alzheimer's Association, 2016). A idade é considerada como o principal fator de risco, porém aspectos como sexo, escolaridade, doenças crônicas e

inflamatórias, exposição a substâncias tóxicas também devem ser consideradas (Barranco-Quintana *et al* 2005; Dal Forno *et al.*, 2005; Corrada *et al.*, 2010; APS/AB do Brasil, 2016).

A fisiopatologia da DA se caracteriza pelo acúmulo neuronal extracelular de placas amiloides, ou senis, formadas pela deposição de peptídeos β -amiloide ($A\beta$) e pelo acúmulo neuronal intracelular de emaranhados neurofibrilares (NFTs), que são compostos por proteínas TAU hiperfosforiladas (Figura 1). Os NFTs não são exclusivos da DA, porém na patologia encontram-se depositados em regiões do cérebro que correspondem aos sintomas clínicos (Morrison *et al.*, 2005; Goedert, 2015). Estudos recentes também têm identificado agregados da proteína α -sinucleína, características da DCL e da DP, em cérebros de pacientes com DA com distribuição na região das amígdalas (Kim *et al.*, 2014).

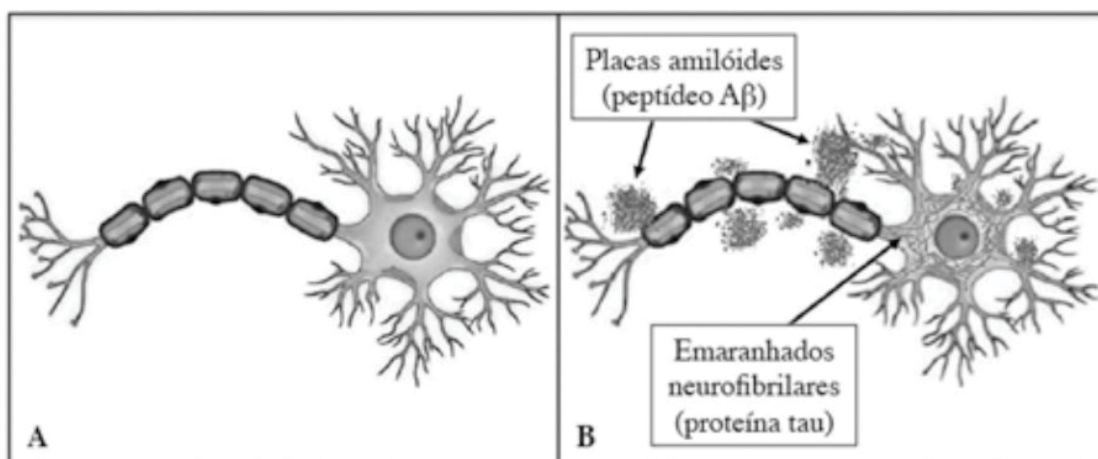


Figura 1: (A) Esquema de um neurônio saudável e (B) um neurônio de paciente com DA evidenciando as placas amiloides extracelulares e os emaranhados neurofibrilares intracelulares. **Fonte:** De Falco *et al.* (2016).

A DA é caracterizada clinicamente por degeneração inicial na região hipocampal, lobo temporal basal, neocórtex orbitofrontal e posterior comprometimento de outras áreas corticais e associativas (Figura 2). O progresso da doença está associado a grandes acúmulos do peptídeo $A\beta$ e de proteínas Tau hiperfosforilada em regiões distantes do local de origem, como no tronco cerebral e no cerebelo, acompanhados pela perda neuronal (Goedert, 2015; Gompertset *al.*, 2016), conforme ilustrado na figura 3.

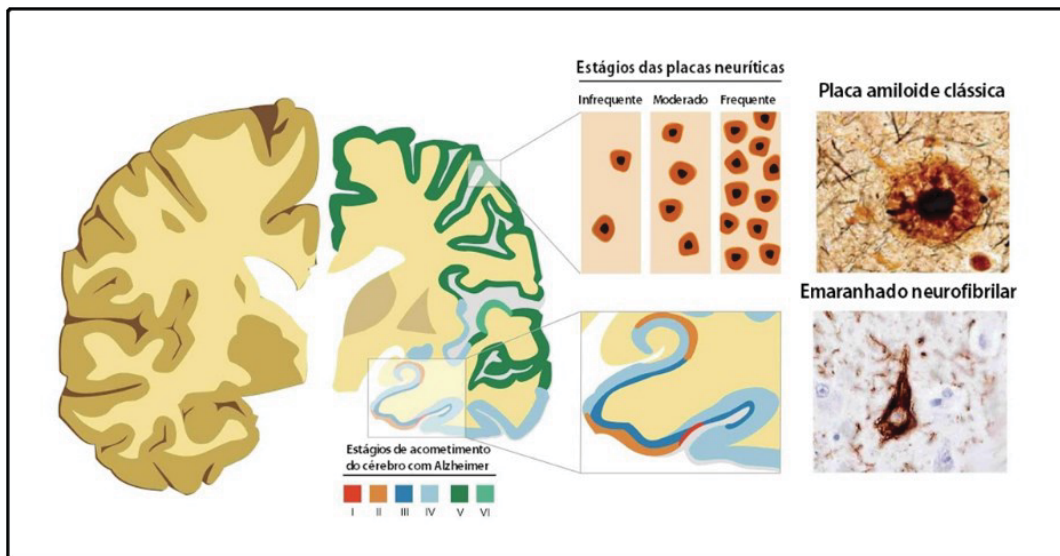


Figura 2: À esquerda, um hemisfério normal, à direita um hemisfério de uma pessoa com DA. A atrofia é causada pela morte neuronal proveniente das inclusões de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, em estruturas específicas. De acordo com os estágios de acometimento da doença, é notável que o hipocampo e córtex basais são as estruturas mais prejudicadas pela DA. **Fonte:** <https://meucerebro.com/alzheimer-patologia-genes/>

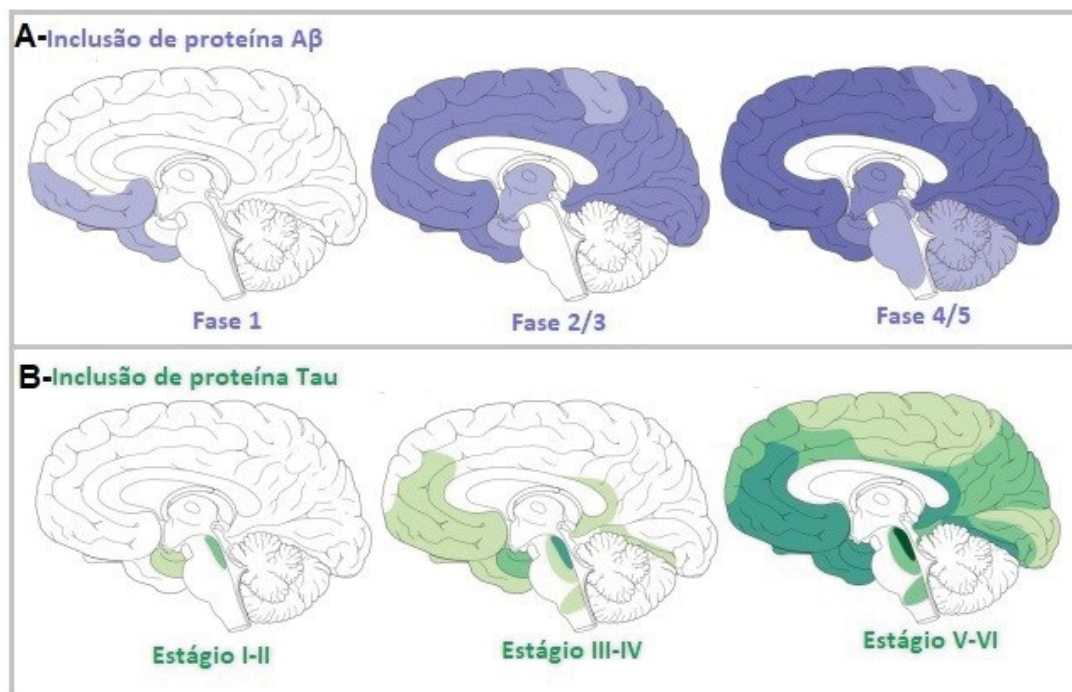


Figura 3: (A) Propagação da proteína Aβ e (B) da proteína Tau em cérebros de pacientes com DA, nos diferentes estágios da doença. Na fase 1, as placas amiloides (azul) são observadas no lobo temporal basal e neocórtex orbitofrontal. Nas fases 2 e 3 eles se desenvolvem na formação hipocampal, neocórtex, amígdala, diencéfalo, e gânglios da base. Nas fases 4 e 5, as placas amiloides também são encontrados no mesencéfalo, tronco cerebral e cerebelo. As inclusões de proteína Tau (verde) nas fases I-II, são encontradas no locus coeruleus e nas regiões transentorinal e entorinal do cérebro. Na fase III-IV, ela se desenvolve na formação hipocampal e em algumas partes do neocórtex, seguidas por outras regiões do neocórtex nas etapas V-VI. **Fonte:** Adaptado de Goedert (2015).

O prejuízo à memória é o principal evento clínico da DA. Inicialmente há a perda da memória episódica e dificuldades na aquisição de novos conhecimentos. A DA também se caracteriza por perda de outras funções cognitivas, como no uso da linguagem, capacidades visuais, funções executivas e comportamentais. Há uma preservação inicial do funcionamento motor e sensorial, que só é alterada em estágios avançados da patologia (Gallucci-Neto *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Lukiw, 2007; Fornari *et al.* 2010; Dubois *et al.*, 2014; Babiloni, 2017; Batistela *et al.*, 2017).

A DA é uma patologia de origem multifatorial, com diferentes graus de gravidade e geneticamente heterogênea. Alguns autores acreditam que 60% a 80% do risco de desenvolvimento de DA por um indivíduo, depende de seu perfil genômico (Bertram *et al.*, 2007; Gatz *et al.*, 2010). Existem dois subgrupos de DA: a esporádica e familiar. A DA esporádica é a mais frequente, caracterizada por sintomas tardios, geralmente após os 60 anos. Para esse tipo, a herança do alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*, que codifica a apolipoproteína E, é o fator de risco genético mais conhecido (Saunders, *et al.* 1993; Avramopoulos, 2009; Bettens *et al.*, 2010). A DA familiar, de início precoce, começa a se manifestar antes dos 60 anos e representa apenas 5% dos casos da demência. É de origem genética, com herança autossômica dominante e penetrância completa em um dos genes; *APP* (proteína precursora do amiloide), *PSEN1* (presenilina 1) e *PSEN2* (presenilina 2), localizada nos cromossomos 21, 14 e 1, respectivamente (Alagiakrishnan *et al.*, 2012; Bagyinszky *et al.*, 2014). A clivagem da APP resulta na produção de proteínas A β , que formam as placas senis tóxicas ao cérebro. No cérebro saudável, as formas A β 40 e A β 42 da proteína A β são depositadas em equilíbrio. Mas na patologia da DA há um desequilíbrio, no qual a proteína A β 42 torna-se mais abundante, do que a A β 40 (Dominguez *et al.*, 2005; Bettens *et al.*, 2010). Mutações nos genes *PSEN1* e *PSEN2* também prejudicam a clivagem de APP resultando em um aumento da A β 42 e diminuição da A β 40.

Os medicamentos atualmente usados para o tratamento de DA, baseiam-se principalmente nos inibidores de receptores glutamatérgicos, como a amemantina, e nos inibidores de colinesterase, uma vez que a patologia provoca uma disfunção colinérgica cortical. Porém, esses medicamentos são usados em fases específicas da doença e atuam apenas na melhora dos sintomas, não sendo capaz de impedir a progressão da mesma (De Falco *et al.*, 2016; Schilling, 2016).

2.1.2 Demência com Corpos de Lewy

A DCL, a DP e a DPD compõem o quadro de doenças com Corpos de Lewy. A DCL e a DPD, juntas, são responsáveis por aproximadamente 10% a 20% dos casos demenciais, sendo a primeira mais prevalente entre os homens, podendo se iniciar a partir dos 50 anos e possuindo uma rápida progressão (McKeith, 2002; Gomperts *et al.* 2016; Babiloni, 2017).

A fisiopatologia da DCL se caracteriza pelo acúmulo anormal de inclusões de Corpos de Lewy (CLs) e Neuritos de Lewy (NL) em regiões específicas do cérebro. Esse quadro leva a alterações neuropatológicas, como disfunção axonal e morte neural, alterando aspectos cognitivos, motores e comportamentais (Tsuang *et al.*, 2013; Bhat *et al.*, 2015; Babiloni, 2017).

Os CLs são inclusões esféricas intracitoplasmáticas, com um centro eosinófilo e um halo pálido. Tanto os CLs quanto os NLs, são formados pela proteína α -sinucleína fosforilada e, por isso, as patologias com Corpos de Lewy são denominadas sinucleinopatias. Nas sinucleinopatias, as inclusões de α -sinucleína, geralmente, ascendem do tronco cerebral e se espalham ao longo de outras estruturas cerebrais, figura 4 (Goedert, 2015).

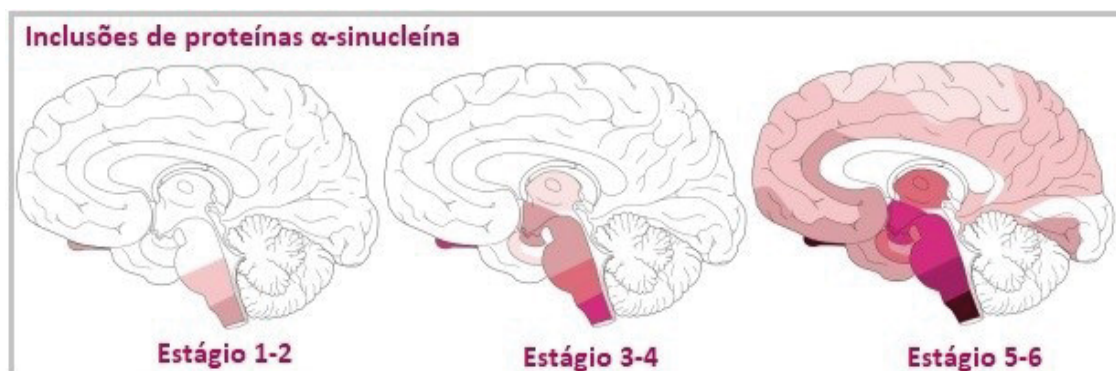


Figura 4: Patologia de Lewy positiva para a-sinucleína (rosa). As primeiras inclusões, nos estágios 1 e 2, estão presentes no bulbo olfatório e em alguns núcleos motor dorsal no tronco encefálico, seguido, nas fases 3 e 4, para o mesencéfalo e prosencéfalo basal. No estágio 5 e 6 a proteína atinge várias regiões do neocórtex. **Fonte:** adaptado de Goedert (2015).

A α -sinucleína é uma proteína presente nos terminais pré-sinápticos dos neurônios, e pertence a uma família de proteínas cerebrais codificadas pelo gene *SNCA*, localizado no cromossomo 4. Sua função relaciona-se a manutenção de vesículas sinápticas e pré-sinápticas nos terminais neuronais, à regulação da dopamina e ao controle voluntário e involuntário dos movimentos (Kim *et al.*, 2014). Diversos autores também sugerem sua relação com a promoção de estresse oxidativo e déficit mitocondrial, o que pode estar relacionado à agregação das proteínas e formação dos CLs (Goedert, 2001; Fujiwara *et al.*, 2002).

Na DCL, há um processo inflamatório significativo e grandes concentrações de CLs, principalmente, nas regiões do tronco encefálico, núcleos subcorticais, córtex límbico, neocórtex e substância negra. Já os NLs se encontram mais comumente no hipocampo, amígdala e núcleo basal de Meynert. Dependendo da localização dos CLs e NLs no cérebro, diferentes condições clínicas são manifestadas (Tavares & Azeredo, 2003).

Dentre os sintomas mais observados na DCL estão; o prejuízo à memória, porém menos intenso do que na DA, depressão, dificuldade na resolução de problemas, flutuação cognitiva ao nível de consciência, o que pode gerar um estado de confusão mental, irritabilidade, déficits de atenção e redução da concentração, prejuízo nas funções executivas e nas habilidades visuoespaciais, problemas motores parkinsonianos extrapiramidais como tremores, rigidez e problemas de marcha (McKeith, 2002; Tavares & Azeredo, 2003; Auning *et al.*, 2011; Huang & Halliday, 2013). Outro importante sintoma presente na DCL são as alucinações visuais bem formadas, que pode ajudar a contribuir para um diagnóstico diferenciado dessa demência (Babiloni *et al.*, 2017). Handing *et al.* (2002) encontraram em pacientes com DCL, alta densidade de CLs na região da amígdala e parahipocampo associada às alucinações visuais. Outros autores também demonstraram hipometabolismo de glucose e hipoperfusão sanguínea em áreas de associação visual, relacionadas a esse mesmo sintoma (Higuchi *et al.*, 2000; Colloby *et al.*, 2002).

A DCL é uma das demências mais mal compreendidas, pois possui aspectos que podem ser confundidos com outras demências. Por exemplo, na DCL há sintomas parkinsonianos e extrapiramidais, que também são observadas na DP e na DPD. Também podem ser observados, em alguns casos, deposição de placas β -amiloides e NFTs, comprometimento cognitivo e de memória, comuns à DA. Sendo assim, a DCL pode ser confundida com a DP ou com a DA (Tabela 2), dependendo do início e sobreposição de sintomas (Kim *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2016; Gomperts *et al.*, 2016). Isso pode representar um risco ao paciente, uma vez que os mecanismos dessas demências são distintos e as abordagens terapêuticas aplicadas a essas patologias podem ter efeitos negativos sobre outras. Por exemplo, a DCL pode ser piorada, se tratada com agentes dopaminérgicos, comumente usados no tratamento da DP (Zweig & Galvin, 2014; Guerreiro *et al.*, 2016; Babiloni *et al.*, 2017). Pacientes com DCL também possuem baixa tolerância ao uso de neurolépticos, comumente usados para o tratamento de psicoses e alucinações, podendo apresentar graves efeitos colaterais, que podem levar à morte (McKeith, 2002; Aarsland *et al.*, 2005). Na análise *post-mortem*, a localização e a quantidade de CLs na região do córtex cerebral e do tronco encefálico é fundamental para o diagnóstico definitivo (Tavares & Azeredo, 2003). Mas em vida, esses dados reforçam a importância de diagnóstico precoce e preciso, assim como a necessidade de um tratamento adequado.

No tratamento da DCL, os medicamentos mais comumente usados são os inibidores das colinesterases, uma vez que o sistema colinérgico se encontra bastante afetado, principalmente em regiões do córtex, prosencéfalo basal e núcleo de Meynert. O tratamento com esse tipo de medicamento aparenta promover uma melhora nos sintomas (Barber *et al.*, 2001; Brucki *et al.*, 2011; Batistela, 2016).

Tabela 2 – 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* Batistela (2016).

2.1.3 Doença de Parkinson com Demência

A DP é uma patologia crônica, degenerativa e progressiva do sistema nervoso, de etiologia idiopática e início insidioso. Ela é de origem multifatorial, estando relacionada a interação entre fatores genéticos e ambientais. Exposições a produtos químicos, estresse oxidativo, disfunções mitocondriais podem contribuir de maneira significativa, para a doença, assim como o envelhecimento cerebral, sendo o avanço da idade o maior fator de risco (Souza *et al.*, 2011). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) a DP atinge mundialmente 1% da população acima de 65 anos. Atualmente mais de 10 milhões de pessoas vivem com a DP em todo o mundo (Parkinson's Foundation, 2016).

Em 1997 o estudo de Polymeropoulos e colaboradores, revelou que o polimorfismo de um único nucleotídeo do gene *SNCA*, codificador da proteína α -sinucleína foi associado à uma forte relação com início idiopático da DP, assim como com aumento de risco de desenvolver a doença, com o avanço da idade (Goerdet, 2015). A mutação encontrada no quarto exon do gene *SNCA*, mostra a substituição de um nucleotídeo G para A na posição

209 (G209A), o que resulta em uma substituição do aminoácido Alanina por uma Treonina, na posição 53 (Ala53Thr). Polymeropoulos *et al.* (1997). Já no ano seguinte, os estudos de Poorkaj *et al.* (1998) e Spillantini *et al.* (1998) evidenciaram que mutações no gene *MAPT*, cujo produto está envolvido na codificação da proteína Tau, também foram relacionadas à DP e à demência frontotemporal (Goerdt, 2015).

A fisiopatologia da DP caracteriza-se pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra e do mesencéfalo, assim como pela diminuição da neurotransmissão dopaminérgica nos gânglios da base, causadas por inclusões intracelulares de CLs e NLs e neuroinflamação decorrente da ativação da micróglia (Souza *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014a). A inclusão de agregados da proteína α -sinucleína também ocorre em diversas regiões do cérebro, com predominância em regiões subcorticais, como: núcleos hipotalâmicos, núcleos basais de Meynert e núcleos aminérgicos do tronco cerebral (Cookson 2009; Holdorff *et al.*, 2013; Babiloni *et al.*, 2017). A diminuição das células produtoras de dopamina na via negroestriada e em neurônios do tronco cerebral, contendo neuromelanina, é a principal responsável pelos distúrbios motores da doença. Acredita-se que, quando os sintomas são detectados, já tenha ocorrido a perda de aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos (Lana *et al.*, 2007; Lewis & Prowland 2007; Souza *et al.*, 2011). Porém, o sistema monoaminérgico, que envolve neurotransmissores noradrenérgicos e serotoninérgicos, também é afetado, podendo influenciar os sintomas não motores observados na DP (Teive, 2005; Azevedo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2011).

Na DP, ocorrem sintomas motores e cognitivos, sendo os sintomas motores, primários e de manifestação precoce. Estes se caracterizam por tremor em repouso, instabilidade postural, rigidez muscular, lentidão e bradicinesia, ou seja, diminuição dos movimentos voluntários (Beitz, 2014; Babiloni, 2017). Já os sintomas cognitivos são mais tardios e envolvem: apatia, ansiedade, depressão, prejuízo a funções verbais, executivas e visuoespaciais, diminuição da atenção, alucinações e delírio ocasionais, problemas do sono, desordens comportamentais, entre outros, que, em 30% dos casos, caracterizam a DPD (Aarsland *et al.*, 2005, Gouveia 2008; Lee *et al.*, 2014a; Babiloni *et al.*, 2017).

Têm-se mostrado uma relação entre a presença de CLs corticais e límbicos com o aparecimento do quadro de demência em pacientes com Parkinson (Galvin, 2006; Watson & Leverenz, 2010). A quantidade e a localização da proteína α -sinucleína pode ajudar a distinguir casos de DP e DPD (Braak *et al.*, 2005; Gouveia, 2008; Irwin *et al.*, 2012). Estudos neuropatológicos baseados em autópsia do cérebro *post-mortem*, também encontraram relação entre a deposição da proteína Tau, em combinação com a proteína A β e α -sinucleína, com o quadro de demência em pacientes com DPD e DCL (Gomperts, 2016).

O tratamento da DPD é complexo pois, assim como na DCL, o uso de neurolépticos, utilizados no tratamento de alucinações e de delírios, e o uso de agentes dopaminérgicos, comumente usados no tratamento de sintomas motores do Parkinson, podem agravar os déficits cognitivos dos portadores de DPD, cabendo ao clínico o manejo adequado dos medicamentos (Caixeta & Vieira, 2008; Batistela, 2016).

2.2 miRNAs

2.2.1 Aspectos gerais

miRNAs (microRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, que atuam na regulação da expressão gênica pós-transcricional. Possuem aproximadamente 20 nucleotídeos de tamanho e inibem a tradução por meio do silenciamento ou da degradação de seus mRNAs alvos, ao se ligar em suas regiões codificadoras 3'UTR ou 5'UTR (Pereira, 2015). Os miRNAs regulam aproximadamente 30% do genoma codificador de proteína humana (Filipowicz *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2011). Os miRNAs desempenham funções fundamentais na regulação gênica durante a diferenciação e desenvolvimento celular, atuando também em processos como resposta imune, envelhecimento, homeostase e neurogênese (Schmiedel *et al.* 2015; Denk *et al.* 2018).

