

**VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA**

**NÍVEIS SANGUÍNEOS TOTAIS DE MICRORNAS EM PACIENTES  
PORTADORES E NÃO PORTADORES DA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER  
PROVÁVEL**

**BRASÍLIA, 2019**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA**

**NÍVEIS SANGUÍNEOS TOTAIS DE MICRORNAS EM PACIENTES  
PORTADORES E NÃO PORTADORES DA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER  
PROVÁVEL.**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

**BRASÍLIA, 2019**

**VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA**

**NÍVEIS SANGUÍNEOS TOTAIS DE MICRORNAS EM PACIENTES  
PORTADORES E NÃO PORTADORES DA DEMÊNCIA DE ALZHEIMER  
PROVÁVEL.**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Aprovado em 12 de Dezembro de 2019.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Otávio Tolêdo Nóbrega – (Presidente)**

Universidade de Brasília

**Dra. Andréa Lessa Benedet – (Membro)**

McGill University , Canadá

**Dr. Einstein Francisco Camargos – (Membro)**

Universidade de Brasília

**Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim – (Membro)**

Universidade de Brasília

**Dra. Carla Nunes de Araújo – (Suplente)**

Universidade de Brasília

*Dedico este  
trabalho a minha  
Esposa, ao meu Filho,  
aos meus Pais e ao meu  
Irmão. Pois sempre  
estiveram do meu lado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela inspiração e força com que me conduziu. Pelo cuidado que Ele teve comigo todo esse tempo. Pela sabedoria, na qual, eu venho conquistando a cada dia que se passa, pois sei que ela vem Dele.

A minha Esposa Lorena, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, incentivando e dando forças pra continuar essa jornada do doutorado. Saiba que você foi um dos pilares de sustentação para a conclusão deste estudo. Ao meu filho, pelos momentos de descontrações e brincadeiras. Pois, mal sabe ele, o tanto que me fez bem estes momentos, e quanto me fez crescer como Homem e Pai.

Aos meus Pais, pelo apoio incondicional na minha vida. Onde sempre me incentivaram nos estudos. Agradeço por vocês sempre estarem ao meu lado, não importando qual seja a situação.

Ao meu Irmão André, que sempre demonstrou seu carinho, e o quanto se orgulha de mim, por ter chegado aonde cheguei. Tamo junto!!

Ao meu amigo e orientador Prof<sup>o</sup> Otávio, pelos seus ensinamentos e conselhos. Pois, através destes ensinamentos, eu me tornei o profissional de hoje. O senhor é um Ser Humano fora da curva.

Ao meu amigo Gilberto, futuro Doutor. Pois sua ajuda neste trabalho foi excepcional. Sou grato pela sua amizade, e pela troca de conhecimento que tivemos.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, Clayton Franco, Einstein Camargos, Audrey Tonet, Adriane Dallanora, Wilcelly Machado, Gleiciane Gontijo, Elisa de Souza, Gilberto Santos, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi com cada um de vocês. Esse grupo é top demais!!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF). A Universidade Católica de Brasília que me possibilitou desenvolver este trabalho em suas dependências.

Em especial a todos os pacientes e familiares que se dispuseram a participar deste trabalho, para o crescimento da ciência.

Finalmente, partindo da premissa de que ninguém faz nada sem ajuda, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, concorreram para que o presente trabalho se desenvolvesse e pudesse ser concluído.

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.”*

*C.S Lewis*

## RESUMO

**Introdução:** Evidências recentes sugerem que alterações nos níveis de microRNA circulante podem ser biomarcadores promissores para o diagnóstico clínico da doença de Alzheimer (DA). Hipotetizamos que os microRNAs (miRNAs) do sangue total podem ser úteis na identificação de indivíduos com DA. **Objetivo:** Comparar níveis de um grupo selecionado de miRNAs circulantes a partir do sangue total de mulheres acometidas ou não por DA provável. **Métodos:** Para este propósito, uma amostra de mulheres residentes na comunidade do Distrito Federal ( $\geq 55$  anos de idade,  $n=74$ ) portadoras do alelo ApoE  $\epsilon 4$  foi avaliada clinicamente com base nos critérios da Associação Americana de Psiquiatria e da Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer para diagnosticar ou descartar provável DA, escala de classificação de demência clínica utilizada para o estadiamento da demência. O RNA total foi isolado de amostras de sangue total obtidas do grupo controle ( $n = 38$ ) e do grupo DA ( $n = 36$ ). Um conjunto de 25 miRNAs maduros foi selecionado para avaliação baseado em evidências experimentais de interação com genes ligados à neuropatologia da DA de início tardio. Concentrações no sangue total foram determinadas por qRT-PCR. **Resultados e Discussão:** Quando pacientes com DA foram comparados com indivíduos não dementes, apenas a concentração de miR-9 diferiu entre grupos ( $P = 0,001$ ), com redução mediana da ordem de 3 vezes dos níveis circulantes no grupo DA. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que o miR-9 circulante pode ser um biomarcador sanguíneo potencial para a DA provável, corroborado por evidências da literatura sobre sua implicação na amiloidogênese.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, MicroRNAs, Biomarcador;