A maior parte dos miRNAs são transcritos pela RNA Polimerase II e possuem cauda poli A na extremidade 3' e cap 7-metil-guanilato na extremidade 5', sendo inicialmente transcritos de forma parecida com o mRNAs. Os miRNAs são produzidos sob a forma de transcrito primário (pri-miRNAs) e posteriormente processados e transformados em sua forma madura. O pri-miRNA é endonucleoliticamente clivado em pre-miRNA, pelo complexo Rnase III Drosha/ Pasha DGCR8, que cliva os braços 3' e 5' e estabiliza o pre-miRNA, respectivamente. Com o término do processamento nuclear, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela proteína Exportina 5, onde a proteína Rnase III Dicer, junto à proteína TRBP/Loquacious, cliva a volta do pré-miRNA gerando um miRNA dupla fita. Esta se liga com a proteína Argonata, a um complexo proteico denominado miRISC. Dentro desse complexo, a fita mais estável, fita guia, ficará retida e será o futuro miRNA, enquanto a outra, fita passageira, é solta e pode ser degradada (Cowland *et al.* 2007; Snustad & Simmons, 2013; Watson *et al.*, 2015; Pereira, 2015; Batistela, 2016) (figura 5).

Os miRNAs regulam a expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais baseados no grau de complementaridade entre a molécula e o seu mRNA alvo. Quando há complementariedade completa, ou quase completa, o mRNA é clivado. Quando o miRNA se pareia de forma imperfeita em seu mRNA alvo, ocorre apenas uma repressão da tradução.

A maior parte dos miRNAs no genoma de seres humanos se pareiam de forma imperfeita (Cowland *et al.* 2007; Watson *et al.*, 2015).

Quanto a nomenclatura dos miRNAs, são seguidas algumas convenções estabelecidas principalmente a partir de 2002 com a criação da base de dados *The miRNA Registry*, que atualmente é conhecida como miRBase. Tomando como exemplo o hsa-miR-125a-5p as normas de nomenclaturas sugerem que: O prefixo inicial de três caracteres se refere ao nome da espécie, no caso “hsa” para *Homo sapiens*. O “R” maiúsculo do prefixo “miR” indica que o elemento em questão é a forma madura do miRNA. No miRBase os miRNAs seguem uma ordem numérica, sendo assim o miR-125, por exemplo, foi o 125º miR humano a ser descoberto. As letras “a”, “b”, “c”, entre outras, que sucedem a numeração indicam que apesar das sequencias similares, de alguns miRNAs que ocupam a mesma posição na fita *sense* ou *antisense*, estes possuem alvos e funções distintas, então essas letras mostram que eles, mesmos muito parecidos, são diferentes. Por último o sufixo “-5p” ou “-3p” representa a extremidade do pre-miRNA da qual os membros maduros se originaram (Pereira, 2015; miRBase, 2019).

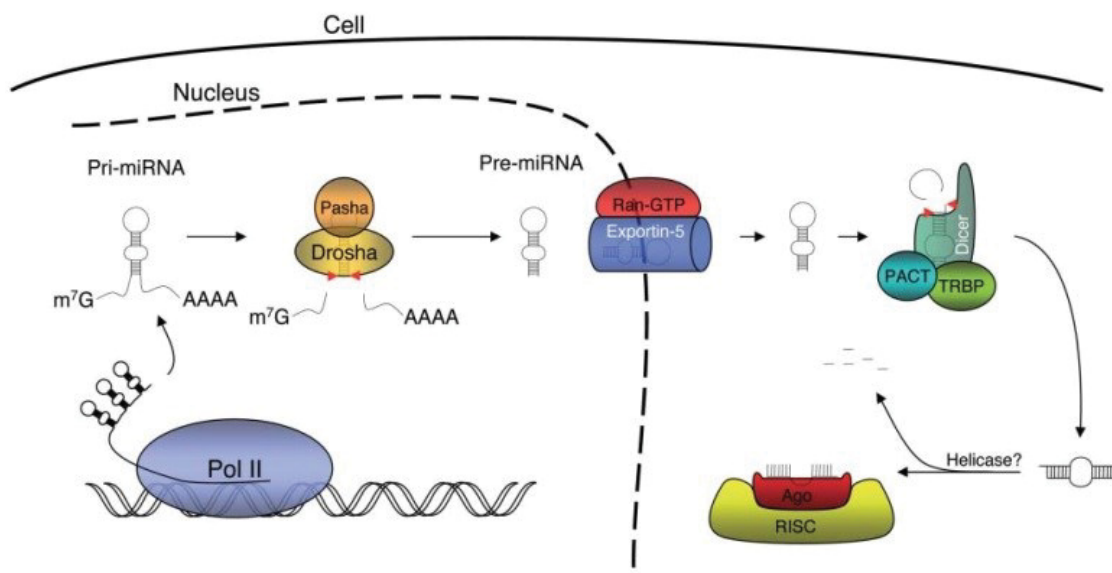


Figura 5: Biogênese dos miRNAs. O transcrito pri-miRNA é sintetizado pela RNA polimerase A II. Seguindo isto, o pri-miRNA é processado pela RNaseIII Drosha/Pasha para formar o pre-miRNA, que é exportado do núcleo, para o citoplasma, pela Exportina 5. No citoplasma, o premiRNA é processado pela RNaseIII Dicer, que gera um miRNA dupla fita que se liga, com a proteína Argonauta, a um complexo proteico denominado miRISC. A fita mais estável será o novo miRNA que estará pronto para interagir com mRNA alvo. **AAAA:** Cauda Poli-A; **Ago:** Proteína Argonauta; **Dirce:** Endoribonuclease Dirce; **Drosha/Pasha:** Complexo enzimático de clivagem de pri-miRNA; **Exportin-5:** Exportina-5; **m7G:** 7-metilguanosina; **PACT:** Proteína ativadora de PKR; **Pol II:** RNA Polimerase II; **Ran-GTP:** Proetina nuclear de ligação a GTP; **RISC:** Complexo de silenciamento induzido por RNA; **TRBP:** Proteína de resposta de transativação ligada ao RNA. **Fonte:** Cowland *et al.*2007.

2.2.2 miRNAs e sua relação com processos neurais e neurodegenerativos.

Os miRNAs possuem importantes papéis na neurogênese. Eles estão associados ao adequado funcionamento de células nervosas maduras (De Pietri *et al.* 2008), à diferenciação neuronal, plasticidade e excitabilidade de neurônios adultos e à responsividade neural de alguns neurotransmissores (Kocerha *et al.* 2009). Atuam na consolidação de mecanismos cognitivos como aprendizagem, memória e emoções, assim como na morfogênese de células neuronais, na regulação da síntese de proteínas sinápticas e no envelhecimento (Lukiw, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017).

A regulação sináptica realizada pelos miRNAs também pode ajudar a modular a cognição e o comportamento (Pereira, 2015). O transporte de miRNAs, secretados por neurônios e células da glia, em vesículas extracelulares, está fortemente relacionado à comunicação intercelular e ao processo de neuroinflamação (Pegtel *et al.* 2014; Denk *et al.* 2018).

Os miRNAs são especificamente expressos em diferentes regiões cerebrais e particularmente enriquecido em outras, nas quais sua concentração se relaciona com a função que desempenham (Hébert *et al.*, 2008). Perfis de cérebros humanos *post-mortem* revelaram mudanças significativas na expressão de miRNAs, em indivíduos afetados com DA, em relação aos indivíduos saudáveis, sugerindo uma íntima relação entre os miRNAs e as doenças neurodegenerativas (Schonrock *et al.*, 2010).

A hipótese de que os miRNAs possam estar associados às neuropatogêneses, também vem sendo estudada e testada em modelos animais como em *D. melanogaster* e em camundongos. Isso tem ajudado a elucidar várias vias, mecanismos e genes envolvidos (Hébert *et al.*, 2008).

2.2.3 miRNAs como biomarcadores para as doenças neurodegenerativas.

Os biomarcadores clínicos são parâmetros biológicos que podem ser medidos e monitorados experimentalmente, indicando a ocorrência de uma determinada função patológica em um organismo. Costumam ser avaliados de acordo com sua presença, concentração e atividade. Eles ajudam a monitorar fatores de risco à saúde, são de grande importância, para a intervenção terapêutica, e ajudam a evitar diagnósticos equivocados (Aluise *et al.*, 2008).

Os fluidos corporais são considerados valiosas fontes para a identificação de biomarcadores, relacionados a doenças neurodegenerativas. Neles, é possível encontrar

uma grande gama de biomarcadores, como proteínas e miRNAs, presentes em diferentes concentrações, que podem indicar uma patologia (Sheinerman & Umansky, 2013). Porém, cada fluido possui suas peculiaridades. O Líquido Cefalorraquidiano (LCR), por exemplo, possui grande especificidade devido seu contato direto com espaço extracelular do cérebro, mas é de obtenção difícil e invasiva, uma vez que é retirado por punção lombar. Já os biomarcadores encontrados no sangue são de fácil obtenção, podendo ser extraídos por meio de técnicas não invasivas. Contudo são considerados menos específicos do que o LCR, ao se tratar de neuropatologias (Sheinerman *et al.*, 2013; Batistela, 2016).

Segundo Denk *et al.* (2018), nem sempre os miRNAs circulantes em LCR demonstram melhor capacidade de classificação de demências, em relação aos encontrados no soro sanguíneo. Logo, nem sempre há correlação entre os níveis de miRNAs encontrado nesses dois fluidos, para uma mesma patologia. Weber *et al.* (2010) avaliaram a composição de miRNAs de doze diferentes fluidos humanos e encontraram uma identidade diferente, para cada um. Alguns miRNAs são comuns a todos, enquanto outros são específicos. Os miRNAs sanguíneos, até o momento, são os mais bem caracterizados (Pereira, 2015).

Para a DA, os biomarcadores atualmente disponíveis para o auxílio no diagnóstico são: o peptídeo β -amiloide (β A-42) e a proteína tau, total-TAU (t-tau) e TAU fosforilada (p-tau), que podem ser obtidos utilizando o LCR e a tomografia por emissão de pósitrons (Frota *et al.*, 2011; Babiloni, 2017). Já para a DCL, DP e DPD, a proteína α -sinucleína, presente em fluidos corporais tais como sangue e LCRs, é um potencial biomarcador (Hong *et al.*, 2010; Mollenhauer, 2014).

Atualmente, os miRNAs também têm se mostrado biomarcadores promissores, com o intuito de auxiliar no diagnóstico diferencial das demências. Eles são estáveis em fluidos biológicos e podem circular nos mesmos, empacotados em microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos, associados com complexos lipoproteicos ou proteínas das famílias Argonauta, tornando-se resistentes à ação das RNases presentes no ambiente extracelular (Leidinger *et al.*, 2013; Batistela *et al.*, 2017). Os miRNAs podem agir a grandes distâncias, de onde foram produzidos, participando do processo de comunicação intercelular (Pereira, 2015). Eles também se mostram estáveis a ciclos de congelamentos (Denk *et al.* 2018).

Os miRNAs estão envolvidos com a produção de proteínas com efeitos tóxicos, que se acumulam no sistema nervoso, como no caso de doenças neurodegenerativas, onde esses miRNAs mostram alterações em sua atividade e expressão (Eacker *et al.*, 2009; Cookson, 2009). Diversos miRNAs estudados já foram observados, como tendo sua concentração alterada e desregulada em neuropatologias. Na DA, por exemplo, foram evidenciados miRNAs relacionados a genes chaves na produção do peptídeo β -amiloide,

como o *APP* e o *BACE1*. Padrões de expressão alterados foram identificados não apenas no cérebro, mas também em soro e LCR de pacientes com a enfermidade (Tan *et al.*, 2013).

2.3 hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-342-3p como candidatos para o diagnóstico diferencial de DA, DCL, DPD e de controles cognitivamente saudáveis

Diversos miRNAs têm sido descritos como tendo implicação direta na regulação de genes chaves, envolvidos em mecanismos neurais. Muitas vezes estes miRNAs encontram-se desregulados em doenças neurodegenerativas, podendo servir como potenciais biomarcadores para as mesmas.

Batistela (2016) encontrou, por sequenciamento de nova geração (NGS), o perfil de expressão de vários miRNAs circulantes no soro de pacientes com DA, DCL e DPD e os comparou entre si, assim como com o perfil do soro de idosos controles cognitivamente saudáveis (CTRL), a fim de encontrar candidatos promissores à biomarcadores, que auxiliem no diagnóstico diferencial dessas três demências. Dentre os miRNAs encontrados, pela autora, se destacaram:

- O hsa-miR-125a-5p, que se mostrou mais expresso em soro de pacientes com DA, independente do grupo de referência, com um (*Fold Change*) FC = 4,06 e p = 0,0074 (DA x CTRL), FC = 3,12 e p = 0,021 (DA x DCL) e FC = 4,19 e p = 0,00076 (DA x DPD).
- O hsa-miR-30d-5p, que foi encontrado superexpresso no soro de pacientes com DCL, independente do grupo de referência, com um FC = 9,4 e p = 0,000084 (DCL x CTRL) e FC = 16,37 e p = 2,23x10⁻⁵ (DCL x DPD).
- O hsa-miR-342-3p, que se mostrou mais expresso no soro de pacientes com qualquer uma das três demências, aqui estudadas, em relação ao grupo controle, com um FC = 20,22 e p = 0,000009 (DA x CTRL), FC = 11,6 e p = 0,0023 (DCL x CTRL) e FC = 4,22 e p = 0,016 (DPD x CTRL).

2.3.1 hsa-miR-125a-5p

O hsa-miR-125a-5p é um pequeno RNA não codificante que possui 24 nucleotídeos de comprimento. Sua sequência, que se inicia na posição 15 da fita e termina na de 38, é formada pelos nucleotídeos: 15-uccugagaccuuuaaccuguga-38 (Figura 6). Junto com o hsa-miR-125a-3p, é um dos miRNAs maduros, produto do gene miR-125a, que se encontra no cromossomo 19q13.41. O gene *miR-125a* se localiza em uma região intergênica próxima do *let-7* e do miR-99B, e é transcrito com estes (miRBase, 2018a; Tuna

& Erson, 2008). O *let-7*, encontrado inicialmente em *Caenorhabditis elegans*, foi um dos primeiros miRNAs a serem descobertos. Ele está relacionado ao controle de padrões temporais de desenvolvimento dos diferentes estágios desse animal. Foram encontrados homólogos desse miRNA em diferentes organismos como vertebrados, artrópodes, anelídeos, moluscos, entre outros, incluindo *Homo sapiens*, nos quais suas sequências possuem alinhamento parcial, se comparada a de *C. elegans* (Pereira. 2015).

O hsa-miR-125a-5p se encontra relacionado a vários genes e vias neuronais, na espécie *H. sapiens*, que envolvem não só a regulação de processos metabólicos normais, mas também processos neuropatológicos. Pode-se observar o hsa-miR-152a-5p envolvido em vias relacionadas a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e sinapses serotoninérgicas, por exemplo (DIANA-mirParth v.3, 2018; Vlachos *et al.*, 2015).

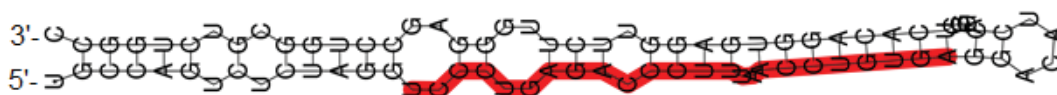


Figura 6: Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-125a-5p. Em vermelho, a sequência de bases que formam o miRNA maduro. **Fonte:** <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT000602#mirna>

2.3.2 hsa-miR-30d-5p

O hsa-miR-30d-5p é um pequeno RNA não codificante, que possui 22 nucleotídeos de comprimento. Sua sequência de nucleotídeos é: 6-uguaaacaucaccccgacuggaag-27 (Figura 7). Junto com o hsa-miR-30d-3p, é um dos miRNAs maduros, produto do gene *miR-30d*, localizado no cromossomo 8q24.22 (miRBase, 2018b; NCBI, 2018a)

O hsa-miR-30d-5p está relacionado à várias vias de regulação neuronal e neuropatológicas, descritas na espécie *H. sapiens*, as quais envolvem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, vias de sinapses serotoninérgicas, orientação de axônios, potenciação a longo prazo, sinapses glutamatérgicas, sinapse dopaminérgica, sinalização de neurotrofinas, sinapses colinérgicas, sinapses GABAérgica, entre outras (DIANA-mirParth v.3, 2018; Vlachos *et al.*, 2015).

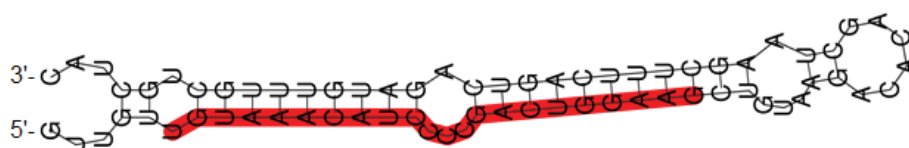


Figura 7: Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-30d-5p. Em vermelho, a sequência de bases que formam o miRNA maduro. **Fonte:** <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT003274>

2.3.3 hsa-miR-342-3p

O hsa-miR-342-3p é um pequeno RNA não codificante, que possui 23 nucleotídeos de comprimento. Sua sequência nucleotídica se caracteriza por: 61-ucucacacagaaaucgcacccgu-83 (Figura 8). Junto com o hsa-miR-342-5p, ele é um dos miRNAs maduros, produto do gene *miR-342*, cuja localização cromossômica é 14q32.2 (miRBase, 2018c; NCBI, 2018b).

O hsa-miR-342-3p está envolvido em várias vias de regulação neuronal e neuropatológicas, em *H. sapiens*, as quais envolvem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, via de sinalização do hipocampo, orientação de axônios, potenciação a longo prazo, sinapses glutamatérgicas, sinapse dopaminérgica, sinalização de neurotrofinas, ocorrência de gliomas, via de sinalização Notch, via de sinalização Wnt, entre outras vias gerais e específicas, envolvendo a participação de diversos genes (DIANA-mirParth v.3, 2018; Vlachos *et al.*, 2015).

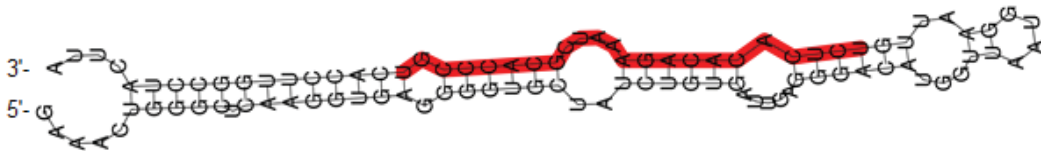


Figura 8: Estrutura secundária do pre-miRNA do hsa-miR-342-3p. Em vermelho, a sequência de bases que formam o miRNA maduro. **Fonte:** <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT005881>

3 JUSTIFICATIVA

Em 2010 encontraram diferentes porcentagens de prevalência para as demências em indivíduos com mais de 60 anos, em diferentes partes do mundo. Na Europa, a prevalência é de 6,2%, nas Américas 6,5%, na América do Sul 7%, na Ásia 3,9% e na África 2,6% (Prince *et al.*, 2013). No Brasil, sabe-se que a prevalência média, na população idosa, é mais elevada do que a mundial, estando previsto um aumento de 7,6% a 7,9% de 2010 a 2020, o que equivale a 55.000 novos casos por ano (Burlá *et al.*, 2013). Com o aumento da expectativa de vida e com o envelhecimento populacional, as demências se tornam um problema de saúde pública, com elevados gastos. Desta forma, torna-se necessário o investimento em estudos que procurem compreender melhor o processo natural de envelhecimento, assim como suas patologias associadas (Brucki *et al.*, 2011).

O diagnóstico das demências só pode ser confirmado após análise histopatológica *post-mortem* do cérebro do indivíduo acometido. Considerando as particularidades de cada demência e as sobreposições de sintomas, um diagnóstico preciso é de grande importância para as tentativas de diminuir, retardar e tratar da maneira correta sua progressão. Deste modo, a busca por marcadores diagnósticos e prognósticos, mais práticos e menos invasivos, tornam-se importantes (Pereira, 2015; Guerreiro *et al.*, 2016; Babiloni *et al.*, 2017). O estudo da expressão de miRNAs, pela técnica de qPCR, pode ajudar não apenas a identificar um bom biomarcador, como também a produzir painéis e bibliotecas de miRNAs envolvidos em patologias (Denk *et al.*, 2018). Essa técnica foi escolhida para o atual estudo pois, é uma técnica de baixo custo e se mostra uma boa opção para a validação de miRNAs diferencialmente expressos e já conhecidos (Sheinerman & Umansky, 2013; Wegner, 2016; Batistela *et al.*, 2017).

Posto isto, o atual trabalho vem a contribuir de forma a buscar nos miRNAs circulantes em soro, um biomarcador confiável, não invasivo e de fácil obtenção que possa ajudar a estabelecer um diagnóstico diferenciado para a DA, DCL e DPD, ainda em vida. O que pode auxiliar, também, no tratamento dessas demências e assim, reduzir a possibilidade de diagnósticos equivocados e de gasto públicos, além de proporcionar um aumento na qualidade de vida da população senil.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Validar a expressão de miRNAs circulantes em soro de pacientes com demências neurodegenerativas como opção de biomarcadores para o diagnóstico diferencial dessas neuropatologias.

4.2 Objetivos Específicos

- Validar a expressão diferencial dos miRNAs hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-342-3p, pela técnica de RT-qPCR, em soro de pacientes idosos com DA, DCL e DPD, em amostras coletadas previamente, e comparar com o grupo de idosos controles cognitivamente saudáveis.
- Comparar os resultados encontrados, por RT-qPCR, com os encontrados anteriormente por NGS, por Batistela (2016).
- Obter dados sobre a especificidade e sensibilidade dos miRNAs, para ajudar a reforçar a confiabilidade de seu uso como possíveis biomarcadores para as demências em questão.
- Analisar possíveis genes alvos relacionados com esses miRNAs por meio de análises *in silico*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Características gerais das amostras

Para esse estudo, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo de pacientes idosos com demências (DA, DCL e DPD) e de idosos cognitivamente saudáveis, que formaram o grupo controle (CTRL). Os participantes, que eram de ambos os sexos, possuíam entre 60 e 88 anos e foram diagnosticados por meio de exames de imagens, laboratoriais e testes e escalas psicológicas como o; Mini Exame de Estado Mental (MEEM), Escala Geriátrica de Depressão (GDS), Atividade Instrumental de Vida Diária (PFEFFER) e Avaliação Clínica de Demências (CDR) (Anexos 1 a 4). Todos os pacientes com DA, presentes no estudo, foram classificados como CDR 2. As amostras foram coletadas no ano de 2016, no Hospital das Clínicas (HC) e no Instituto de Neurologia de Curitiba (INC). O grupo controle foi composto por parentes e acompanhantes dos pacientes, que preenchiam os critérios médicos e os de idade. Para ambos os grupos, idosos doentes e saudáveis, a participação só ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras de soro estão armazenadas em freezer -80°C, no Laboratório de Polimorfismos e Ligação, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A quantidade de soro disponível para cada grupo está evidenciada na tabela 3. Amostras com absorvância a 414 nm maior que 0.2, consideradas hemolisadas, não foram incluídas no estudo, devido a esse fator não foram utilizadas no estudo todas as amostras evidenciadas na tabela 3.

Tabela 3 - Número total de amostras de soro sanguíneo, de pacientes com demências e de controles, estocadas no laboratório de Polimorfismos da UFPR.

Diagnóstico:	Nº de Pacientes
DA	85
DCL	16
DPD	7
CTRL	12
Total:	120

Obs: DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

Também foram utilizadas sete amostras de idosos cognitivamente saudáveis, de ambos os sexos, cuja origem é menonita. Os idosos desse grupo possuíam idade entre 64 e 81 anos e foram classificados como cognitivamente saudáveis, através do score obtido pelo MEEM. As amostras foram cedidas pelo laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) da UFPR. Essas amostras foram usadas com o objetivo de aumentar o número amostral do

grupo controle, que se encontrava baixo, passando de dez indivíduos para 17. Para que pudéssemos ter a certeza de que se tratava de um grupo homogêneo e de que às amostras controles menonitas poderiam ser unidas as amostras controle estocadas, no laboratório de Polimorfismos, foram realizados testes de homogeneidade, cujo parâmetro utilizado foram os valores de FC, obtido pela RT-qPCR. Foi encontrado $p = 0.8449$, não significativo, indicando que as amostras são homogêneas e, portanto, podem ser agrupadas.

5.2 Validação de miRNAs previamente verificados como diferencialmente expressos.

Para a validação, por RT-qPCR, foram utilizados três diferentes miRNAs: Número de catalogo PN4427975, o hsa-miR-125a-5p (ID Assay: RT002198), o hsa-miR-30d-5p (ID Assay: RT000420) e o hsa-miR-342-3p (ID Assay: RT002260). Escolhidos a partir dos resultados de Batistela (2016), no qual foram sequenciados, pela técnica de NGS, e foram encontrados como superexpressos no soro de idosos com DA, DCL e DPD. Para isso, também foi utilizado o controle endógeno hsa-miR-16 (ID Assay: RT000391). A tabela 4 exibe a quantidade de amostras sequenciadas por Batistela (2016). Nessa etapa da metodologia, o objetivo foi verificar se a técnica de RT-qPCR corrobora os resultados encontrados para esses miRNAs, pela técnica de NGS.

Tabela 4- Relação de amostras coletadas para validação por RT-qPCR, que já foram sequenciadas por NGS, por Batistela (2016).

Nº Pacientes	Diagnóstico	Nº Mulheres	Nº Homens	Fluido Coletado
5	DA	3	2	Soro
4	DCL	2	2	Soro
5	DPD	3	2	Soro
5	CTRL	3	2	Soro
19		11	8	

Obs: DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

5.3 Validação independente de miRNAs

Além das amostras previamente verificadas como diferencialmente expressas, por NGS no trabalho de Batistela (2016), também foram validados de maneira independente, por RT-qPCR, outras amostras de idosos com demências e de grupo controle. A tabela 5 mostra a quantidade total de amostras utilizadas para a validação.

Tabela 5 - Número de amostras utilizadas total para a validação por RT-qPCR.

	miR-16	miR-125a-5p	miR-30d-5p	miR-342-3p
CTRL	17*	17*	11	11
DA	40	40	10	16
DCL	7	0**	7	7
DPD	10	0**	8	10

*: Nessa tabela nos grupos controles já estão incluídos os grupos CTRL menonitas. **: Para as amostras de DCL e DPD não foram realizadas as validações por qPCR, referente ao hsa-miR-125a-5p, devido a limitação de recursos. Não havia miRNA o suficiente para todas as amostras, então de maneira estratégica e planejada, alguns grupos foram priorizadas. **Obs:** DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

Tanto para a validação dos miRNAs previamente verificados como diferencialmente expresso, por NGS, quanto para os validados de maneira independente, por Rt-qPCR, foram realizadas comparações duas a duas, entre os diferentes grupos de amostras e de miRNAs, conforme mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Combinação entre grupos (CTRL, DA, DPD e DCL) para comparação da expressão dos hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-342-3p.

Comparação	
miR	Grupos
125	CTRL x DA
30	CTRL x DA
	CTRL x DPD
	CTRL x DCL
	DA x DPD
	DA x DCL
	DPD x DCL
342	CTRL x DA
	CTRL x DPD
	CTRL x DCL
	DA x DPD
	DA x DCL
	DA x DCL

Obs: DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

5.4 Extração de RNA total e análise da qualidade

Os miRNAs da amostra de soro foram extraídos por meio de kits de extração específicos (mirVana Paris), de acordo com as instruções do fabricante. (ANEXO 5).

Para aferir a concentração e qualidade das amostras extraídas, foi utilizado o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). A concentração de RNA total extraído de amostras de soro variou entre 2,5 ng/ul a 16,7 ng/ul, com uma média de 7,7ng/ul, com volume total de eluição de 200ul. Para os parâmetros de pureza (260/280) e contaminação (260/230), foram encontrados valores médios de 1,13 e 0,11 respectivamente, sendo que quando se trata de RNA o valor de pureza próximo de 2,0 é considerado ótimo (Batistela, 2016). Segundo Bustin *et al.*, (2009), devido à baixa acurácia de espectrofotômetros, como o Nano Drop, para aferir a pureza, valores abaixo do ótimo podem ser tolerados.

5.5 Produção de cDNA

A reação de PCR com Retrotranscrição (RT-PCR) utilizada para a produção de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA, foi feita com o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription*, conforme instruções do fabricante. (ANEXO 6).

5.6 PCR Quantitativa em Tempo Real

A PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), foi feita em triplicata para que houvesse uma maior confiabilidade dos resultados. Foi utilizado o método de detecção com sondas de hidrólise *TaqMan®*, conforme instruções do fabricante (ANEXO 7). Como controle endógeno (EC), foi utilizado o hsa-miR-16, que se mostrou um confiável normalizador em estudos anteriores, sendo específico para miRNAs de soro (Davoren, *et al.*, 2008).

5.7 Análises estatísticas

A quantificação da expressão por qPCR, foi feita pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$, que com os valores de Ct (*Cycle Threshold*) gerado pelos ciclos de amplificação, determina a expressão dos miRNAs, por meio da diferença entre o Ct do controle e do alvo. O valor final será apresentado por meio do valor de *fold change* (FC), que se refere a mediana dos valores de FC. O FC indica quantas vezes um determinado miRNA está mais expresso na amostra teste, em relação a amostra com a qual ela está sendo comparada. FC >1 indica superexpressão, FC=1 expressão inalterada e FC<1 menor expressão.

Utilizando os valores de FC obtidos através do cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$, foram realizados os demais testes estatísticos utilizando o programa R. Para testar a normalidade da amostra foi

utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov com a correção de Lilliefors, com pacote NORTEST. A variância também foi avaliada, e para a comparação entre as médias de amostras independentes, dentro do parâmetro de normalidade e com variância homogênea, foi realizado o Teste t de Student. Para amostras fora do parâmetro de normalidade ou que apresentaram uma variância significativamente heterogênea, foi utilizado o Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

5.8 Testes de sensibilidade e especificidade

O teste de sensibilidade e de especificidade realizado pela análise por curva ROC, cuja finalidade é ajudar a estabelecer o valor preditivo dos miRNAs, foi mensurado com o pacote R PredictABEL, no programa estatístico R.

A Curva ROC é uma ferramenta usada para medir e avaliar variações na sensibilidade (índice de positivos verdadeiros) e especificidade (índice de positivos falsos) de um potencial biomarcador, podendo prever problemas no desempenho do diagnóstico (Margotto, 2010). Sua medida AUC (área sobre a curva) mensura o índice de exatidão do teste, que deve ser capaz de discriminar casos verdadeiros de falsos, por exemplo, indivíduos doentes de não doentes, com o mínimo de erros possível, conforme a lógica da figura 9, que mostra a matriz de confusão. Quanto mais próximo os valores de verdadeiros (VP e VN) são de 1.0, ou seja 100%, mais confiável é o biomarcador ou o diagnóstico avaliado, para prever aquele resultado. Porém, valores acima de 0,7 já são considerados de desempenho satisfatório (Margotto, 2010).

		Valor Verdadeiro (Confirmado por análise)	
		Positivo	Negativo
Valor Previsto (predito pelo teste)	Positivos	VP Verdadeiro Positivo	FP Falso Positivo
	Negativos	FN Falso Negativo	VN Verdadeiro Negativo

Figura 9: Matriz de Confusão, da curva ROC e capacidade de diferenciar as seguintes condições: VP- Verdadeiro Positivo; FP- Falso Positivo; FN- Falso Negativo; VN- Verdadeiro Positivo **Fonte:** Rodrigues (2011)

5.9 Análise *in-silico* dos genes alvos do miR-125a-5p

Foram realizadas pesquisas nos bancos de dados miRbase, microrna.org, Target Scan Human, miRDB, miRecords, miRTarBase, TargetScan (Harmonizome) e mirParth v.3 (Diana Tools), e gerado uma lista de genes alvos para os miRNAs, cujos valores de p foram significativos. O objetivo foi investigar as principais vias biológicas envolvendo esse miRNA, que se relacionam ao Alzheimer.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Validação da expressão dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p

6.1.1 Comparação da expressão dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p em soro de pacientes com demências em relação ao grupo controle

Devido aos resultados encontrados ao longo do estudo, essa sessão irá focar apenas no hsa-miR30d-5p e no hsa-miR342-3p. Os resultados referentes ao hsa-miR-125a-5p serão tratados, em um tópico separado.

Os níveis de expressão do hsa-miR30d-5p e do hsa-miR342-3p, presentes em amostras de soro de pacientes com demências (DA, DPD e DCL), foram comparadas com amostras de soro de idosos do grupo controle cognitivamente saudáveis (CTRL), a fim de estimar se há diferença de expressão entre esses dois grupos.

Os resultados encontrados na comparação entre qualquer um dos grupos de idosos com demências em relação ao CTRL, não foram significativos para esses dois miRNAs, considerando $p < 0,05$ (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes com demência (DA, DPD e DCL) em relação ao grupo controle de idosos cognitivamente saudáveis (CTRL).

Grupo	miR	<i>fold change</i>	valor de p
DA x CTRL	hsa-miR-30d-5p	1,6	0,5529
	hsa-miR-342-3p	0,6846	0,3943
DPD x CTRL	hsa-miR-30d-5p	3,2677	0,2463
	hsa-miR-342-3p	0,4	0,1317
DCL x CTRL	hsa-miR-30d-5p	1,4	1,0000
	hsa-miR-342-3p	0,6	0,3011

Obs: DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

6.1.2 Comparação da expressão dos dos miRNAs hsa-miR30d-5p e hsa-miR342-3p entre os grupos de pacientes com as diferentes demências

Os níveis de expressão do hsa-miR30d-5p e do hsa-miR342-3p, presentes no soro de pacientes com diferentes demências, foram comparados dois a dois (DAXDPD, DAXDCL e DCLXDPD), para estimar se há diferença entre eles. Conforme ilustrado na tabela 8, não houve resultados significativos entre os grupos, para esses miRNAs, considerando $p < 0,05$.

O boxplot da figura 10 e 11 ilustra os valores de FC encontrados entre as diferentes amostras para os miRNAs hsa-miR30d-5p e do hsa-miR342-3p, respectivamente.

Tabela 8- Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes, comparando as diferentes demências duas a duas (DAxDPD, DAxDCL e DPDxDCL).

Grupo	miR	<i>fold change</i>	Valor de p
DA x DPD	hsa-miR-30d-5p	0,5247	0,2523
	hsa-miR-342-3p	1,1049	0,2776
DA x DCL	hsa-miR-30d-5p	1,0	1,0000
	hsa-miR-342-3p	1,1366	0,2625
DCL x DPD	hsa-miR-30d-5p	0,4794	0,0721
	hsa-miR-342-3p	1,0	0,7546

Obs: DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

Os dados de expressão obtidos para o hsa-miR-30d-5p não se mostraram significativos, entre qualquer uma das comparações (Tabela 7 e 8). No trabalho de Batistela (2016), porém, esse miRNA foi encontrado superexpresso no soro de pacientes com DCL, independente do grupo de referência. Foram obtidos valores de FC = 9,4 e p = 0,000084 (DCL x CTRL) e FC = 16,37 e p = 2,23x10⁻⁵ (DCL x DPD). Embora o atual estudo não tenha encontrado resultados semelhantes, esse miRNA tem se mostrado uma opção de biomarcador para demências, em outras pesquisas. Serafin *et al.*, (2015) encontraram o miR-30b-5p, da mesma família do miR-30d-5p, superexpresso de forma significativa em pacientes com DP. Denk *et al.*, (2018) encontraram por meio da análise por qPCR, resultados que diferenciam a DA da DFT, por meio da expressão do hsa-miR-30a-5p. Uma revisão feita por Satoh (2012) traz uma série de pesquisas nas quais, dentre vários miRNAs, a família do miR-30, inclusive miR-30d, encontra-se expresso de maneira desequilibrada na DA. Nessa mesma linha de pesquisa, uma revisão feita por Viswambharan *et al.* (2017) traz diferentes estudos, que demonstram o miR-30d, entre outros da mesma família, desregulados em doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose múltipla, evidenciando sua vasta participação em mecanismos cerebrais e processo neurodegenerativos.

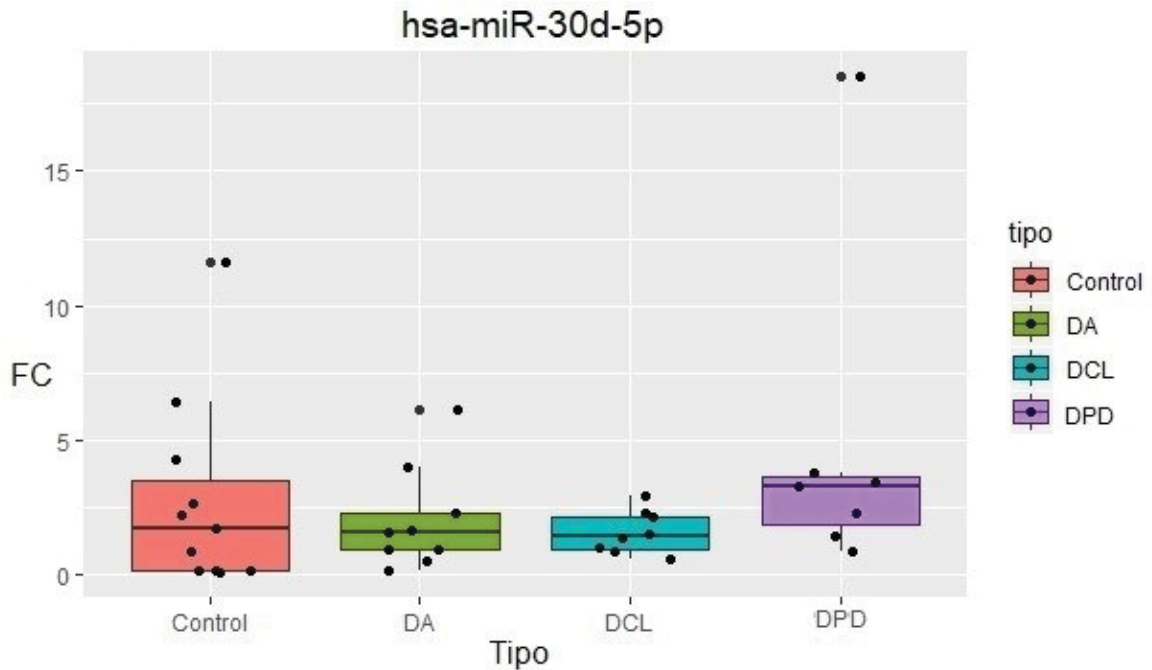


Figura 10 – Boxplot referente ao hsa-miR-30d-5p, comparando os valores de FC entre os grupos; Controle; DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência. **Fonte:** Autor (2019).

Para o hsa-miR-342-3p, também não foram encontrados resultados significativos (Tabela 7 e 8). Batistela (2016) o encontrou superexpresso no soro de todos os grupos de pacientes (DA, DCL e DPD) em relação ao grupo controle. Com valores respectivos de FC = 20,22 e $p = 0,000009$ (DA x CTRL), FC = 11,6 e $p = 0,0023$ (DCL x CTRL) e FC = 4,22 e $p = 0,016$ (DPD x CTRL). Os resultados de Bastitela (2016) indicaram o miR-342-3p como uma possível opção de biomarcador sanguíneo para diferenciar pacientes com as demências, em questão, de idosos cognitivamente saudáveis. Apesar de não ter sido encontrados resultados, nesse estudo, que corroboram os de Batistela (2016), outros estudos recentes relacionam o envolvimento desse miRNA em demências. Tan *et al.*, (2014b) encontraram o hsa-miR-342-3p diferencialmente expresso no soro de pacientes com DA, obtendo uma sensibilidade de 81,5% e especificidade de 70,1%, que mostra a acurácia desse miRNA em diferenciar a doença. O mesmo miRNA também foi encontrado superexpresso em pacientes com DA, em relação a indivíduos saudáveis, no trabalho de Cheng *et al.*, (2015), no qual usaram a técnica de *next-generation deep sequencing* para encontrar o perfil dos miRNAs exossomícos séricos, que foram validados por RTq-PCR.

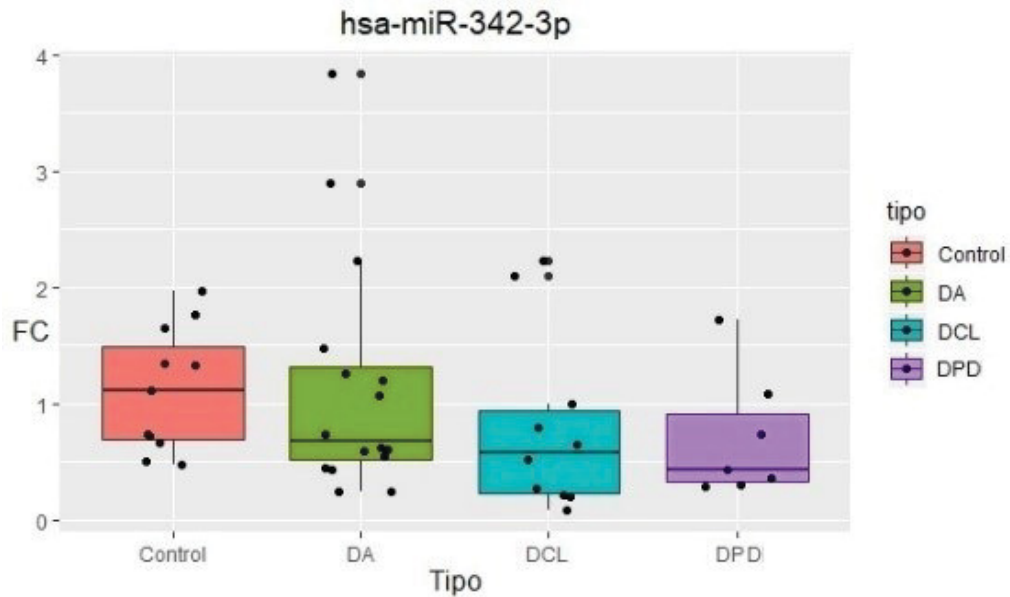


Figura 11: Boxplot referente ao hsa-miR-342-3p, comparando os valores de FC entre os grupos; Controle; DA- Doença de Alzheimer; DCL- Demência com Corpos de Lewy; DPD- Doença de Parkinson com Demência. **Fonte:** Autor (2019).

As diferenças encontradas entre os resultados do atual trabalho, nos quais esses dois miRNAs não apresentaram expressão diferenciada, com os trabalhos realizados por Batistela (2016), no qual houve expressão diferenciada, podem estar relacionadas com diversos fatores como o número amostral, sendo esse maior no atual estudo, ou diferenças encontradas nas sensibilidades das técnicas NGS x RT-qPCR.

O NGS e o RT-qPCR são atualmente os métodos mais utilizados para detecção de miRNAs (Sheinerman & Umansky, 2013). Estudos como o de Nassipoue *et al.* (2014) sugerem a existência de uma concordância mínima entre as duas técnicas, ou seja, os resultados encontrados podem diferir para um mesmo elemento, o que pode ocorrer devido as diferenças de sensibilidade e exigir cuidado na identificação de miRNAs confiáveis como biomarcadores (Mestdagh *et al.*, 2014; Moldovan *et al.*, 2014; Wegner, 2016). Porém, apesar da discussão quanto a sensibilidade das plataformas, esses métodos possuem diferentes vantagens e objetivos. O NGS não possui um limite superior para a quantificação e possui uma ampla faixa de níveis de expressão de detecção dos transcritos (Wang *et al.* 2009). Ele é capaz de quantificar grandes quantidades de miRNAs simultaneamente, sendo uma boa escolha quando o objetivo é observar a expressão de miRNAs ainda não conhecidos e monitorar a expressão de todos os miRNAs presentes nos fluídos. Já a técnica de RT-qPCR é uma técnica economicamente mais viável e usada principalmente para a validação de miRNAs diferencialmente expressos e já conhecidos

(Garibyan & Avashia, 2013; Sheinerman & Umansky, 2013; Pereira, 2015; Wegner, 2016; Batistela *et al.*, 2017).

Nassipoue *et al.* (2014) trabalharam com miRNAs de urina humana, visando encontrar promissores biomarcadores para lesão epitelial tubular renal induzida por drogas. Os autores compararam o NGS com a RT-qPCR e encontraram sugestões de que o NGS obteve maior especificidade nesse estudo. O NGS identificou isoformas de miRNAs que formavam a maioria das alterações dos miRNAs porém não foi capaz de detectar miRNAs de baixa abundância nas amostras de urinas, que foram detectadas pela RT-qPCR. Já Lee *et al.* (2014b) encontraram em seus estudos uma alta taxa de validação, com a técnica NGS, para miRNAs diferencialmente expressos em neoplasias gastrointestinal pré-maligna. Os autores colocaram que a NGS e a RT-qPCR tem correlação modesta para quantificação absoluta, porém, grande correlação ao se comparar a expressão de diferenças nos grupos.

Tais estudos sugerem que ambas as técnicas possuem suas vantagens e especificidades, embora deixe claro a diferença de sobreposição que pode haver entre os valores vistos para um mesmo produto. Sendo assim, elas ajudam a explicar a diferença de resultados encontrados entre os o atual estudo e o de de Batistela (2016), para o hsa-miR-30d-5p e o hsa-miR-342-3p.

6.2 Validação da expressão do miRNA hsa-miR125a-5p

6.2.1 Comparação da expressão do miRNA hsa-miR125a-5p em soro de pacientes com demências em relação ao grupo controle

O nível de expressão do hsa-miR125a-5p, presente em amostras de soro de pacientes com DA, foi comparado com amostras de soro do grupo CTRL, a fim de estimar se há diferença entre elas.

Os resultados, observados na tabela 9, mostram um valor de FC = 2,7 e um valor de $p = 0,00009217$, considerando $p < 0,05$, indicando que o hsa-miR125a-5p se encontra significativamente superexpresso em até 2,7 vezes no grupo de pacientes com DA em relação ao CTRL. Isso evidencia que o hsa-miR125a-5p tem potencial para ser um biomarcador promissor que possa auxiliar em um diagnóstico prévio da DA, em relação aos idosos cognitivamente saudáveis.

Tabela 9- Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes, comparando DA x CTRL.

Grupo	miR	<i>fold change</i>	valor de p
DA x CTRL	hsa-miR-125a-5p	2,7	9,217e-05

Obs: Controle, DA- Doença de Alzheimer; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

O box plot da figura 12 ilustra a diferença nos valores de FC encontrados entre o grupo DA e CTRL. Os valores de FC do grupo DA tem maior variância do que o FC do grupo CTRL. Essa grande variância nos pacientes com Alzheimer pode ajudar a entender o menor valor de FC encontrado no atual estudo em relação aos encontrados no estudo de Batistela (2016), evidenciado pela tabela 10. O presente estudos contou com número amostral maior, sendo assim as diferenças na variância podem ter se tornado mais evidentes. Além disso, a grande variância encontrada no grupo DA, mostra a complexidade dessa doença e sua falta de homogeneidade. A doença de Alzheimer se caracterizada pela diversidade de sintomas e dificuldade em identifica-los previamente, o que novamente evidencia a necessidade de um diagnóstico preciso e um tratamento adequado.

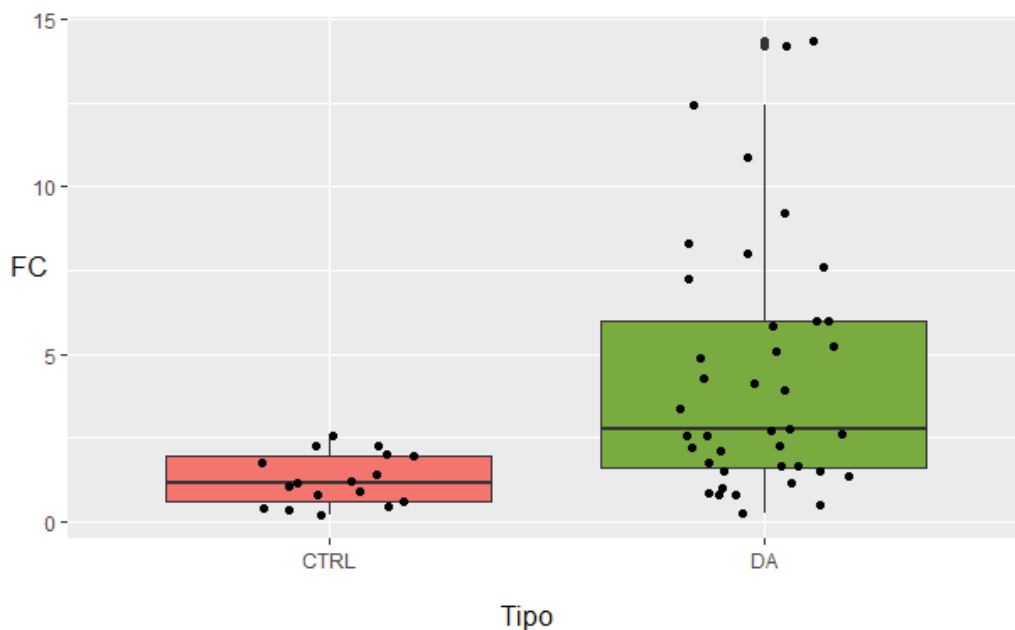


Figura 12: Boxplot referente ao hsa-miR-125a-5p, comparando os valores de FC entre os grupos; CTRL- Controle; DA- Doença de Alzheimer. **Fonte:** Autor (2019).