## ABSTRACT

**Introduction:** Recent evidence suggests that changes in circulating microRNA levels may be promising biomarkers for the clinical diagnosis of Alzheimer's disease (AD). We hypothesized that whole blood microRNAs (miRNAs) may be useful in identifying individuals with established AD. **Objective:** To compare levels of a selected group of circulating miRNAs from whole blood of women with or without probable AD. **Methods:** For this purpose, a sample of women from the Federal District community ( $\geq 55$  years,  $n=74$ ) carrying the ApoE  $\epsilon 4$  allele was clinically evaluated based on criteria from the American Psychiatric Association and the Alzheimer's Disease Rating Scale to diagnose or rule out probable AD, clinical dementia rating scale used for staging dementia. Total RNA was isolated from whole blood samples obtained from the control group ( $n = 38$ ) and the AD group ( $n = 36$ ). A set of 25 mature microRNAs was selected for evaluation based on experimental evidence of interaction with genes linked to late-onset AD neuropathology. Whole blood concentrations were determined by qRT-PCR. **Results and Discussion:** When AD patients were compared with non-demented individuals, only the miR-9 concentration differed between groups ( $P = 0.001$ ), with a median reduction of 3 times the circulating levels in the AD group. **Conclusion:** Our findings suggest that circulating miR-9 may be a potential blood biomarker for probable AD, corroborated by evidence in the literature about its implication in amyloidogenesis.

**Key-words:** Alzheimer's disease, MicroRNAs, Biomark.

## **LISTA DE (FIGURAS) ILUSTRAÇÕES**

FIGURA 1 - Esquema representativo da biogênese dos microRNAs. mRNA - RNA mensageiro; miRNA - microRNA; RISC - Complexo de indução do silenciamento do RNA.

FIGURA 2 - Composição da amostra de idosas consideradas para análise.

## **LISTA DE (TABELAS) ILUSTRAÇÕES**

TABELA 1 - Comparação das variáveis contínuas (média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil) e variáveis categóricas (proporção (%)) entre mulheres idosas do grupo controle não demenciados e do grupo DA.

TABELA 2 - Descrição da identificação de hsa-miRNA e níveis relativos entre idosas controle não demenciados e DA.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Doença de Alzheimer
miRNAs	MicroRNAs
miRs	MicroRNAs
ApoE	Apolipoproteína E
RNA	Ácido Ribonucleico
qRT-PCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ADI	Associação Internacional de Alzheimer
NFT	Emaranhado Neurofibrilar
BACE-1	Proteína $\beta$ -secretase
APP	Proteína Precursora $\beta$ -amilóide
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
$\epsilon 4$	épsilon 4
GWAS	Genome Wide Association Study
has	<i>Human sapiens</i>
Pri-miRNAs	miRNAs Primários
Exp5	Exportina-5
RISC	Complexo de Indução do Silenciamento do RNA
MRI	Neuroimagem Estrutural
PET	Neuroimagem Funcional
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa

APA/DSM-IV	Associação Americana de Psiquiatria / Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ADAS-Cog	Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer – Subescala Cognitiva
CDR	Escala de classificação clínica da demência
MMSE	Mini exame do estado mental
SNC	Sistema Nervoso Central
CAMKK2	Cálcio/Calmodulina
SIRT1	Sirtuína
MCI	Comprometimento Cognitivo Leve

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	15
2 Revisão Bibliográfica .....	17
2.1 Doença Alzheimer .....	17
2.1.1 Epidemiologia .....	17
2.1.2 Fisiopatologia e Genética .....	19
2.2 Biologia dos microRNAs .....	23
2.2.1 Descobertas e Biogênese dos microRNAs .....	23
2.2.2 Conceito, características e nomenclatura dos microRNAs.....	25
2.3 MicroRNAs e Doença de Alzheimer .....	27
2.4 MicroRNAs Circulantes no Sangue .....	28
3 Justificativa .....	29
4 Objetivos .....	30
4.1 Objetivo Específico .....	30
5 Métodos .....	31
5.1 Amostra .....	31
5.2 Avaliação Ambulatorial .....	32
5.3 Seleção dos MicroRNAs .....	33
5.4 Amostra Sanguínea e Extração de RNA Total .....	34
5.5 Quantificação Relativa de microRNAs por qRT-PCR .....	35
5.6 Análise Estatística .....	37
6 Resultados .....	38
7 Discussão .....	41
8 Conclusão .....	44
9 Referências Bibliográficas .....	45
ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA .....	58
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A ciência tem tentado desvendar a fisiopatologia de diversas doenças, no intuito de desenvolver novos caminhos terapêuticos. Nesse contexto, o miRNA vem obtendo uma atenção na comunidade científica, podendo ser um promissor alvo terapêutico (1). Iniciou-se, em 1993, uma descoberta de diversos miRNAs relacionados aos processos biológicos como reguladores gênicos e sua catalogação. É possível, que ainda tenha uma grande quantidade de miRNAs desconhecidos, fazendo assim uma das maiores classes de reguladores gênicos. Sabe-se que cerca de 1/3 dos miRNAs regulam a expressão gênica em mamíferos (2).

Há várias pesquisas mostrando uma relação do padrão de expressão de miRNAs em algumas patologias, como doença neurodegenerativas, cardiovascular e câncer, apesar de que vários processos e mecanismos ainda não estão completamente elucidados. Acreditou-se durante anos que as regiões não-codificantes do genoma fossem “lixo genético”, visto que não tinham informação para realização da síntese de proteínas (3).

Diante dessa extensa variedade de classes de ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes, os miRNAs passaram a ser objeto de interesse devido à associação entre a sua desregulação e o surgimento de alterações patológicas e fenotípicas (4). Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de RNA em cadeia simples, não codificantes, tendo cerca de 22 nucleotídeos. Agem como reguladores da expressão gênica, seja em humanos, animais ou plantas, a nível pós-transcricional, através da clivagem de um RNA mensageiro (RNAm) alvo ou da repressão de sua tradução (5).

O grupo de Rosalind Lee foi quem descreveu o primeiro miRNA (lin-4), demonstrando que ele está associado à regulação do desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). O nível da proteína Lin-14 foi diminuindo sua expressão ao longo do tempo devido à ação do Lin-4, que faz regulação negativamente do nível desta proteína (1).

Os microRNAs são bem estáveis e conseguem ser detectados em fluidos humanos. É de grande importância a detecção de perfis de microRNAs para pesquisa clínica, pois podem surgir como novos biomarcadores (6).

O trabalho teve como objetivo comparar indivíduos com e sem Doença de Alzheimer (DA) provável para concentração sanguínea total de um subconjunto específico de miRNAs selecionados com base em seu papel modulador na expressão de genes associados à etiologia da DA.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER**

#### **2.1.1 Epidemiologia**

A sociedade aspira a uma vida prolongada e de qualidade. Porém, só pode ser caracterizada uma vida de qualidade, quando tem agregado nela uma qualidade aos anos adicionais de vida. Portanto, qualquer política direcionada à população idosa deve levar em consideração a capacidade funcional, a necessidade de autonomia, de auto-satisfação, de participação, com incentivo à prevenção, ao cuidado e à atenção integral ao idoso (7).

A sociedade brasileira tem passado por um grande desafio com o aumento, sem precedentes, da parcela idosa da população. Dados do instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE) (2012) têm mostrado uma proporção de uma pessoa com 60 anos ou mais de idade para cada duas pessoas de menos de 15 anos de idade (8).

Em 1960, o número de idoso ultrapassou 3 milhões, atingindo 7 milhões em 1975 e chegando a 20 milhões em 2008, mostrando assim, um aumento próximo aos 700% em menos de 50 anos. Esse aumento significativo também traz consigo maior incidência de doenças crônicas, que exigem cuidados diferenciados e constantes, como no caso das demências (7).