Já no gráfico da figura 13, podemos observar como se comporta a distribuição dos dois grupos. No grupo DA os valores de FC apresentam uma densidade menor, se comparada ao grupo CTRL, o que novamente evidencia sua maior variância. No gráfico podemos observar que valores acima de quatro, aproximadamente, caracterizam apenas indivíduos pertencentes ao grupo DA, que se estende até 15. Isso, além de evidenciar a superexpressão do hsa-miR-125a-5p, pode representar um limiar para a diferenciação da doença nesse estudo.

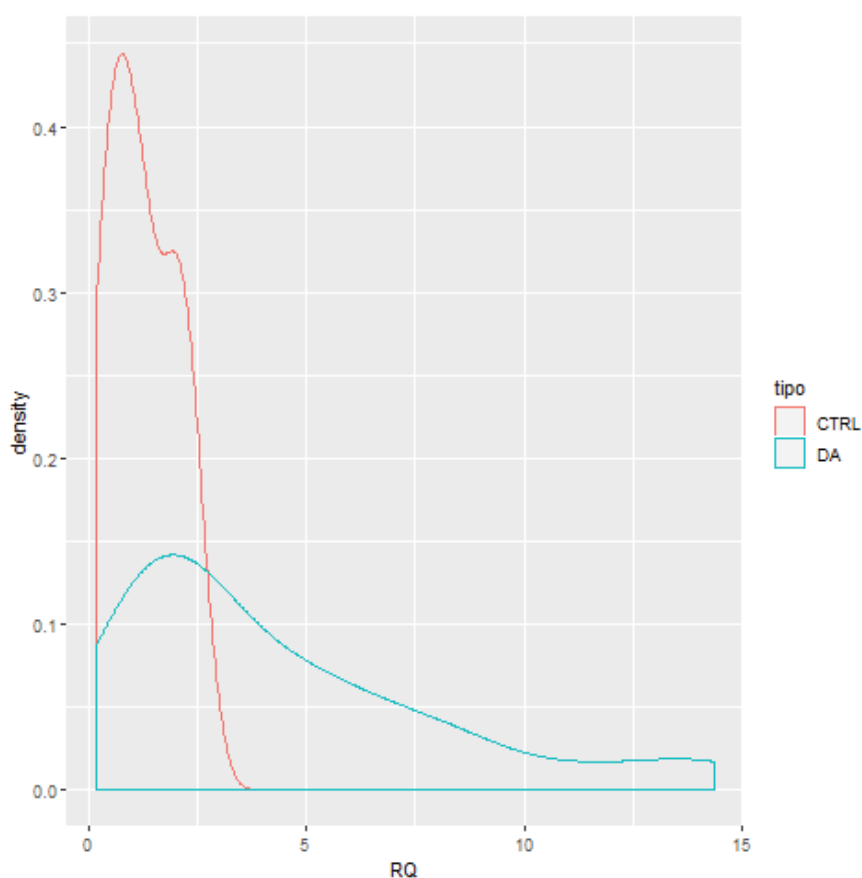


Figura 13: Gráfico referente ao hsa-miR-125a-5p, mostrando a relação entre os valores de FC (RQ) e densidade dos grupos; CTRL- Controle; DA- Doença de Alzheimer. **Fonte:** Autor (2019).

6.2.2 Comparação entre os resultados de expressão encontrados por RT-qPCR e por NGS para o hsa-miR125a-5p

Batistela (2016) empregou a técnica de NGS e encontrou um valor de FC = 4,6 e um $p = 0,0074$ para a expressão do hsa-miR125a-5p ao comparar o soro de pacientes com DA com o grupo CTRL, indicando que, por essa técnica, o hsa-miR125a-5p, se encontra superexpresso no soro do grupo com a demência (Tabela 10). No atual trabalho, os valores encontrados pela técnica da RT-qPCR, foram FC = 2,7 e $p = 0,00009217$. Isso também indica uma superexpressão em pacientes com Alzheimer, em relação aos idosos cognitivamente saudáveis (tabela 9 e 10). Com isso, a técnica de RT-qPCR corroborou os resultados previamente obtidos para esse miRNA por NGS no estudo de Batistela (2016). Já é conhecido que os resultados encontrados para um mesmo miRNA podem diferir quando submetidos à diferentes técnicas (Mestdagh *et al.*, 2014; Moldovan *et al.*, 2014; Wegner, 2016). Sendo assim os dados aqui encontrados reforçam ainda mais o hsa-miR125a-5p, como um biomarcador promissor para ajudar em um diagnóstico mais preciso para a doença de Alzheimer.

Tabela 10: Perfil da expressão diferencial dos miRNAs do soro de pacientes, comparando DA x CTRL em amostras sequenciadas pela técnica de NGS por Batistela (2016) e amostras validadas por qPCR por Souza (2019).

Grupo	Técnica	miR	<i>fold change</i>	valor de p	Autor
DA x CTRL	RT-qPCR	hsa-miR-125a-5p	2,7	9,217e-05	Souza (2019)
	NGS		4,6	0,0074	Batistela (2016)

Obs: Controle, DA- Doença de Alzheimer; CTRL- Grupo Controle. **Fonte:** Autor (2019).

Vários outros estudos demonstram a atuação desse grupo de miRNAs em processos de regulação cerebral e neuropatologias. Yuan *et al.* (2018), por exemplo, relataram a relação da família dos miR-125 com o desenvolvimento de gliomas de baixo grau pediátrico. Já Tan *et al.* (2014a) evidenciam o miR-125b circulante, como uma opção de biomarcador para a doença de Alzheimer. Denk *et al.* (2018) encontrou o hsa-miR-125a-5p diferencialmente expresso no LCR de pacientes com DA, diferenciando a demência em até 74% dos casos dos controles. Ma *et al.* (2017) encontraram o miR-125b superexpresso em pacientes com DA. Esse aumento nos níveis de expressão, encontrados por Ma e colaboradores, causou a hiperfosforilação da tau, induziu estresse oxidativo, inflamação, apoptose e inibiu a proliferação celular, exemplificando como a desregulação desse miRNA, pode afetar a bioquímica do cérebro, contribuindo para o aparecimento de neuropatologias.

Os trabalhos aqui citados, são referentes à família do miR125 como um todo, pois estudos envolvendo o hsa-miR-125a-5p ainda são escassos. Assim sendo, os resultados

aqui encontrados, podem ser inéditos. Estudos que mostram a expressão desregulada e aberrante da família miR-125, evidenciam sua contribuição para as disfunções neurais e aparecimento de neuropatologias. O estudo de um mesmo grupo de miRNA pode ser útil para o monitoramento da progressão de determinadas demências (Denk *et al.* 2018).

6.2.3 Análise de predição da sensibilidade e especificidade do hsa-miR125a-5p por curva ROC

Neste estudo, para o modelo de predição por curva ROC, do hsa-miR125a-5p como biomarcador para a DA, foi obtido um AUC = 0,816, CI = 95%, [0,71 – 0,922] (figura 14). O resultado mostra que desempenho do hsa-miR125a-5p em diferenciar pacientes com DA de idosos cognitivamente saudáveis é satisfatório, possuindo uma confiabilidade elevada para essa finalidade (Figura 14).

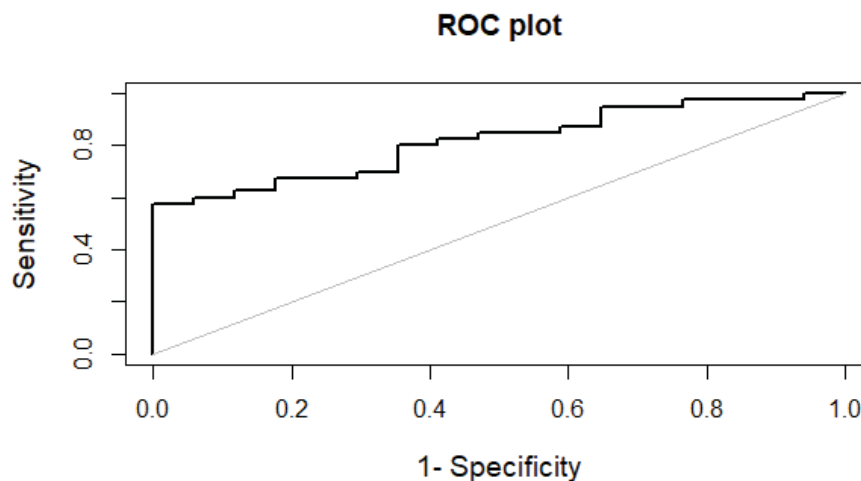


Figura 14: Curva ROC de sensibilidade e especificidade para o hsa-miR-125a-5p, como modelo de biomarcador para a doença de Alzheimer. **Fonte:** Autora (2019)

O resultado encontrado reforça o seu grande potencial como biomarcador para o diagnóstico precoce da DA, uma vez que, segundo Margotto, 2010, valores acima de 0,7 já são considerados de desempenho satisfatório.

Os resultados encontrados no estudo de Denk *et al.* (2018) corroboram os valores achados nesse estudo. Os autores estudaram o hsa-miR-125a-5p, utilizando uma metodologia parecida com a desse estudo, porém, para esse miRNA, em específico, utilizou amostras de LCR. Eles encontraram resultados semelhantes aos nossos, com diferença de expressão significativa para a diferenciação entre DA e grupo controle e um valor de AUC =

0,84. O que reforça o potencial do hsa-miR-125a-5p como um biomarcador promissor para o diagnóstico de demências, até mesmo em diferentes fluidos.

6.2.4 Análise *in-silico*: Predição dos principais alvos do hsa-miR-125a-5p e sua relação com as vias da doença de Alzheimer

Estudos relacionados ao desenvolvimento neuronal e a funcionalidade dos miRNAs, sugerem que a localização dos miRNAs influencia em sua função (Jeffries *et al.*, 2011; Olde *et al.*, 2012). Por isso, conhecer as vias metabólicas reguladas por esses miRNAs, assim como os genes regulados pós-transcricionalmente pelos mesmos, ajuda a elucidar as diferentes funções e papéis dos miRNAs e a compreender processos patológicos associados.

Através da pesquisa na ferramenta DIANA TOOLS, utilizando a base de dados mirParth v.3, foi gerada uma lista de genes alvos, para o hsa-miR125a-5p, que se relacionam com a doença de Alzheimer, via KEEG (Tabela 11). Com esses dados, podemos avaliar melhor a forma de atuação desse miRNA nessa doença, assim como sua interação com os genes associados. Foram encontrados sete principais genes relacionados ao hsa-miR125a-5p, com um valor de p significativo de $3,17e-13$, indicando uma forte associação entre ambos. Os genes encontrados foram: *APP* (*Amyloid beta precursor protein*), *ATP2A2* (*ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 2*), *ATP5A1* (*ATP synthase F1 subunit alpha*), *ATP5G2* (*ATP synthase membrane subunit c locus 2*), *COX7A2* (*Cytochrome c oxidase subunit 7A2 like*), *NDUFB6* (*NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6*) e *NDUFS7* (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S7*). A tabela 11 mostra os genes regulados pelo miRNA125a, sua posição cromossômica, assim como exemplos de artigos que vinculam esses genes ao Alzheimer. A figura 15 ilustra as vias metabólicas dessas interações entre genes e miRNA

Tabela 11- Genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p, sua localização cromossômica, Vias KEGG de identificação, método Tarbase e relação com demências neurodegenerativas.

Via KEEG de identificação da Doença de Alzheimer (hsa05010)					
Gene Regulado	Valor de P	Posição Cromossômica	Base de dados	Método Tarbase	Autores
APP	3,17E-13	21q21.3	mirParth v.3	HITS-CLIP	Friedman <i>et al.</i> , 2004 Pimenova <i>et al.</i> , (2014)
ATP2A2		12q24.11		HITS-CLIP	Kang & Friedmann (2015)
ATP5A1		18q21.1		HITS-CLIP	Zali <i>et al.</i> (2015).
ATP5G2		12p13.3		Multiple	Meda <i>et al.</i> (2012).
COX7A2		2p21		HITS-CLIP	Adav <i>et al.</i> (2019).
NDUFB6		9p21.1		HITS-CLIP	Adav <i>et al.</i> (2019).
NDUFS7		19p13.3		PAR-CLIP	Adav <i>et al.</i> (2019).

Obs: Métodos Tarbase utilizados – **HITS-CLIP** ou **CLIP-Seq**: Sequenciamento de alto rendimento de RNA isolado por imunoprecipitação reticulante. **PAR-CLIP**: Reticulação e imunoprecipitação realizadas por ribonucleósidos fotoactiváveis. **Multiples**: Múltiplos métodos. **Fonte:** Autora (2019)

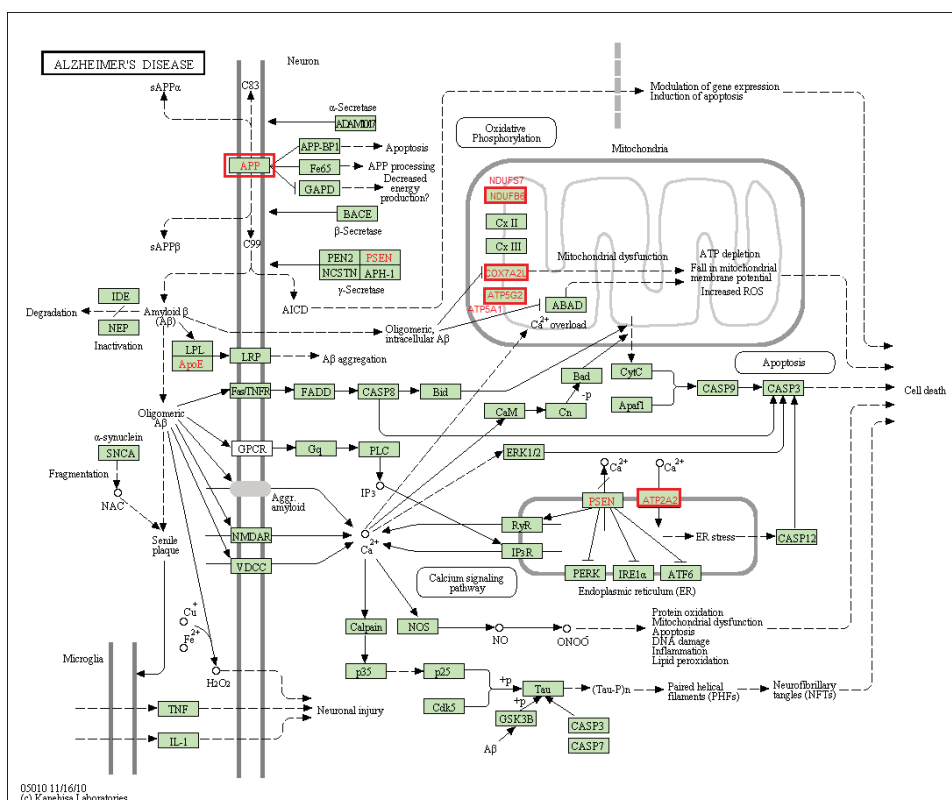


Figura 15 – Via KEEG de identificação e genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p relacionados à doença de Alzheimer. **Fonte:** mirParth - <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath/reverse>.

Dos miRNAs conhecidos, aproximadamente 70% são expressos no tecido cerebral, sendo alguns enriquecidos nesse órgão e envolvidos em importantes processos biológicos como neurogênese, diferenciação e plasticidade sináptica (Nowak & Michlewski, 2013; Kumar & Reddy, 2016). O hsa-miR-125a-5p encontra-se relacionado a vários genes e vias que envolvem a regulação de processos metabólicos gerais, como por exemplo, a via de sinalização Notch, que atua principalmente no desenvolvimento de células embrionárias, porém cujos componentes também estão ativos e expressos no cérebro de adultos (Ableset *al.*, 2011). Essa via foi encontrada no estudo realizado por Batistela (2016), como predita exclusivamente para o perfil de expressão sérico em DA, envolvida com o miR-125a-5p.

As figuras de 16 a 29 foram extraídas do GETx Portal e estão disponíveis no site (<https://gtexportal.org/home/>). Elas ilustram quantitativamente o padrão de expressão tecido-específico, representados pela mediana, dos mRNAs dos genes alvos do hsa-miR125a-5p, expostos nas tabelas 11. As barras amarelas, incluídas no retângulo amarelo, das primeiras imagens dos respectivos genes tem por objetivo mostrar sua expressão no tecido cerebral, relacionando-a com sua expressão em outras estruturas corporais, como forma de comparação. Já a segunda imagem mostra com mais detalhes as medianas referentes a expressão das diferentes estruturas cerebrais.

Analisando a via KEGG de identificação, por meio do mirParth v.3 disponível em (<http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>), e ilustrada na Tabela 11, observa-se que em relação à doença de Alzheimer, o hsa-miR-152a-5p está associado a genes como *APP*, *ATP2A2*, *ATP5A1*, *ATP5G2*, *COX7A2*, *NDUFS7* e *NDUFB6*. Esses genes, a maioria mitocondriais, não foram encontrados simultaneamente relacionados a esse miRNA e à DA em outras bases de dados. Porém, embora escassos, foram encontrados estudos que os relacionam ao Alzheimer, utilizando modelos animais e humanos, que serão apresentados a seguir.

O gene *APP* está associado diretamente com a DA, o que já é conhecido, devido sua participação na produção da proteína b-amiloide (Friedman *et al.*, 2004). Mas observando a via KEGG de identificação, também encontramos o *APP* envolvido na regulação de sinapses serotoninérgicas. O estudo de Pimenova *et al.* (2014) reforça essa interação, mostrando a regulação do processamento da *APP* por meio da sinalização serotoninérgica, em modelos animais. O gene *APP*, tem seus produtos amplamente expressos nas estruturas cerebrais, como mostra a figura 16. Podemos observar na figura 17 que sua expressão é elevada em todo o cérebro, mas se destacam em regiões como córtex frontal (mediana = 577,1), hipocampo (mediana = 323,3), hipotálamo (mediana = 370,7) e núcleos accumbens (mediana = 363,2), regiões estas conhecidas por serem

afetadas na AD. Regiões como hemisfério cerebelar (mediana = 449,3) e medula espinal (mediana = 518,1) também possuem elevada expressão dos produtos de *APP*.

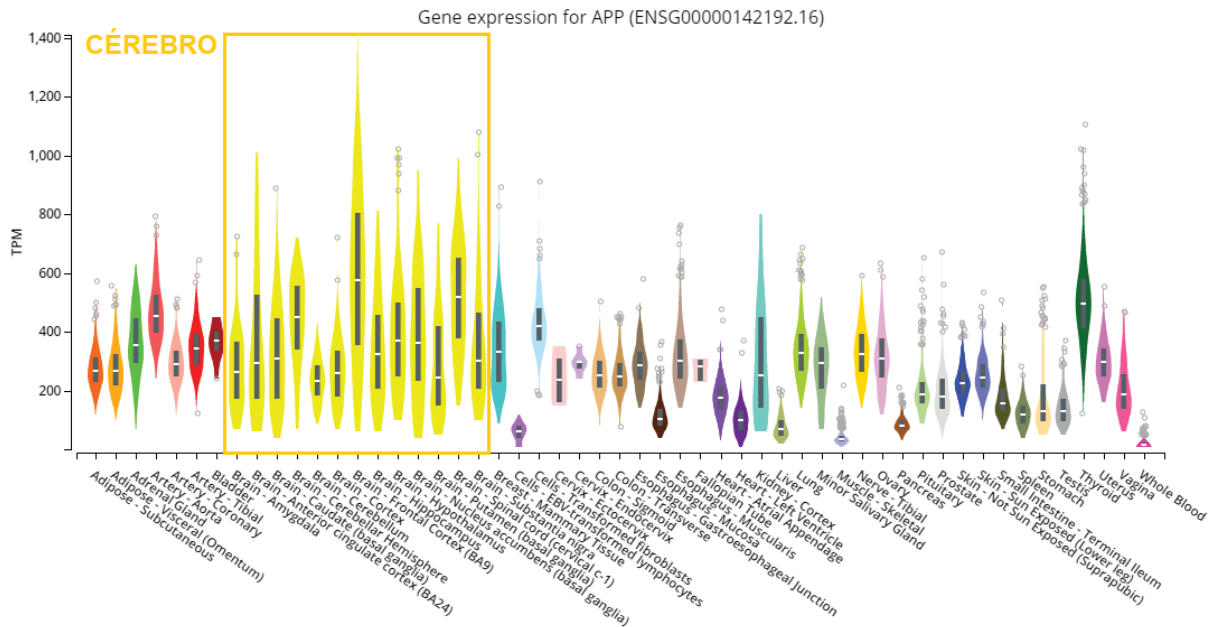


Figura 16: Quantidade do gene *APP* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. Fonte: <https://gtexportal.org/home/gene/APP>

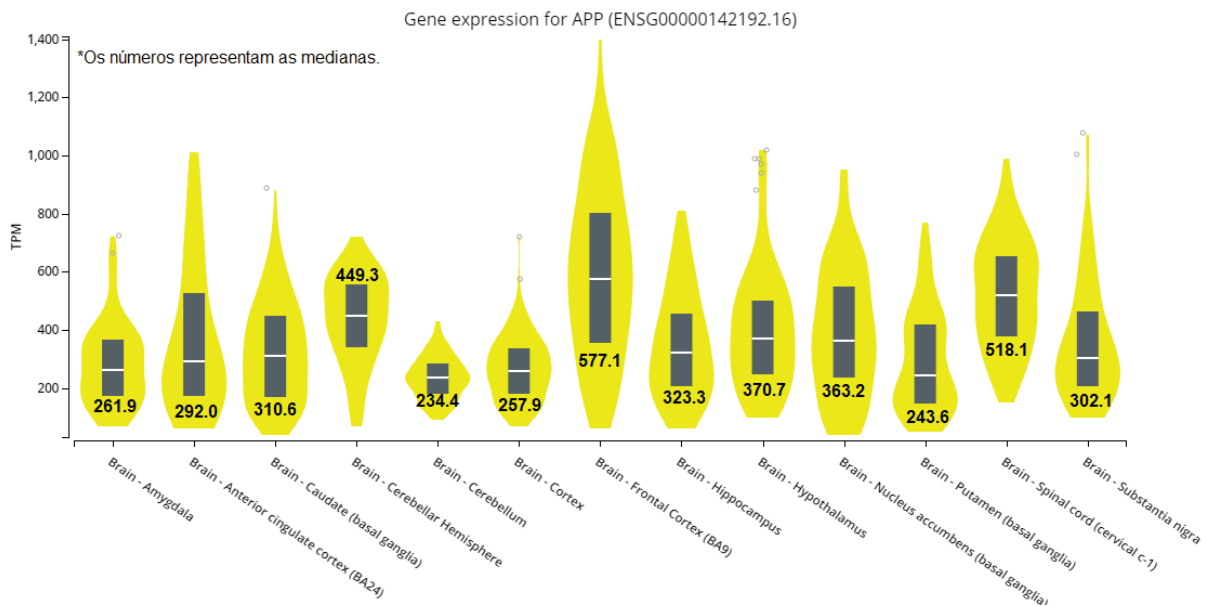


Figura 17: Quantidade do gene *APP* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. Fonte: <https://gtexportal.org/home/gene/APP>

O gene *ATP2A2* está relacionado à hidrólise de ATP e ao sequestro do íon cálcio no retículo endoplasmático e sarcoplasmático de células musculares. No estudo de Kang & Friedmann (2015) este se encontra desregulado em células ESD3 (Células estaminais embrionárias D3 murinas), deficientes em HPRT, em diferentes estágios de diferenciação neuronal, de murinos. Os autores compararam esse desequilíbrio com o encontrado no mesmo gene na doença de Alzheimer, analisando os resultados por meio das técnicas de RNAseq, microarray e anotação gênica, e citando também a via KEGG de identificação. Isso reforça sua relação com essa demência. A expressão dos produtos do gene *ATP2A2* se destacam nos tecidos cardíacos como o átrio (mediana = 536,5), o ventrículo esquerdo (mediana = 328,6) e na musculatura esquelética (mediana = 763,9), figura 18. Porém no cérebro sua expressão é maior no córtex frontal (mediana = 117,4) e no hemisfério cerebelar (mediana = 114,5), como mostra a figura 19.

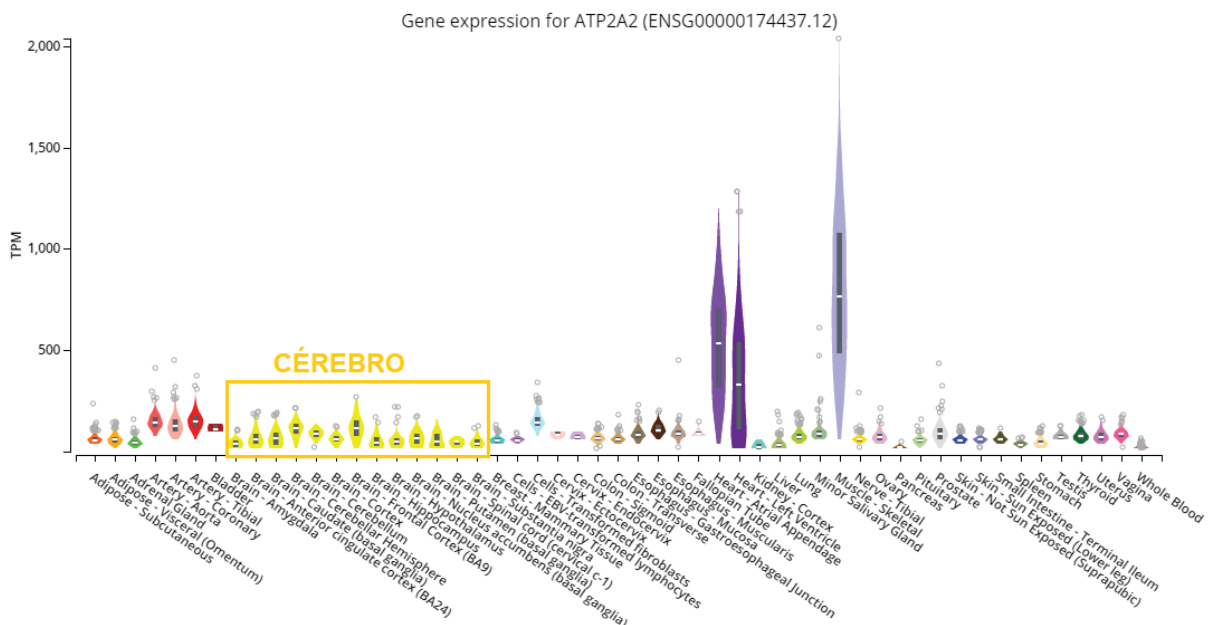


Figura 18: Quantidade do gene *ATP2A2* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ATP2A2>

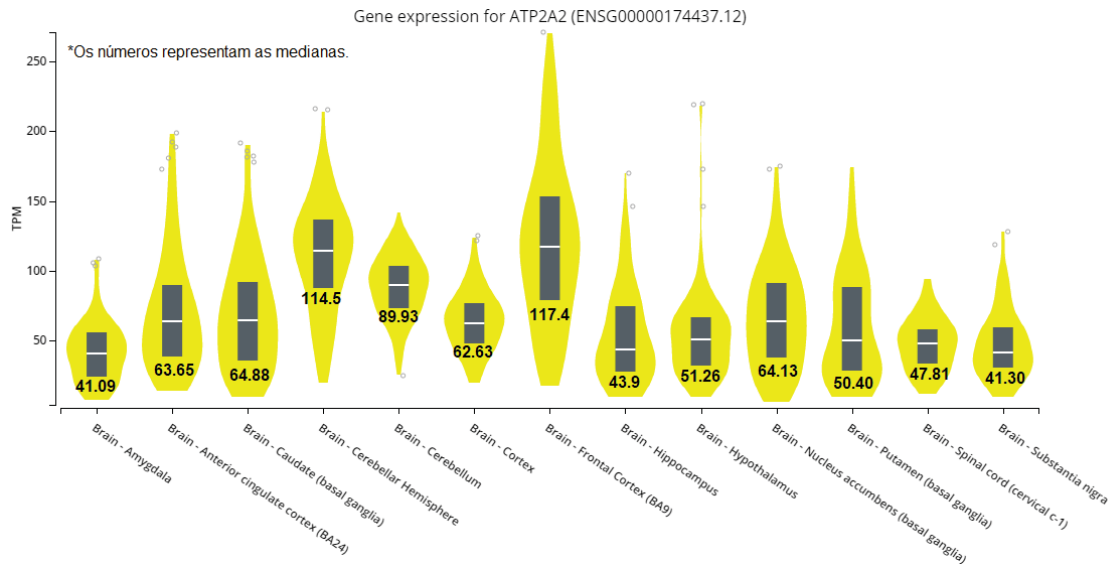


Figura 19: Quantidade do gene *ATP2A2* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ATP2A2>

O gene mitocondrial *ATP5A1* está envolvido na codificação de uma das subunidades da ATP sintase mitocondrial. Zali *et al.*, (2015), utilizando técnicas de proteômica, encontraram em seu estudo, esse gene superexpresso em células de hipocampo de ratos modelos de Alzheimer, em relação ao grupo controle. O gene *ATP5G2* possui a expressão de seus produtos mais elevadas nos tecidos cardíacos como o, átrio (mediana = 614,1) e o ventrículo esquerdo (mediana = 808,0) e na musculatura esquelética (mediana = 620,1), figura 20. No cérebro sua expressão se destaca no hemisfério cerebelar (mediana = 554,1), cerebelo (mediana = 470,8), córtex (mediana = 326,0) e córtex frontal (mediana = 391,3), figura 21.

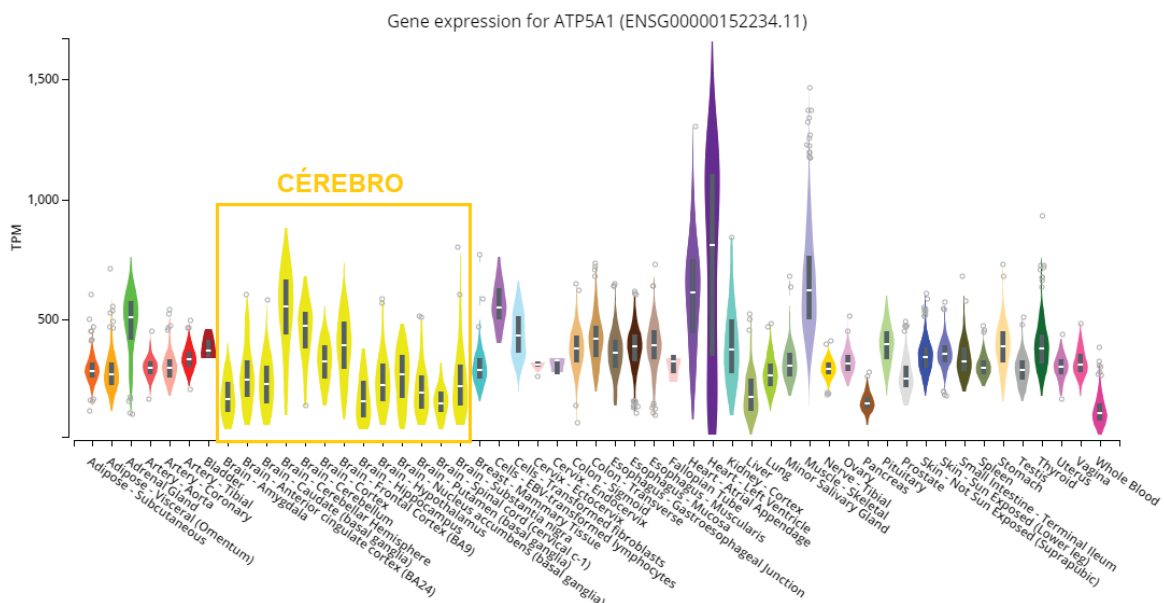


Figura 20: Quantidade do gene *ATP5A1* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ATP5A1>

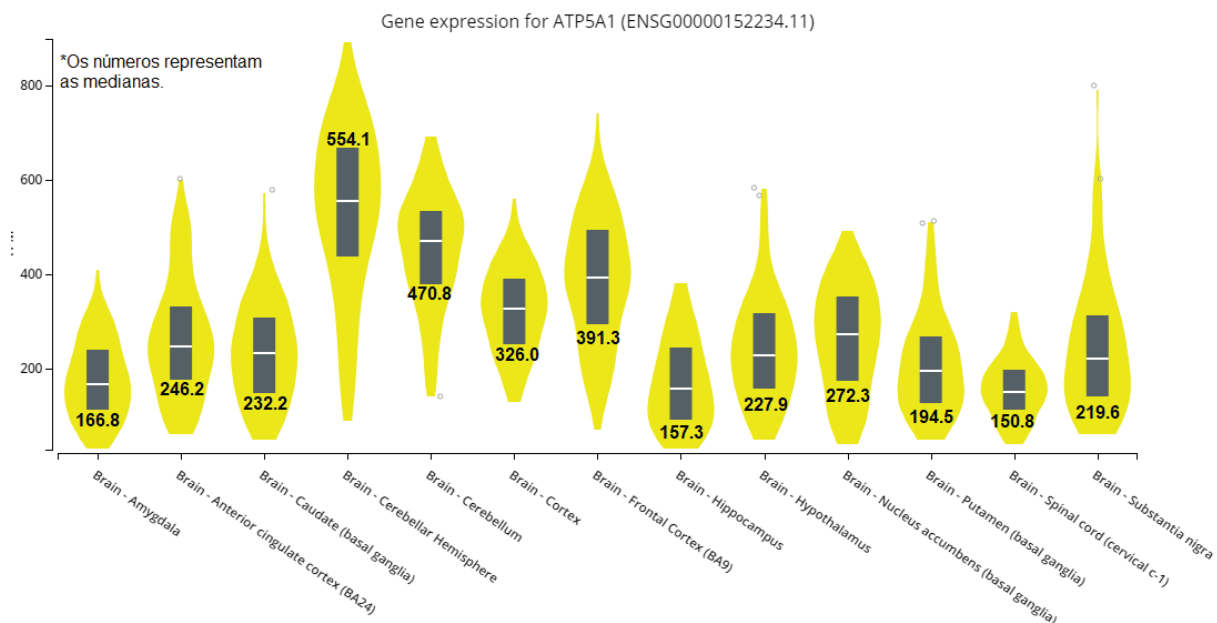


Figura 21: Quantidade do gene *ATP5A1* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ATP5A1>

Para o gene *ATP5G2*, que também participa da síntese de uma das subunidades da ATP sintase, o estudo de Meda *et al.*, (2012) encontrou uma forte associação entre o desequilíbrio nesse gene com a DA de início tardio. Os autores analisaram diferentes regiões do cérebro de idosos eurodescendentes, cognitivamente saudáveis e de idosos com comprometimento cognitivo leve, ressonância magnética estrutural e de associação genótipo-fenótipo usando Para-ICA, ligando-os a SNPs. Foram estudados polimorfismos de vários genes, alguns conhecidos como o *APOE3* e *APOE4*, e de novos genes identificados com potencial importância, para o desenvolvimento da DA, como *ZNF673*, *VPS13*, *SLC9A7*, *ATP5G2* e *SHROOM2*. O *ATP5G2* está envolvido em mecanismos metabólicos neurais. Na doença de Alzheimer de início tardio, seus produtos podem sofrer estresse oxidativo, no córtex entorrinal (Terni *et al.*, 2010). A expressão dos produtos do gene *ATP5G2* é aparentemente constante nos diferentes tecidos corporais, porém se destaca nos linfócitos EBV-transformados (mediana = 321,3), figura 22. No cérebro sua expressão é maior no hemisfério cerebelar (mediana = 156,1), cerebelo (mediana = 145,0), hipotálamo (mediana = 104,9) e na medula espinhal (mediana = 136,1), figura 23.

and Absolute Quantitation). O gene COX7A2 possui a expressão de seus produtos constantes nos diversos tecidos, porém se destaca nos testículos (mediana = 519,7), figura 24. No cérebro sua distribuição também é constante, mas se encontra mais elevada no hemisfério cerebelar (mediana = 154,5), córtex frontal (mediana = 164,5), núcleo accumbens (mediana = 150,3) e substância negra (mediana = 157,3), figura 25.

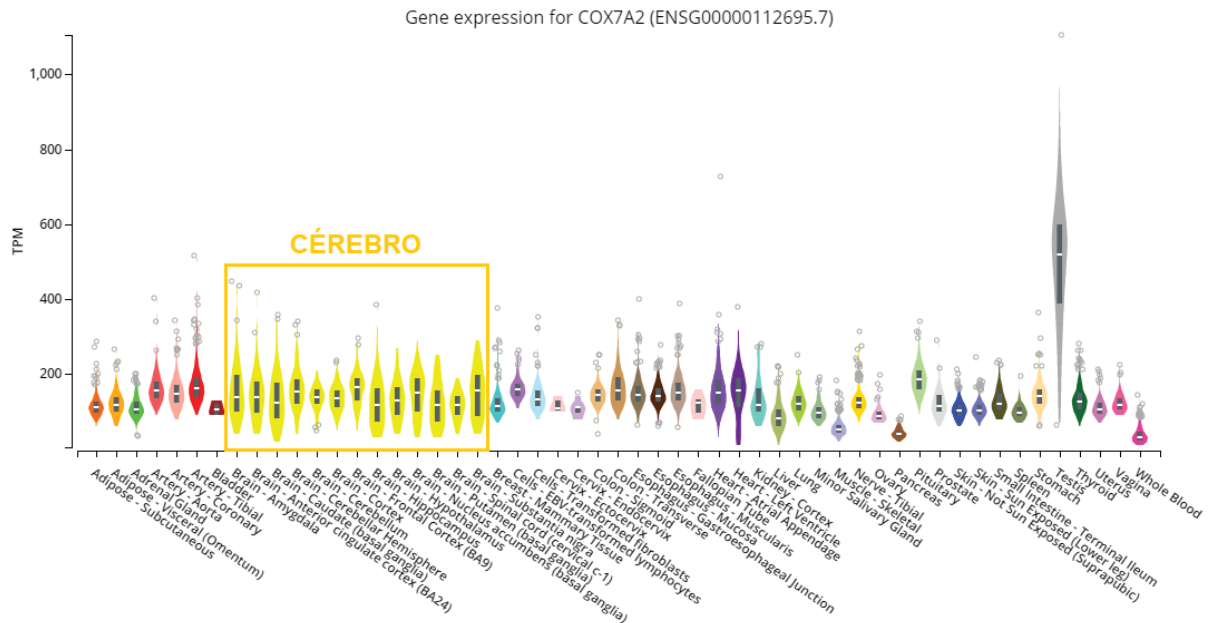


Figura 24: Quantidade do gene COX7A2 tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://qtexportal.org/home/gene/COX7A2>

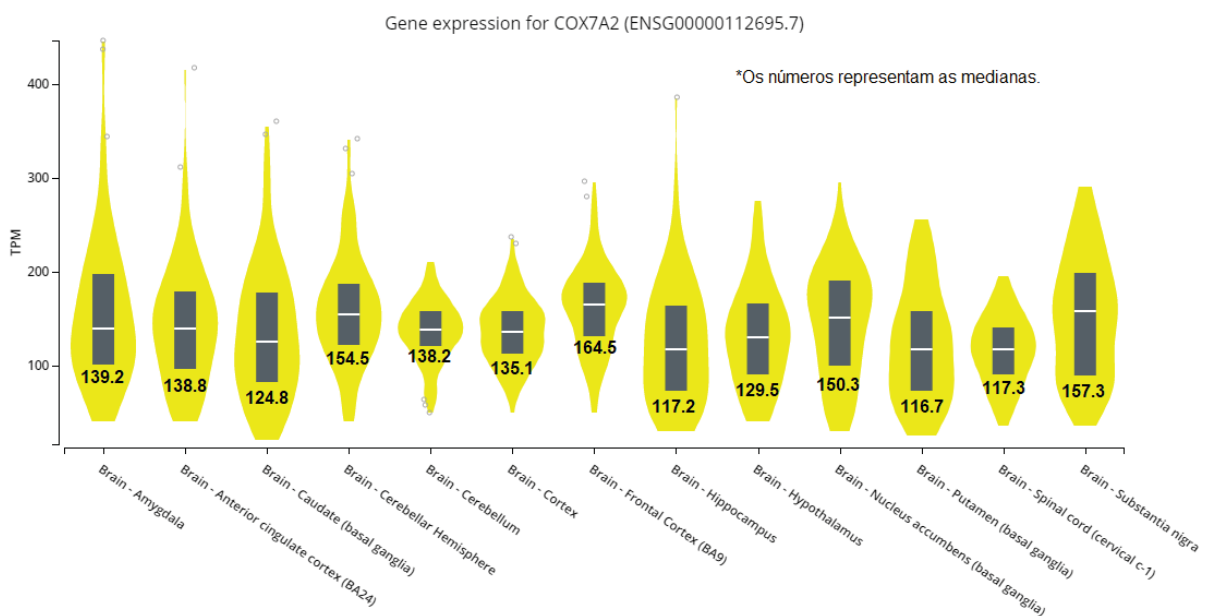


Figura 25: Quantidade do gene COX7A2 tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://qtexportal.org/home/gene/COX7A2>

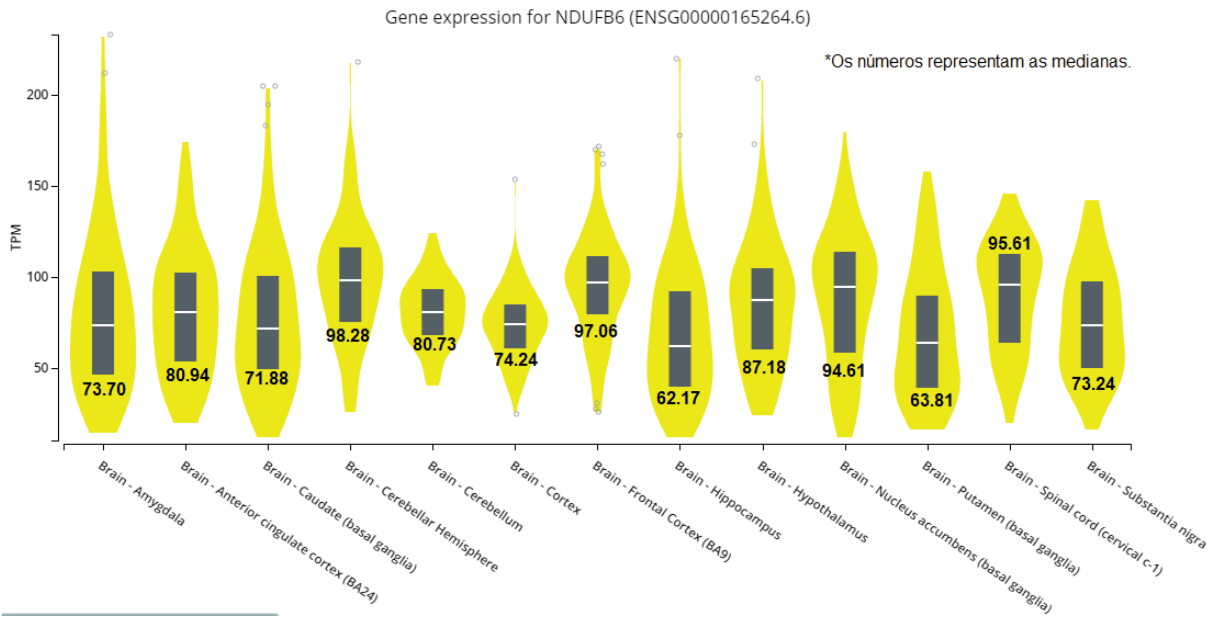


Figura 27: Quantidade do gene *NDUFB6* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/NDUFB6>

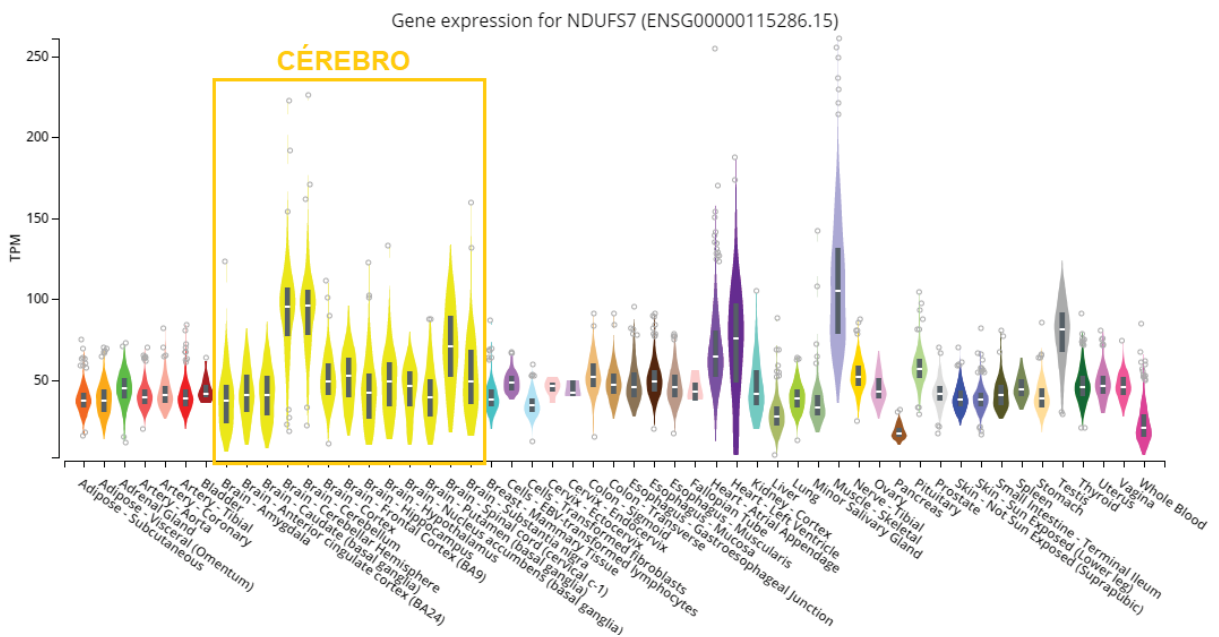


Figura 28: Quantidade do gene *NDUFS7* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/NDUFS7>

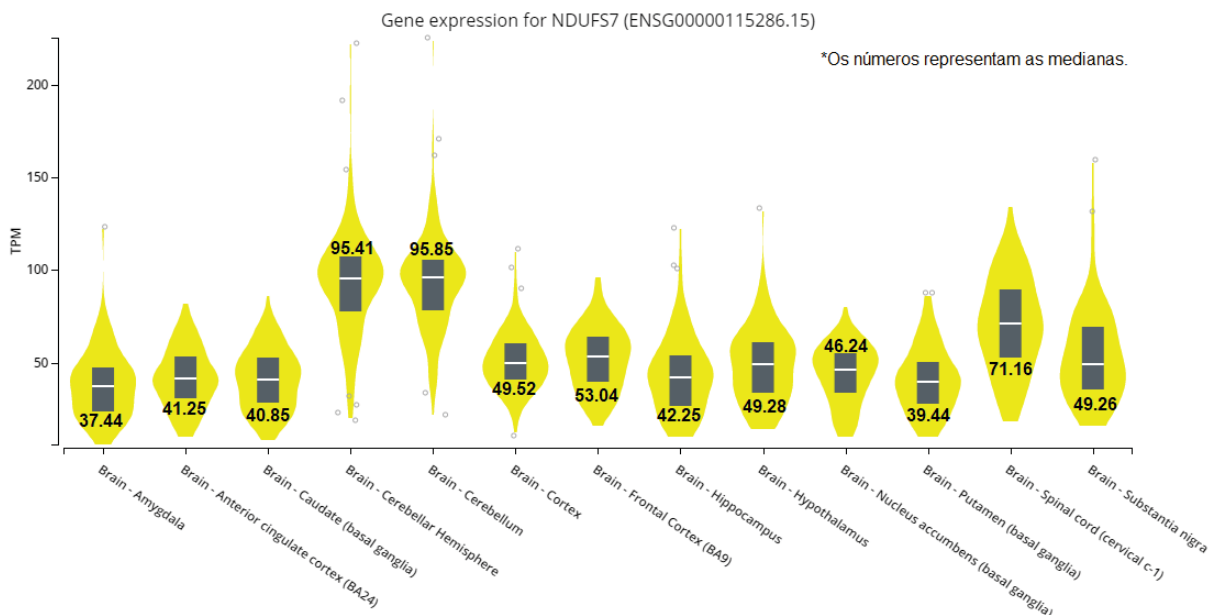


Figura 29: Quantidade do gene *NDUFS7* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/NDUFS7>

Análises *in silico* também foram realizadas em outras bases de dados como; microrna.org, Target Scan Human, miRDB, miRecords, miRTarBase e TargetScan. Foi gerada uma lista com seis genes alvos do hsa-miR125a-5p, com os quais foram encontrados estudos relacionando-os com a DA (Tabela 12). Não houve sobreposição dos genes encontrados nessas bases de dados com os genes encontrados no mirParth v.3, porém os *ERBB2* (*rb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), *ERBB3* (*rb-b2 receptor tyrosine kinase 3*), *ARID3B* (*AT-rich interaction domain 3B*), *TP53* (*Tumor Protein p53*), *VEGFA* (*Vascular endothelial growth factor A*) e *BAK1* (*BCL2 antagonist/killer 1*), foram selecionados pois foram encontrados em mais de uma base de dados simultaneamente, relacionados ao hsa-miR125a-5p.

Tabela 12- Genes regulados pelo hsa-miR-125a-5p, associado à doença de Alzheimer, em bases de dados como miRecords; miRTarBase; Target Scan Human e miRDB.

Gene Regulado	Valor de P	Posição Cromossômica	Local semente de ligação 3'UTR do miR/ Comp rimento 3'UTR (fonte: miRDB)	Base de dados	Metodo de Validação (miRTarBase)	Autores
<i>ERBB2</i>		17q12		miRecords; miRTarBase Target Scan Human	Reporter assay; Western blot; qPCR.	Siddiqui <i>et al.</i> (2012); Wang <i>et al.</i> (2017).
<i>ERBB3</i>	0.997906	12q13.2	19 /1460	miRecords; miRTarBase; Target Scan Human miRDB	Reporter assay; Western blot; qPCR; Microarray.	Chaudhury <i>et al.</i> (2003); Siddiqui <i>et al.</i> (2012).
<i>ARID3B</i>	0.474009	15q24.1	218, 295, 575, 1172, 1333, 1907 /2369	miRecords; miRTarBase; TargetScan Target Scan Human miRDB	Western blot; qPCR.	Samyudhas <i>et al.</i> (2014).
<i>TP53</i>		17p13.1		miRecords; miRTarBase	Reporter assay; Western blot; qPCR.	Nakanishi <i>et al.</i> (2015).
<i>VEGFA</i>	0.293524	6p21.1		miRTarBase; TargetScan	Reporter assay; Western blot; qPCR.	Hohman <i>et al.</i> (2015).
<i>BAK1</i>	0.632343	6p21.31	630, 889, 1083 /1267	miRTarBase; TargetScan Target Scan Human miRDB	Reporter assay; Western blot; qPCR.	Palermo <i>et al.</i> (2016).

Fonte: Autora (2019)

As figuras de 30 a 41 foram extraídas do GETx Portal e estão disponíveis no site (<https://qtexportal.org/home/>). Elas ilustram quantitativamente o padrão de expressão tecido-específico, representados pela mediana, dos mRNAs dos genes alvos do hsa-miR125a-5p, expostos nas tabelas 12. As barras amarelas, incluídas no retângulo amarelo, das primeiras imagens dos respectivos genes tem por objetivo mostrar sua expressão no tecido cerebral, relacionando-a com sua expressão em outras estruturas corporais, como forma de comparação. Já a segunda imagem mostra com mais detalhes as medianas referentes a expressão das diferentes estruturas cerebrais.

Os genes *ERBB2* e *ERBB3* codificam uma proteína de ligação a membrana relacionada a um fator de crescimento epidérmico. Esses genes estão relacionados ao aparecimento do câncer de mama, sendo classificados como oncogenes. No estudo de Wang *et al.*, (2017) o gene *ERBB2* foi associado à DA, ao regular o fluxo autofágico para modular a proteostase do fragmento C terminal de APP. O estudo concluiu que níveis aumentados do produto desse gene no hipocampo, poderia ser usado como marcador para a DA esporádica, sugerindo esse gene como um alvo terapêutico para essa demência. Já Chaudhury *et al.* (2003), por meio de técnicas de imuno-histoquímica com o immunoblotting, encontraram os genes *ERBB2*, *ERBB3* e *ERBB4* expressos na formação hipocampal de

humanos idosos, associados a corpos celulares e dendritos neuronais, sendo que o *ERBB4* foi relacionado a formação de placas neuríticas no hipocampo desses pacientes. A análise na base de dados miRDB evidencia que o gene *ERBB3* possui uma sequência 3'UTR de 1460 bases de comprimento na qual o miR-125a-5p se liga na região 19, cuja sequência de ligação é ctcaggga (Tabela 12). Os produtos do gene *ERBB2* encontram-se mais elevados em estruturas como; mucosa do esôfago (mediana = 112,0), nervo tibial (mediana = 127,8), na pele não exposta ao sol (mediana =110,7) e na pele exposta ao sol (mediana =116,6), figura 30. Isso evidencia sua variedade de funções. No cérebro ela se mostra evidentemente menos expresso, em relação as outras estruturas corporais, porém se destacam o núcleo caudado (mediana = 8,945) e núcleo accumbens (mediana = 9,570), ambos do glândio basal, figura 31. O gene *ERBB3*, seus produtos possuem uma expressão mais elevada no nervo tibial (mediana = 114,1), figura 32. No cérebro sua expressão se destaca, com grande diferença das demais estruturas, na medula espinhal (mediana = 48,84), seguida pela substância negra (mediana = 19,32), figura 33.

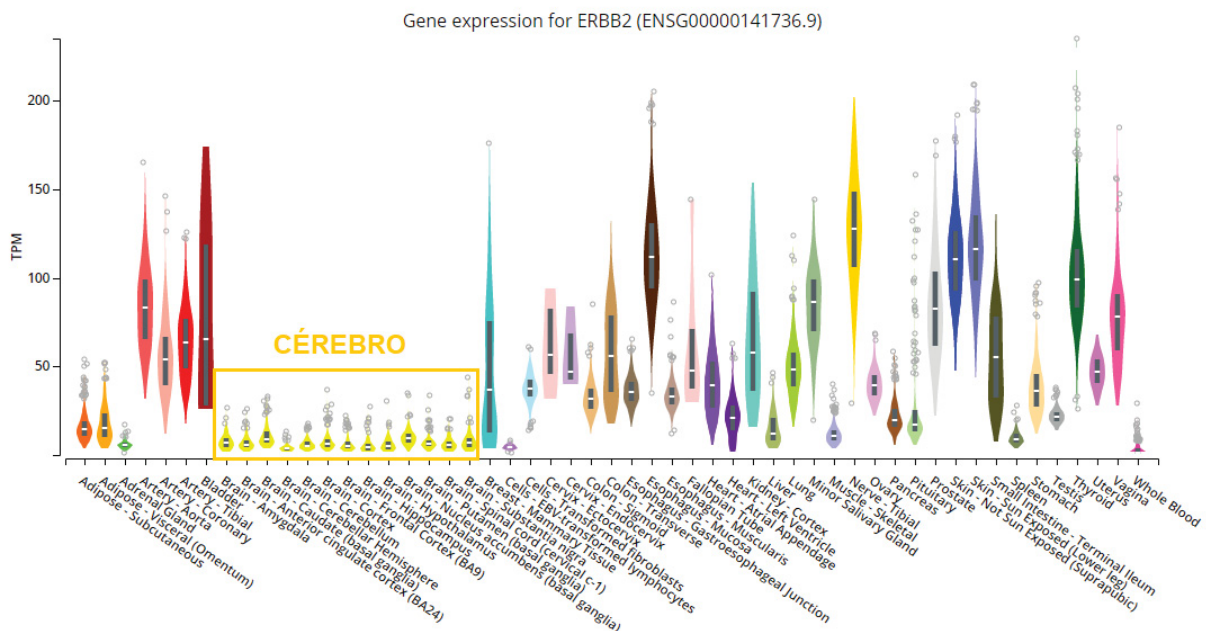


Figura 30: Quantidade do gene *ERBB2* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ERBB2>

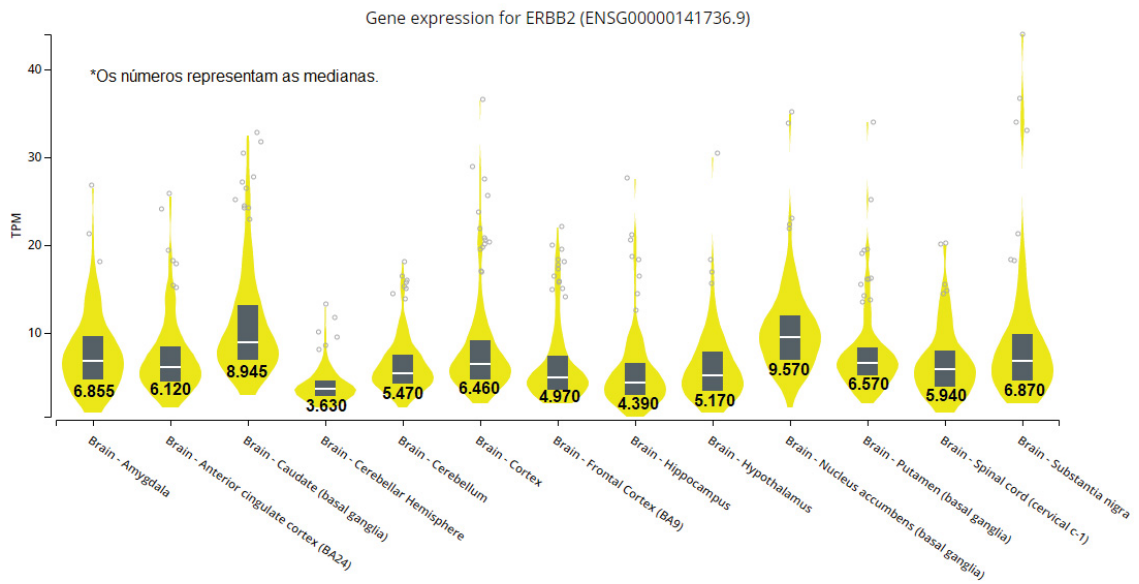


Figura 31: Quantidade do gene *ERBB2* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ERBB2>

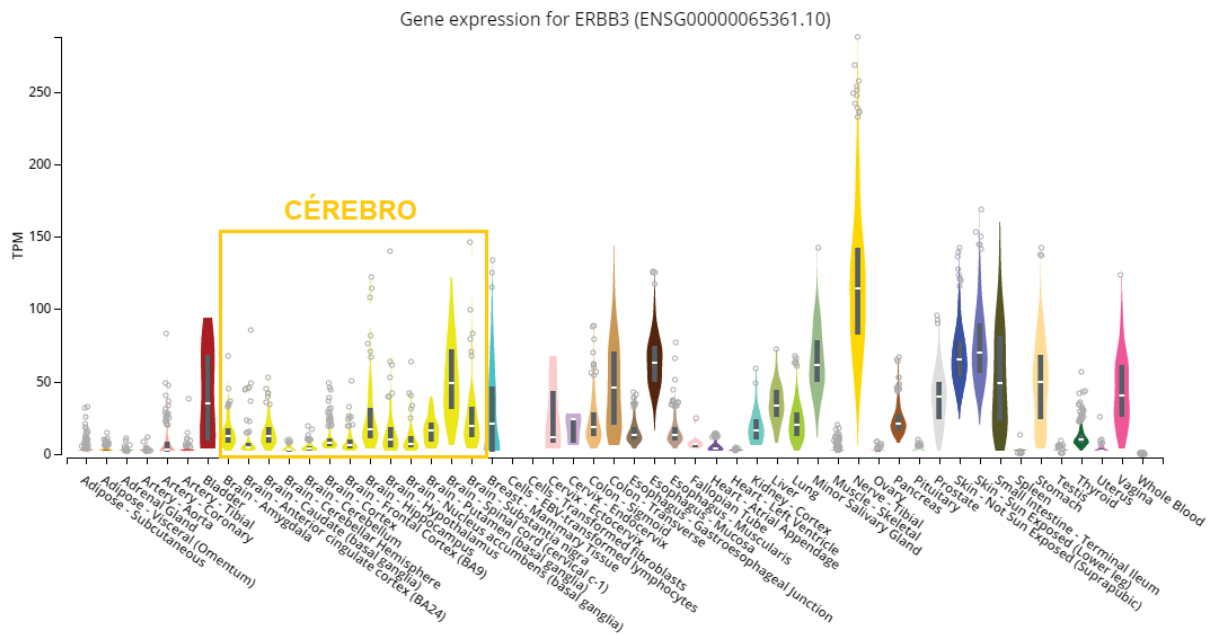


Figura 32: Quantidade do gene *ERBB3* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ERBB3>

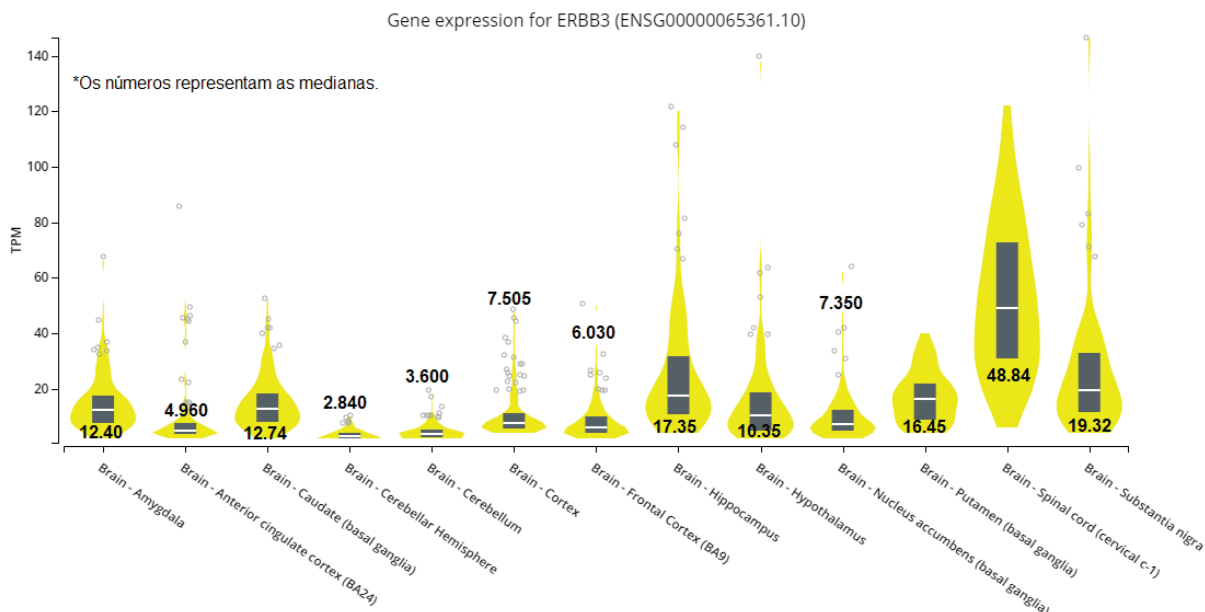


Figura 33: Quantidade do gene *ERBB3* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/ERBB3>

O gene *ARID3B* codifica uma proteína de ligação ao DNA. Ela está envolvida no desenvolvimento e regula funções celulares por meio de ativação transcricional, modificação da estrutura da cromatina e metilação de histonas (Wilsker *et al.* 2002). Samyesudhas *et al.* (2014) estudaram em amostras de tecidos de humanos adultos e de camundongos, a relação do *ARID3B* e determinados carcinomas, como os neurogliomas, por meio de técnicas de microarranjo e imuno-histoquímica. Eles encontraram uma relação direta com esse gene e sua importância no desenvolvimento neural, estando altamente expresso no cérebro fetal. Os autores encontraram, ainda, evidências de que durante uma lesão neural, a produção de *ARID3B* pode ser induzida. Muller *et al.* (2007) encontraram que o produto do gene *ARID3B* tem sua produção induzida pelo domínio intracelular da *APP* em células neurais humanas, podendo estar relacionada com a progressão da demência. A análise na base de dados miRDB mostra que o gene *ARID3B* possui uma sequência 3'UTR de 2369 bases de comprimento, na qual o miR-125a-5p pode se ligar em seis regiões, sendo elas nos nucleotídeos de número 218, 295, 575, 1172, 1333, 1907 cuja sequência de ligação é tcaggga (Tabela 12). Os produtos do gene *ARID3B* possuem expressão baixa nos tecidos como um todo, se destacando nos linfócitos EBV-transformados (mediana = 48,20) e nos testículos (mediana = 49,91), figura 34. No cérebro sua expressão é baixa, porém é mais elevada no hemisfério cerebelar (mediana = 9,225) e no cerebelo (mediana = 10,22), figura 35.

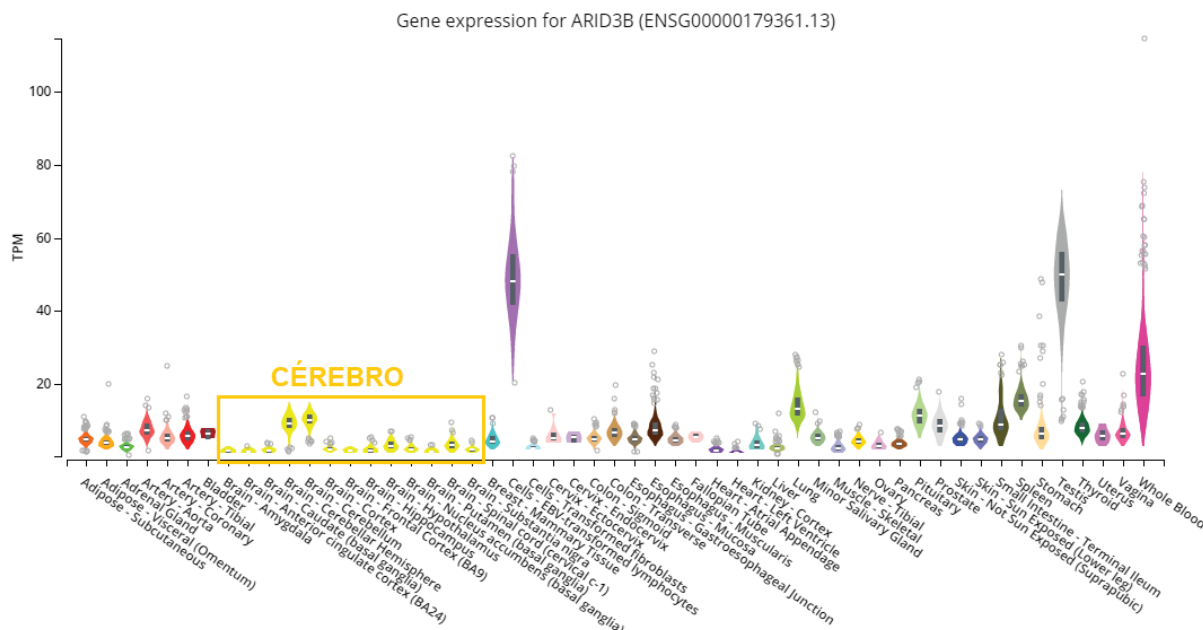


Figura 34: Quantidade do gene *ARID3B* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarela. Fonte: <https://gtexportal.org/home/gene/ARID3B>

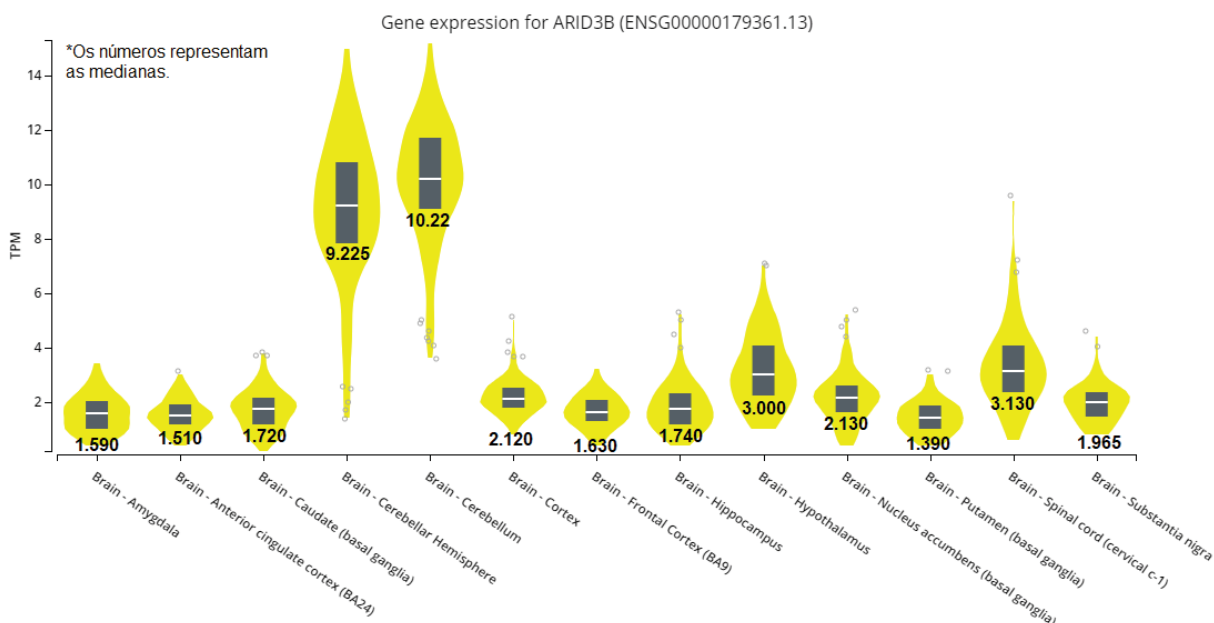


Figura 35: Quantidade do gene *ARID3B* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. Fonte: <https://gtexportal.org/home/gene/ARID3B>

O gene *TP53*, como é chamado em humanos, codifica uma proteína que participa da regulação do ciclo celular, atuando como supressora tumoral. Esse gene possui um papel fundamental na morte celular, reparo do DNA e proliferação celular. Nakanishi *et al.*, (2015), em sua revisão, ressaltaram um papel fundamental para o *TP53*, na regulação de neurônios durante a DA, o que evidencia a complexidade dessa doença multifatorial. No

gene *TP53* os produtos são mais expressos nos linfócitos EBV-transformados (mediana = 95,13), figura 36. No cérebro sua expressão é baixa, porém se destaca no núcleo caudado (mediana = 5,390), medula espinhal (mediana = 5,920) e substância negra (mediana = 5,120), figura 37.

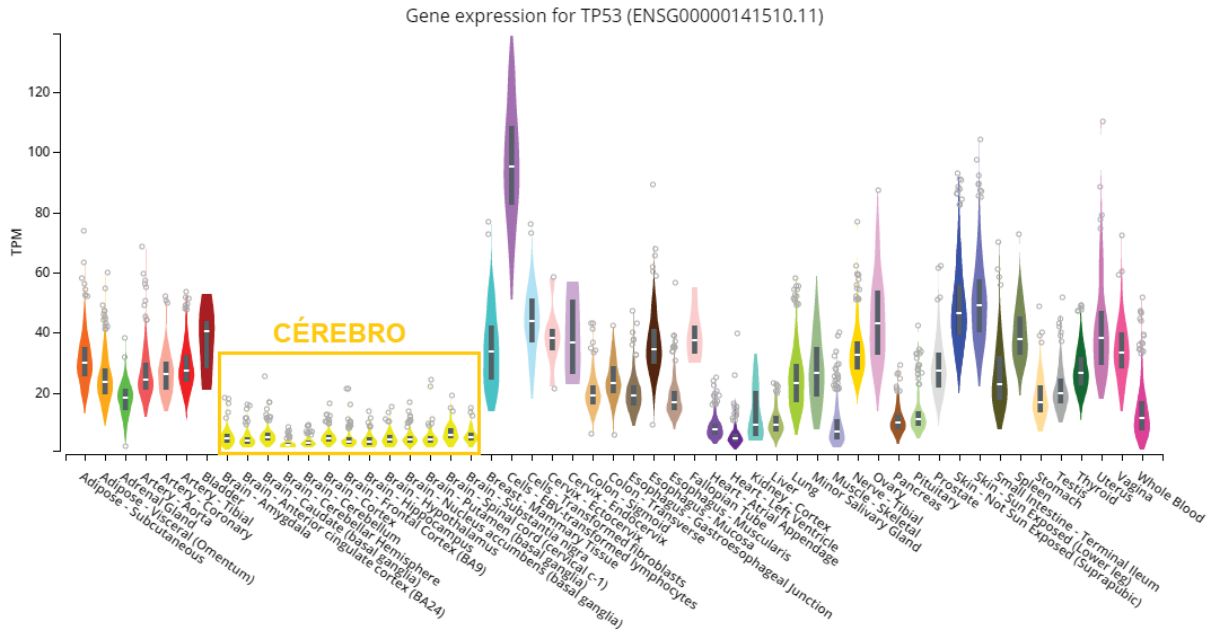


Figura 36: Quantidade do gene *TP53* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/TP53>

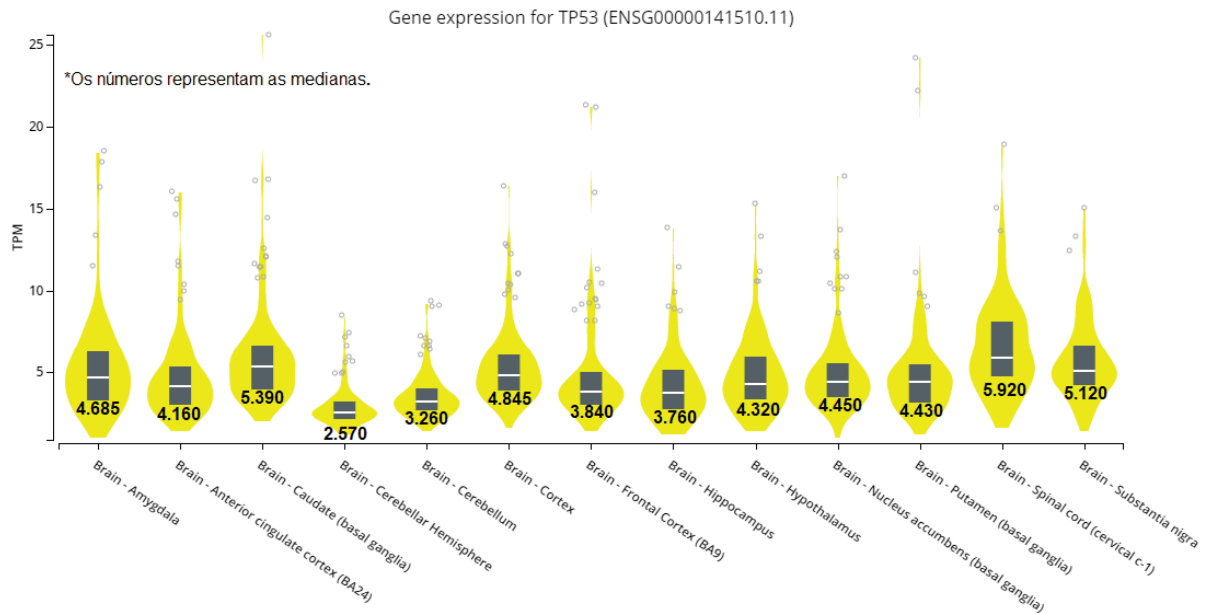


Figura 37: Quantidade do gene *TP53* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/TP53>

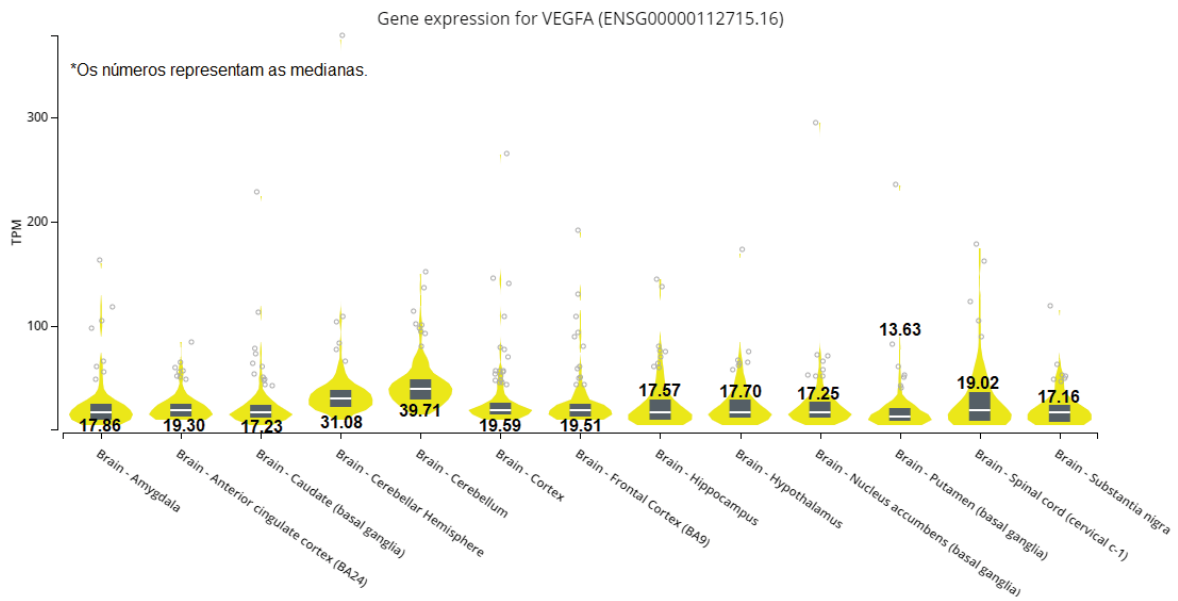


Figura 39: Quantidade do gene *VEGFA* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/VEGFA>

O gene *BAK1* codifica uma proteína da família BCL2. Localizadas nas mitocôndrias, a função destas proteínas é induzir a apoptose. Micheli *et al.*, (2016) trazem, em seu estudo, uma relação entre o miR-125b e a regulação dos genes *BAK1* e o *P53*, em modelos animais para a doença de Alzheimer. Os autores encontraram que o tratamento com 17 β -estradiol neutraliza a toxicidade do peptídeo A β e induz a produção do miR-125b, que por sua vez, reduz a quantidade das proteínas Bak1 e p53, ajudando a regular a apoptose em processos neurodegenerativos. Esse estudo se destaca, pois traz a relação direta entre um miRNA da família 125 e a regulação de dois genes encontrados nas bases de dados relacionados a DA. A análise na base de dados miRDB mostra que o gene *BAK1* possui uma sequência 3'UTR de 1267 bases de comprimento, na qual o miR-125a-5p pode se ligar em três regiões, sendo elas: 630, 889 e 1083, cuja sequência de ligação é ctcaggga (Tabela 12). A expressão dos produtos do gene *BAK1* se destacam nos linfócitos EBV-transformados (mediana = 55,39) e no baço (mediana = 42,33), figura 40. No cérebro sua expressão mais elevada no hemisfério cerebelar (mediana = 12,18) e no cerebelo (mediana = 13,57), figura 41.

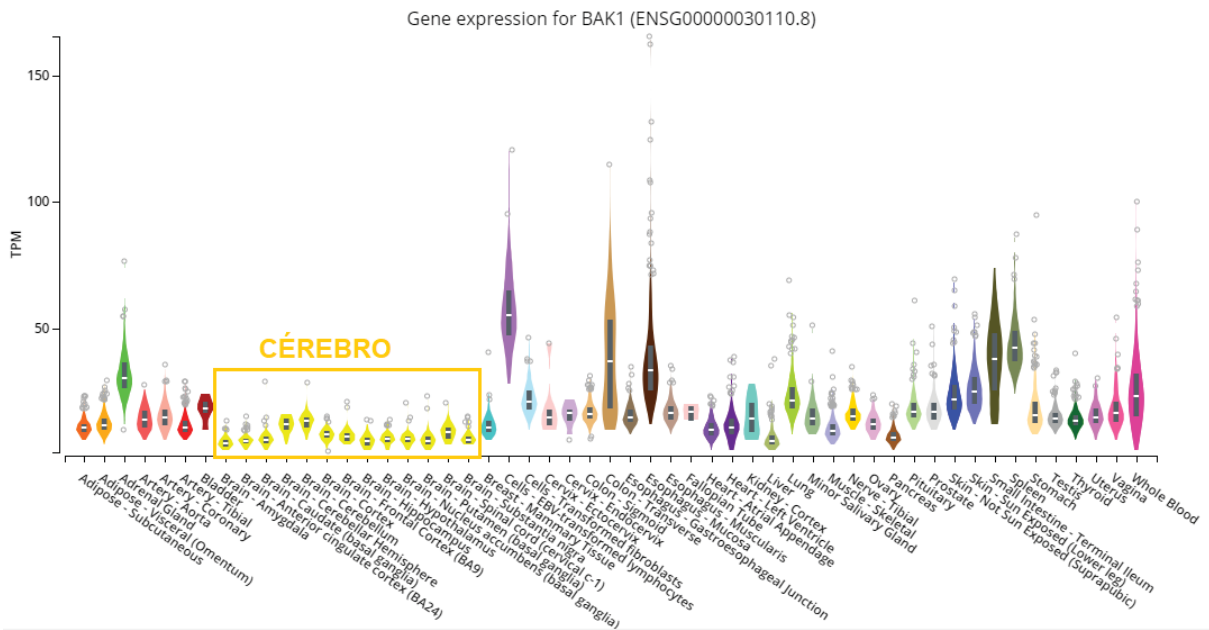


Figura 40: Quantidade do gene *BAK1* tecido específico, com destaque para o cérebro no retângulo amarelo. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/BAK1>

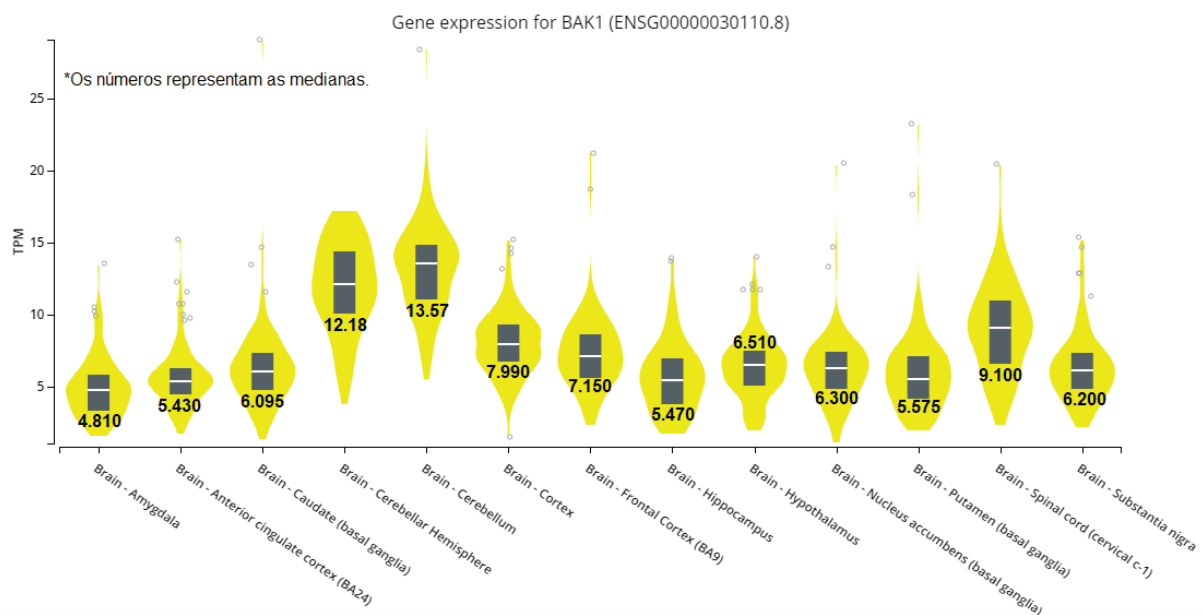


Figura 41: Quantidade do gene *BAK1* tecido específico, nas diferentes estruturas do cérebro. **Fonte:** <https://gtexportal.org/home/gene/BAK1>

7 CONCLUSÕES

- Os resultados encontrados pela técnica de RT-qPCR para o hsa-miR-30d-5p e para o hsa-342-3p não foram significativos nesse estudo, ao relacionar esses miRNAs com a DA, DCL e DPD, entre si, e com o grupo controle cognitivamente saudável.
- Os resultados encontrados pela técnica de RT-qPCR para o hsa-miR-125a-5p, mostram que este é superexpresso na doença de Alzheimer em relação ao grupo controle $p = 9,217e-05$ e $FC = 2,7$. Isso sugere que o miR-125a-5p pode ser potencial biomarcador para auxiliar no diagnóstico dessa demência.
- Os resultados encontrados neste estudo, para o miR-125a-5p, corroboraram os resultados encontrados por Batistela (2016). Em ambos, esse miRNA foi identificado como superexpresso em pacientes com DA, em relação ao grupo controle, podendo servir para diferenciar esses dois grupos.
- O valor de AUC encontrado para o miR-125a-5p ($AUC = 0,816$) sugere que este possui uma alta sensibilidade e especificidade em discriminar indivíduos com DA de indivíduos saudáveis. Sua grande acurácia sugere que este miRNA é um biomarcador confiável para auxiliar em um diagnóstico preciso.
- As análises *in silico* sugerem que o miR-125a-5p interage com diversos genes que regulam processos metabólicos gerais e neuropatológicos, sendo alguns deles: *APP*, *ATP2A2*, *ATP5A1*, *ATP5G2*, *COX7A2*, *NDUFB6*, *NDUFS7*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ARID3B*, *TP53*, *VEGFA* e *BAK1*. Já existem diversos estudos relacionando esses genes à doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D., PERRY, R., LARSEN, J. P., MCKEITH, I. G., O'BRIEN, J. T. Neuroleptic sensitivity in Parkinson's disease and parkinsonian dementias. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.66(5), p. 633-637, 2005.
- 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(5), p.269–83, 2011.
- ADAV, S. S.; PARK, J. E.; SZE, S. K. Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, v.12, n.8, p.1-12. 2019.
- ALAGIAKRISHNAN, K., GILL, S. S., FAGARASANU, A. Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease. **Postgraduate Medical Journal**, v.88(1043), p.522–529, 2012.
- ALBERT, M. S., DEKOSKY, S. T., DICKSON, D. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v.7(3), p.270-279, 2011.
- ALMEIDA, M. I., REIS, R. M., CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research**, v.717(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(10), p.549-558, 2008.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia** 2016.
- ALZHEIMER'S SOCIETY. Disponível em: <<https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents.php?categoryID=200120>> Acesso em: 02 set. 2017.
- APA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). 5th.ed. Washington: **American Psychiatric Association**, 2014.
- APS/AB do Brasil. Resumo Clínico – **Demência. Regula SUS**, 2016.
- ARAÚJO, A. C., NETO, F. L. A nova classificação americana para os transtornos mentais - o DSM-5. **Jornal de Psicanálise**, v.46, p.99-116. 2013.
- AUNING, E., RONGVE, A., FLADBY, T., BOOIJ, J., HORTOBAGYI, T., Early and presenting symptoms of dementia with lewy bodies. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.32(3), p.202-208, 2011.
- AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome Medicine**, v. 1(3), p.34, 2009.
- AZEVEDO, M. M., GALHARDO, M. C., AMARAL, A. K. F. J., VIEIRA, A. C. C. Caracterização dos distúrbios cognitivos na doença de parkinson. **Revista Cefac**, v.11, p.251-7, 2009.
- BABILONI, C., DEL PERCIO, C., LIZIO, R., NOCE, G., CORDONE, S., LOPEZ, S., SORICELLI, A., FERRI, R., PASCARELLI, M. T., NOBILI, F., ARNALDI, D., AARSLAND, D., ORZI, F., BUTTINELLI, C., GIUBILEI, F., ONOFRJ, M., STOCCHI, F., STIRPE, P., FUHR,

P., GSCHWANDTNER, U., RANSMAYR, G., CARAVIAS, G., GARN, H., SORPRESI, F., PIEVANI, M., FRISONI, G. B., D'ANTONIO, F., DE LENA, C., GÜNTEKIN, B., HANOĞLU, L., BAŞAR, E., YENER, G., EMEK-SAVAŞ, D. D., TRIGGIANI, A. I., FRANCIOTTI, R., DE PANDIS, M. F., BONANNI, L. Abnormalities of cortical neural synchronization mechanisms in patients with dementia due to Alzheimer's and Lewy body diseases: an EEG study. **Neurobiology of Aging**, v.55, p.143-158, 2017.

BAGYINSZKY, E., YOUNG, Y. C., AN, S. S. A., KIM, S. Y. The genetics of Alzheimer's disease. - **Clinical Interventions in Aging**. V.9, p.535-551, 2014.

BARBER, R., PANIKKAR, A., MCKEITH, I. G. Dementia with Lewy bodies: diagnosis and management. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v.16, p.12-18, 2001.

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

BARRANCO-QUINTANA, J. L., ALLAM, M. F., DEL CASTILLO, A. S., NAVAJAS, R. F. Risk factors for Alzheimer's disease. **Review Neurology**, v.40(10), p.613-8, 2005.

BATISTELA, M. S. **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 (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

BATISTELA, M. S., JOSVIK, N. D., SULZBACH, C. D., 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**, v.127(6), p.547-558, 2017.

BASAVARAJU, M.; DE LENCASTRE, A. Alzheimer's disease: presence and role of microRNAs. **Biomolecular Concepts**, v. 0, n. 0, p. 1-12, 2016.

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

BERTRAM, L., MCQUEEN, M.B., MULLIN, K., BLACKER, D., TANZI, R.E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. **Nature Genetics**, v. 39, p.17-23, 2007.

BETTENS, K., SLEEGERS, K., VAN BROECKHOVEN, C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. **Human Molecular Genetics**, v.15, p.R4-R11, 2010.

BHAT, S., ACHARYA, U. R., DADMEHR, N., ADELI, H. Clinical neurophysiological and automated EEG-based diagnosis of the Alzheimer's disease. **European Neurology**, v.74, p.202-210, 2015.

BRAAK, H., RUB, U., JANSENSTEUR, E. N. H., TREDICI, K., DELVOS, R. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. **Neurology**, v.64(8), p.1404-1410, 2005.

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

BURLÁ, C., CAMARANO, A. A., KANSO, S., FERNANDES, D., NUNES, R. A perspective overview of dementia in Brazil: a demographic approach. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.18(10), p.2949-2956, 2013.

BUSTIN, S.A .; BENES, V.; GARSON, J .A .; HELLEMANS, J .; HUGGETT, J .; KUB ISTA, M .; MUELLE R, R .; NOLAN, T .; PFAFFL , M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.T. The MIQE Guidelines – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

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

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

CARLSEN, A. L., SCHETTER, A. J., NIELSEN, C. T. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**, v.65, p.1324–34, 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(4), p. 448-454, 2002.

CECATO, J. F., MARTINELLI, J. E. Contribuição do questionário de atividades funcionais de PFEFFER para o diagnóstico da Doença de Alzheimer. **Revista Sul Americana de Psicologia**, v.3(2), p.230-249, 2015.

CHENG, L., DOECKE, J. D., SHARPLES, R. A., VILLEMAGNE, V. L., FOWLER, C. J., REMBACH, A., MARTINS, R. N., ROWE, C. C., MACAULAY, S. L., MASTERS, C. L., HILL, A. for the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. **Molecular Psychiatry**, v.20, p.1188-1196, 2015.

CHAUDHURY, A. R.; GERECKE, K. M.; WYSS, M.; MORGAN, D. G.; GORDON, M. N.; CARROLL, S. L. Neuregulin-1 and ErbB4 Immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. v.62, n.1, p. 42-54. 2003.

COHEN, R. J., SWERDLIK, M. E., STURMAN, E. D. **Testagem e Avaliação Psicológica: Introdução à testes e medidas**. 8th.ed, São Paulo: Artmed, 2014.

COLLOBY, S. J., FENWICK, J. D., WILLIAMS, E. D., PALING, S. M., LOBOTESIS, K. A comparison of (99m) Tc-HMPAOSPE T changes in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease using statistical parametric mapping. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.29(5), p.615-622, 2002.

COOKSON, M. R. Alpha-S ynuclein and neuronal cell death. **Molecular neurodegeneration**, v. 4(1), p. 9, 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(1), p.114–121, 2010.

COWLAND, J. B., HOTHER, C., GRONBAEK, K. MicroRNAs and cancer, **APMIS**, v.115, p.1090-1106, 2007.

DAL FORNO, G., PALERMO, M. T., DONOHUE, J. E., KARAGIOZIS, H., ZONDERMAN, A. B., KAWAS, C. H. Depressive symptoms, sex, and risk for Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v.57(3), p.381-387, 2005.

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(1), p.76, 2008.

DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v.39(1), p.63-80, 2016.

DE PIETRI, T. D., PULVERS, J. N., HAFFNER, C., MURCHISON, E. P., HANNON, G. J., HUTTNER, W. B., miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. **Development**, v.135(23), p.3911-3921, 2008.

DENK, J., OBERHAUSER, F., KORNHUBER, J., WILTFANG, J., FASSBENDER, K., SCHROETER, M. L., VOLK, A. E., DIEHL-SCHIMID, J., PRUDLO, J., DANEK, A., LANDWEHRMEYER, B., LAUER, M., OTTO, M., JAHN, H., Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls. **Plos One**, v.13(5), 2018.

DIANA-mirParth v.3. DIANA TOOLS. Disponível em: < <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>> Acessado em: 07/09/2018.

DOMINGUEZ, D., TOURNOY, J., HARTMANN, D., HUTH, T., CRYNS, K., DEFORCE, S., SERNEELS, L., CAMACHO, I.E., MARJAUX, E., CRAESSAERTS, K., Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.30797-30806, 2005.

DUBOIS, B., FELDMAN, H. H., JACOVA, C., HAMPEL, H., MOLINUEVO, J. L., BLENNOW, K., DEKOSKY, S. T., GAUTHIER, S., SELKOE, D., BATEMAN, R., CAPPA, S., CRUTCH, S., ENGELBORGH, S., FRISONI, G. B., FOX, N. C., GALASKO, D., HABERT, M. O., JICHA, G. A., NORDBERG, A., PASQUIER, F., RABINOVICI, G., ROBERT, P., ROWE, C., SALLOWAY, S., SARAZIN, M., EPELBAUM, S., DE SOUZA, L. C., VELLAS, B., VISSER, P. J., SCHNEIDER, L., STERN, Y., SCHELTENS, P., CUMMINGS, J. L. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **Lancet Neurology**, v.13, p.614-629, 2014.

EACKER, S. M., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L. Understanding microRNAs in neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10(12), p.837-841, 2009.

ETHERIDGE, A., GOMES, C. P. C., PEREIRA, R. W. The complexity, function, and applications of RNA in circulation. **Frontiers Genetics**, v.4, p.1-8, 2013.

FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S. N., SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics**, v.9(2), p.102-114, 2008.

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(2), p. 185-193, 2010.

FROTA, N. A. F., NITRINI, R., DAMASCENO, B. P., FORLENZA, O., DIAS-TOSTA, E., SILVA, A. B., JUNIOR, E. H., MAGALDI, R. M. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v.5(1), p.5-10, 2011.

FUJIWARA, H., HASEGAWA, M., DOHMAE, N., KAWASHIMA, A., MASLIAH, E. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. **Nature Cell Biology**, v.4(2), p.160-164, 2002.

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

GALVIN, J. E. Cognitive change in Parkinson disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**. v.20(4). p. 302-310. 2006.

GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133(3), 2013.

GATZ, M., REYNOLDS, C. A., FINKEL, D., PEDERSEN, N. L., WALTERS, E. Dementia in Swedish Twins: Predicting Incident Cases. **Behavior Genetics**, v.40(6),p.768–775, 2010.

GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2(7), p.492-501, 2001.

GOEDERT, M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Ab, tau, and a-synuclein. **Science**, v.349, 2015.

GOLDMAN, J. G., WILLIAMS-GRAY, C., BARKER, R. A., DUDA, J. E., GALVIN, J. E. The Spectrum of Cognitive Impairment in Lewy Body Diseases. **Movement Disorders Journal**, v.15;29(5), p.608-621, 2014.

GOMPERTS, S. N., LOCASCIO, J. J., MAKARETZ, S. J., SCHULTZ, A., CASO, C., VASDEV, N., SPERLING, R., GROWDON, J., DICKERSON, B. C., JOHNSON, K. Positron Emission Tomographic Imaging in the Lewy Body Diseases. **JAMA Neurology**, v.1;73(11), p.1334-1341, 2016.

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

GUERREIRO, R., ESCOTT -PRICE, V ., DARWENT, L . 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.

HÉBERT, S. S., HORRÉ, K., NICOLAÏ, L., PAPADOPOULOU, A. S., MANDEMAKERS, W., SILAHTAROGLU, A. N., KAUPPINEN, S., DELACOURTE, A., STROOPER, B. D. - Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ β -secretase expression – **PNAS**, v.105(17), p. 6415– 6420, 2008.

HIGUCHI, M., TASHIRO, M., ARAI, H., OKAMURA, N., HARA, S. Glucose hypometabolism and neuropathological correlates in brains of dementia with L ewy bodies. **Experimental Neurology**, v.162(2), p.247-256, 2000.

HOHMAN, T. J.; BELL, S. P.; JEFFERSON, A. L.; ALZHEIMER'S NEUROIMAGING INITIATIVE. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Neurodegeneration and Cognitive Decline: Exploring Interactions with Biomarkers of Alzheimer's Disease. **JAMA Neurology** v.72, n.5, p.520-529. 2015.

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

HONG, Z. *et al.* DJ-1 and α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. **Brain**, v.133, p.713–726, 2010.

HUANG, Y., HALLIDAY, G. Can we clinically diagnose dementia with Lewy bodies yet? **Translational Neurodegeneration**, v.2(1), p.4, 2013.

IRWIN, D. J., WHITE, M. T., TOLEDO, J. B., Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. **Annals of Neurology**, v.72(4), p.587–598, 2012.

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

KANG, T. H.; FRIEDMANN, T. Alzheimer's disease shares gene expression aberrations with purinergic dysregulation of HPRT deficiency (Lesch-Nyhan diseases). **Neuroscience Letters**, v.590, p.35-39, 2015.

KEGG Human Disease. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?br08402+H01696> Acesso em: 18 set. 2018.

KIM, W. S., KAGEDAL, K., HALLIDAY, G. M. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. **Alzheimer's Research & Therapy**, v.6(73), 2014.

KOCERHA, J., FAGHIHI, M. A., LOPEZ-TOLEDANO, M. A., HUANG, J., RAMSEY, A. J., CARON M. G., MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.106(9), p.3507-3512, 2009.

KUMAR, P., DEZSO, Z., MACKENZIE, C., OESTREICHER, J., AGOULNIK, S., BYRNE, M., BERNIER, F., YANAGIMACHI, M., AOSHIMA, K., ODA, Y. Circulating miRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease. **Plos One**, v.8(7), 2013.

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

LANA, R. C., ALVARES, L. M. R. S., NASCIUTTI-PRUDENTE, C., GOULART, F. R. P., TEIXEIRA-SALMELA, L. F., CARDOSO, F. E. Percepção da qualidade de vida de indivíduos com doença de Parkinson através do pdq-39. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.11, p.397-402, 2007.

LEE, H. J., BAE, E. J., LEE, S. J. Extracellular α -synuclein: A novel and crucial factor in Lewy body diseases. **Nature Reviews Neurology**, v.10(2), p.92-98, 2014a.

LEE, I. H.; HONG, X.; MATHUR, S. C.; SHARMA, M.; RASTOGI, A.; SHARMA, P.; CHRISTENSON, L. K.; BANSAL, A. A detailed analysis of next generation sequencing reads of microRNA expression in Barrett's Esophagus: absolute versus relative quantification. **BMC Research Notes**, v.7(212), 2014b.

LEIDINGER, P., BACKES, C., DEUTSCHER, S., SCHMITT, K., MUELLER, S. C., FRESE, K., HAAS, J., RUPRECHT, K., PAUL, F., STÄHLER, C., LANG, C. J. G., MEDER, B., BARTFAI, T., MEESE, E., KELLER, A., A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. **Genome Biology**, v.14, 2013.

LEWIS, P., PROWLAND M. D. Merrit **Tratado de neurologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.768-83, 2007.

LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. **Molecular Neuroscience**, v.18(3), 2007.

MA, X.; LUI, L.; MENG, J. MicroRNA-125b promotes neurons cell apoptosis and Tau phosphorylation in Alzheimer's diseases. **Neuroscience Letters**. 2017.

MARGOTTO, P. R. Curva ROC Como fazer e interpretar no SPSS. **Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS)**, DF, Brasil, 2010.

MCKEITH, I. G. Dementia with Lewy bodies. **British Journal of Psychiatry**, v.180, p.144-147, 2002.

MEDA, S. A.; NARAYANAN, B.; LIU, J.; PERRONE-BIZZOZERO, N. I.; STEVENS, M. C.; CALHOUN, V. D.; GLAHN, D. C.; SHEN, L.; RISACHER, S. L.; SAYKIN, A. J.; PEARLSON, G. D. A large scale multivariate parallel ICA method reveals novel imaging-genetic relationships for Alzheimer's disease in the ADNI cohort. **Neuro Image**, v.60, p.1608-1621. 2012.

MELO, D. M., BARBOSA, A. J. G. O uso do Mini-Exame do Estado Mental em pesquisas com idosos no Brasil: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.20(12), p. 3865-3876, 2015.

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

MICHELI, F.; PALERMO, R.; TALORA, C.; FERRETTI, E.; VACCA, A.; NAPOLITANO, M. Regulation of proapoptotic proteins Bak1 and p53 by miR-125b in an experimental model Alzheimer's disease: protective role of 17b-Estradiol. **Neuroscience Letters**. 2016.

miRBase. Disponível em: <<http://www.mirbase.org/>> Acesso em: 03 mar. 2019.

miRBase. The microRNA database. Mature sequence hsa-miR-125a-5p. Manchester 1824. Disponível em: < http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000443>. Acesso em: 07 set. 2018a.

miRBase. The microRNA database. Stem-loop sequence hsa-mir-30d. Manchester 1824. Disponível em: < http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000255>. Acesso em: 07 set. 2018b.

miRBase. The microRNA database. Stem-loop sequence hsa-mir-342. Manchester 1824. Disponível em: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000805>. Acesso em: 07 set. 2018c.

MOLDOVAN, L., BATTEK, E., TRGOVCICH, J. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.18, p.371–390, 2014.

MOLLENHAUER, B. Quantification of a-synuclein in cerebrospinal fluid: How ideal isthisbiomarker for Parkinson's disease?.**Parkinsonism and Related Disorders**, v.20,p.76–79, 2014.

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

MULLER, T., CONCANNON, C.G., WARD, M.W., WALSH, C.M., TIRNICERIU, A.L., TRIBL, F., KOGEL, D., PREHN, J.H., EGENSPERGER, R. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). **Molecular Biology of the Cell**. v.18, p.201–210. 2007.

NAKANISHI, A.; MINAMI, A.; KITAGISHI, Y.; OGURA, Y.; MATSUDA, S. BRCA1 and TP53 Tumor Suppressor Molecules in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, p.2879-2892. 2015.

NASSIRPOUR, R.; MATHUR, S.; GOSINK, M. M.; LI, Y.; SHOIEB, A. M.; WOOD, J.; O'NEIL, S. P.; HOMER, B. L.; WHITELEY, L. O. Identification of tubular injury microRNA biomarkers in urine: comparison of next-generation sequencing and qPCR-based profiling platforms. **BMC Genomic**. v.15(485), 2014.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. MIR30D microRNA 30d [*Homo sapiens*(Human)]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407033>>. Acesso em: 07 set. 2018a.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. MIR342 microRNA 342 [*Homo sapiens*(Human)]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/442909>>. Acesso em: 07 set. 2018b.

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

NOWAK, J. S., MICHLEWSKI, G. miR NAs 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. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69(1), p.89–102, 2012.

PARKINSON'S FOUNDATION – Disponível em: <<https://parkinson.org/>> Miame, Flórida. Acesso em: 05 mar. 2019.

PEREIRA, T. C. Introdução ao mundo dos microRNAs. 1ed, São Paulo, **Sociedade Brasileira de Genética**, 2015.

PEGTEL, D. M., PEFEROEN, L., AMOR, S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.369(1652), 2014.

PIMENOVA, A. A.; THATHIAH, A.; STROOPER, B. D.; TESSEUR, I. Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing by Serotonin Signaling. **Plos One**, v.9, n.1, p.1-13, 2014.

POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S. E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E. S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W. G.; LAZZARINI, A. M.; DUVOISIN, R. C.; IORIO, G. D.; GOLBE, L. I.; NUSSBAUM, R. L. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, v.276, p.2045-2047, 1997.

POORKAJ, P.; BIRD, T. D.; WIJSMAN, E.; NEMENS, E.; GARRUTO, R. M.; ANDERSON, L.; ANDREADIS, A.; WIEDERHOLT, W. C.; RASKIND, M.; SCHELLENBERG, G. D. Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. **American Neurological Association**. 1998.

PRINCE, M., BRYCE , R., ALBANESE , E., WIMO, A., RIBEIRO, W., FERRI, C. P. The global prevalence of dementia: a systematic review and meta analysis. **Alzheimers Dement**, v.9(1), p.62-75, 2013.

SAMYESUDHAS, S. J.; ROY, L.; DAHL, K. D. C. Differential expression of ARID3B in normal adult tissue and carcinomas. **Gene**. v.543, p.174-180. 2014.

SATOH, J. I. Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brain. **Experimental Neurology**, v.235, p.436-446, 2012.

SAUNDERS, A. M., STRITTMATTER, W. J., SCHMECHEL, D., GEORGE-HYSLOP, P. H., PERICAK-VANCE, M. A., JOO, S. H., ROSI, B.L., GUSELLA, J. F., CRAPPER-MACLACHLAN, D. R., ALBERTS, M. J. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. **Neurology**, v.43(8), p.1467-1472, 1993.

SCHILLING, M. A. Unraveling Alzheimer's: Making Sense of the Relationship between Diabetes and Alzheimer's Disease1. **Journal Alzheimer Disease**, v.51(4), p.961-977, 2016.

SCHLINDWEIN-ZANINI, R. Demência no idoso: Aspectos neuropsicológicos. **Revista Neurociências**, v.18(2), p.220-226. 2010.

SCHMIEDEL, J. M., KLEMM, S. L., ZHENG, Y., SAHAY, A., BLUTHGEN, N., MARKS, D. S. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. **Science, New York (NY)**, v.348(6230), p.128–132, 2015.

SCHONROCK, N., KE, Y. D., HUMPHREYS, D., STAUFENBIEL, M., ITTNER, L. M., PREISS, T., GÖTZ, J. Neuronal MicroRNA Deregulation in Response to Alzheimer's Disease Amyloid-b. **Plos One**, v.5(6), 2010.

SERAFIN, A., FOCO, L., ZANIGNI, S., BLANKENBURG, H., PICARD, A., ZANON, A., GIANNINI, G., PICHLER, I., FACHERIS, M. F., CORTELLI, P., PRAMSTALLER, P. P., HICKS, A. A., DOMINGUES, F. S., SCHWIENBACHER, C. Overexpression of blood microRNAs 103, 30b and 29a, in L-dopa-treated patients with PD. **American Academy of Neurology**, v.84, 2015.

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 cellularneuroscience**, v.7, p.150, 2013.

SPILLANTINI, M. G; MURRELL, J. R.; GOEDERT, M.; FARLOW, M. R.; KLUG, A.; GHETTI, B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. **Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.95, p.7737-7741. 1998.

SPUCH, C.; ANTEQUERA, D.; PORTERO, A.; *et al.* The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. **Biomaterials**. v.31, p.5608–5618, 2010.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. **Fundamentos da Genética**. 6th.ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.

SOUZA, C. F. M., ALMEIDA, H. C. P., SOUSA, J. B., COSTA, P. H., SILVEIRA, Y. S. S., BEZERRA, J. C. L. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. - **Revista Neurociências**, v.19(4), p.718-723, 2011.

STOYANOVA I. I. Ghrelin: A link between ageing, metabolism and neurodegenerative disorders. **Neurobiology of Disease**, v.72, p.72–83, 2014.

TAN, L., YU, J. T., LIU, Q. Y. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v.336(1–2), p.52–56, 2014a.

TAN, L., YU, J. T., TAN, M. S., LIU, Q. Y., WANG, H. F., ZHANG, W, JIANG, T., TAN, T. Genome-wide Serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for

Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease**, v.40, p.1017–1027, 2014b.

TAN, L., YU, J. T. HU, N. Non-coding RNA s in Alzheimer's disease. **Molecular Neurobiology**, v.47(1), p.382-393, 2013.

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

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. **Revista Neurociencias**, v.13, p.201-14, 2005.

TERNI, B., BOADA, J., PORTERO-OTIN, M., PAMPLONA, R., FERRER, I. Mitochondrial ATPsynthase in the entorhinal cortex is a target of oxidative stress at stages I/II of Alzheimer's disease pathology. **Brain Pathology**. v.20, p.222–233, 2010.

TSUANG, D., LEVERENZ, J. B., LOPEZ, O. L., HAMILTON, R. L., BENNETT, D. A. A POE epsilon4 increases risk for dementia in pure synucleinopathies. **JAMA Neurology**, v.70(2), p.223-228, 2013.

TUNA, S., ERSON, A. E. Gene Section Mini Review, MIR125A (microRNA 125a). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematogy**, v.13(7), p.485-486, 2008.

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.

VISWAMBHARAN, V.; THANSEEM, I.; VASU, M. M.; POOVATHINAL, S. A.; ANITHA, A. miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. **Biomarkers in Medicine**, 2017.

VLACHOS, I. S., ZAGGANAS, K., PARASKEVOPOULOU, M. D., GEORGAKILAS, G., KARAGKOUNI, D., VERGOULIS, T., DALAMAGAS, T., HATZIGEORGIOU, A. G. DIANA-miRParth v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, v.43, p.460-466, 2015.

WANG, B. J.; HER, G. H.; HU, M. K.; CHEN, Y. W.; TUNG, Y. T.; WU, P. Y.; HSU, W. M.; LEE, H.; JIN, L. W.; HWANG, S. P. L.; CHEN, R. P. Y.; HUANG, C. J.; LIAO, Y. F. ErbB2 regulates autophagic flux to modulate the proteostasis of APP-CTFs in Alzheimer's disease. **PNAS PLUS**. 2017.

WANG, W., KWON, E. J., TSAI, L. H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. **Learning & Memory**, v.19(9), p.359-368, 2012.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomic. **Nature Reviews | Genetics**, v.10, p.57-63, 2009.

WATSON, G. S.; LEVERENZ, J. B. Profile of Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. **Brain Pathology**, v.20, p.640–645, 2010.

WATSON, J. D., BELL, S. P., GANN, A., LEVINE, M. **Biologia Molecular do Gene**. 7et.ed, Artmed, Porto Alegre, 2015.

WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZANG, S., HUANG, D. Y., HUANG, K. H., LEE, M. J., The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical Chemistry**, v.56(11), p.1733-1741, 2010.

WEGNER, N. R. **Avaliação da Expressão do miRNA-9** em soro de pacientes com Doença de Alzheimer. Trabalho de Conclusão de Curso, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

WILSKER, D., PATSIALOU, A., DALLAS, P.B., MORAN, E. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. **Cell Growth & Differentiation**. v.13, p.95–106. 2002.

YUAN M., SILVA, A. C. L., ARNOLD, A., OKEKE, L., AMES, H., CORREA-CERRO, L. S., VIZCAINO, M. A., HO, C. Y., EBERHART, C. G, RODRIGUEZ, F. J. MicroRNA (miR)125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma. **Scientific Reports**, 2018.

ZALI, H.; ZAMANIAN-AZODI, M.; TAVIRANI, M. R.; BAGHBAN, A. A. Z. Protein Drug Targets of *Lavandula angustifolia* on treatment of Rat Alzheimer's Disease. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.14, n.1, p.291-302. 2015.

ZHANG, Y., KIM, M. S., JIA, B., YAN, J., ZUNIGA-HERTZ, J. P., HAN, C., CAI, D. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. **Nature**, v.000, 2017.

ZWEIG, Y. R., GALVIN, J. E., Lewy body dementia: the impact on patients and caregivers. **Alzheimer's Research & Therapy**. v.6(21), 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 - MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM)

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 (apartamento 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 correlacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente sobre as 3 palavras. Dê um ponto para cada resposta correta (_)
Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente 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 pra frente)

EVOCAÇÃO

- Pergunte ao paciente 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 pontos) (_)
 - Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto) (_)
 - Escrever uma frase (1 ponto) (_)
 - Copiar um desenho (1 ponto) (_)

ESCORE (____ / 30)

ANEXO 2

Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage – versão reduzida (GDS-15)

A Escala de Depressão Geriátrica em versão reduzida de Yesavage (GDS-15). Amplamente utilizada e validada como instrumento diagnóstico de depressão em pacientes idosos. É um teste para detecção de sintomas depressivos no idoso, com 15 perguntas negativas/afirmativas onde o resultado de 5 ou mais pontos diagnostica depressão, sendo que o escore igual ou maior que 11 caracteriza depressão grave.

1	Você está satisfeito com a sua vida?
2	Você deixou de lado muitos de suas atividades e interesses?
3	Você sente que sua vida está vazia?
4	Você sente-se aborrecido com frequência?
5	Está você de bom humor na maioria das vezes?
6	Você teme que algo de ruim lhe aconteça?
7	Você se sente feliz na maioria das vezes?
8	Você se sente freqüentemente desamparado?
9	Você prefere permanecer em casa do que sair e fazer coisas novas?
10	Você sente que tem mais problemas de memória que antes?
11	Você pensa que é maravilhoso estar vivo?
12	Você se sente inútil?
13	Você se sente cheio de energia?
14	Você sente que sua situação é sem esperança?
15	Você pensa de que a maioria das pessoas estão melhores do que você?
Contagem máxima de GDS = 15	

ANEXO 3 - ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA (PFEFFER)

	Atividades Instrumentais da Vida Dária	Normal	Faz com dificuldade	Necessita de ajuda	Não é capaz	Nunca fez mas poderia fazê-lo	Nunca fez e agora teria dificuldade
1	Ele(a) manuseia seu próprio dinheiro ?	0	1	2	3	0	1
2	Ele(a) é capaz de comprar roupas, comida, coisas acasa sozinho(a)	0	1	2	3	0	1
3	Ele(a) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo ?	0	1	2	3	0	1
4	Ele(a) é capaz de preparar uma refeição ?	0	1	2	3	0	1
5	Ele(a) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança ?	0	1	2	3	0	1
6	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	0	1
7	Ele(a) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos familiares , feriados ?	0	1	2	3	0	1
8	Ele(a) é capaz de manusear seus próprios remédios ?	0	1	2	3	0	1
9	Ele(a) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta para casa ?	0	1	2	3	0	1
10	Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) com segurança ?	0	1	2	3	0	1

ANEXO 4 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DEMÊNCIA – CLINICAL DEMENTIA RATING (CDR)

NOME: _____ DATA DA AVALIAÇÃO: _____

	SAUDÁVEL	DEMÊNCIA QUESTIONÁVEL	DEMÊNCIA LEVE	DEMÊNCIA MODERADA	DEMÊNCIA GRAVE
	CDR 0	CDR 0,5	CDR 1	CDR 2	CDR 3
MEMÓRIA	Sem perda da memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente []	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; esquecimento “benigno” []	Perda de memória moderada, mais acentuada para fatos recentes, o deficit interfere com atividades do dia-a-dia []	Perda de memória grave; apenas material muito aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos []	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem []
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado []	Plenamente orientado []	Dificuldade moderada com as relações do tempo; orientado no espaço, no exame, mas pode ter desorientação geográfica em outros locais []	Geralmente desorientado []	Orientação pessoal apenas []
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia-a-dia; juízo crítico é bom em relação ao desempenho passado []	Leve comprometimento na solução de problemas, semelhanças e diferenças []	Dificuldade moderada na solução de problemas, semelhanças e diferenças; julgamento social geralmente mantido []	Gravemente comprometido para solução de problemas, semelhanças e diferenças; juízo social geralmente comprometido []	Incapaz de resolver problemas ou de ter qualquer juízo crítico []
ASSUNTOS DA COMUNIDADE	Função independente nas atividades de trabalho, compras, negócios, finanças e grupos sociais []	Leve dificuldade nestas atividades []	Incapaz de funcionar independentemente nas atividades, embora ainda possa desempenhar algumas; pode parecer normal na avaliação inicial []	Sem possibilidade de desempenho fora de casa; parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora de casa []	Sem possibilidade de desempenho fora de casa; parece muito doente para ser levado a atividades fora de casa []
LAR E PASSATEMPOS	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais mantidos []	Vida em casa, passatempos e interesses intelectuais levemente afetados []	Comprometimento leve mas evidente em casa; abandono de tarefas mais difíceis; passatempos e interesses mais complicados são abandonados []	Só realiza tarefas mais simples. Interesses muito limitados e pouco mantidos []	Sem qualquer atividade significativa em casa []

CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz <input type="checkbox"/>	Plenamente capaz <input type="checkbox"/>	Necessita de assistência ocasional <input type="checkbox"/>	Requer assistência no vestir e na higiene <input type="checkbox"/>	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais. Geralmente incontinente <input type="checkbox"/>
--------------------------	--	--	--	---	---

Escore final: _____

Assinatura e carimbo do médico

ANEXO 5 - Extração de RNA total com kit mirVana™ PARIS™

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

1) Adicionar 375µl de 2-mercaptoetanol ao frasco “2X Solução Desnaturante”, mexer bem e marcar no frasco que o reagente já foi adicionado.

Obs: 2X Solução Desnaturante 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 Solução de Lavagem 1” mexer bem e marcar no frasco que o reagente já foi adicionado.

3) Adicionar 40ml de etanol 100% no frasco “Solução de Lavagem 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 Solução Desnaturante” 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 “Ácido Fenol Clorofórmio” em igual volume da amostra + solução desnaturante (Por ex: amostra 200 µl, solução desnaturante 200µl, total 400µl, adicionar 400µl de Ácido Fenol Clorofórmio.)

3) Colocar no vortex de 30 a 60 segundos para misturar bem

4) Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima ($\geq 10,000 \text{ xg}$) 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 “Solução de Lavagem 1” no filtro e centrifugar por 15 segundos. Descartar o líquido resultante e recolocar o filtro no tubo.
- 10) Adicionar 500µl de “Solução de Lavagem 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 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

ANEXO 6 - Protocolo de Retro transcrição (RT)

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 MIX1 + 2,5 μl da amostra (ou água DEPC para o controle negativo).

O **MIX1** 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

ANEXO 7 - PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

- Equipamentos ViiA™ 7 e StepOne™
- Método de detecção TaqMan®
- Placas de 96 poços.
- Cada miRNA será amplificado a partir de um ensaio específico Kit TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems).

Reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições:

- 3,8µl H₂O DEPC
- 5µl (de enzima, nucleotídeos e demais reagentes para amplificação)
- 0,5µl primer + sonda

Amostra 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,
- 45 ciclos constituídos de:
- Desnaturação a 95°C por 15 segundos
- Extensão a 60°C 1 minuto.

A expressão relativa dos miR -125, 29 e 30 (gene alvo) será normalizada utilizando o controle endógeno miR-16 (gene referência), por meio do método $\Delta\Delta CT$.