Há uma estimativa de que cerca de 46,8 milhões de pessoas no mundo apresentam demência, com a expectativa de que este número dobre a cada 20 anos, podendo chegar a 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050, segundo dados do relatório de 2015 da Associação Internacional de Alzheimer (ADI) (9). Na atualidade, trata-se de diagnosticar um novo caso de demência no mundo a cada 3,2 segundos, podendo chegar a um novo caso a cada segundo em 2050.

O estudo de Lopes e Bottino, realizado entre 1994 e 2000, mostrou uma grande variação na prevalência da demência em diversas regiões pelo mundo. Dentre elas, temos 2,2% na África, 6,4% na América do Norte, 7,1% na América do Sul, 5,5% na Ásia e 9% na Europa. Na prevalência da demência e a idade, foi

encontrado pelos pesquisadores em indivíduos entre 65 e 69 anos uma prevalência média de 1,17% e de 54,83% para os indivíduos acima de 95 anos (10).

A DA é a forma mais frequente de demência nas sociedades ocidentais, com prevalência mundial estimada em 24 milhões em 2012 (11). Espera-se que 115 milhões de pessoas serão afetadas especificamente por DA em 2050 (12). O aumento rápido do seguimento mais longo da população (> 80 anos) associado à longa duração da doença justificam sua elevada prevalência mundial (11), e contribuem para que a doença constitua um problema de saúde pública para as próximas décadas. O principal fator de risco para o desenvolvimento da DA consiste na própria idade (13). A relação entre a incidência de DA e a idade foi mostrada no estudo do Snowdon (14), onde a taxa dobrou a cada 5 anos até os 90 anos de idade. No entanto, foi visto que após os 93 anos ocorria estacionamento do risco a partir deste limiar etário. Segundo Herrera e seus colaboradores (15), a idade teve uma grande influência sobre os resultados, tendo taxas médias de prevalência de demência que variavam de 1,6% na faixa de 65 a 69 anos, a 38,9% na faixa acima do 85 anos.

Porém, existem outros fatores que podem também contribuir com o desenvolvimento da DA (16). Dentre os fatores demográficos que contribuem para um risco aumentado para a DA, encontramos o sexo (risco 3 vezes maior entre mulheres), escolaridade (risco 2 vezes maior entre iletrados) e história familiar da doença (risco maior em aproximadamente 4 vezes), além da ocorrência de distúrbios vasculares. No entanto, pode ocorrer variação nas taxas de prevalência de demência conforme a região onde se vive e a condição sócio econômica (12,13).

O alto nível de escolaridade é visto como fator protetor (17). Há estudo que constatou que indivíduos com oito anos ou mais de escolaridade apresentavam 3,5% de prevalência de DA, enquanto analfabetos apresentavam a doença com prevalência de 12,2% (18).

Quanto à história familiar como fator de risco para DA, temos relatos de que irmãos de pacientes possuem duas vezes mais risco de desenvolver a doença, enquanto gêmeos idênticos apresentam concordância em aproximadamente 40% dos casos, frequência maior que a encontrada entre gêmeos dizigóticos (19,20).

Há também outros fatores que podem aumentar o risco para DA, mas que são questionados cientificamente, como a etnia caucasiana, a aterosclerose e o trauma cranioencefálico (21).

### 2.1.2 Fisiopatologia e Genética

As características básicas da DA foram descritas, no início do século passado, por Alois Alzheimer, que relatou o caso de uma senhora de 51 anos de idade que foi trazida à atenção médica devido a um quadro de delírio de ciúmes em relação ao seu marido. Nos meses seguintes, sua memória deteriorou rapidamente e ela passou a apresentar parafasias, apraxia e desorientação espacial. A paciente faleceu quatro anos e meio após o início dos sintomas. O exame anatomopatológico revelou um cérebro claramente atrofiado e, microscopicamente, a presença de fusos neurofibrilares, placas senis e perda neuronal (22,23,24).

Os achados de Alzheimer (25,26) serviram como base para a investigação de três grandes áreas: 1) quadro clínico e progressão dos sintomas; 2) anatomopatologia; e 3) correlação entre o quadro clínico e a patologia cerebral. Apesar do evidente avanço de nosso conhecimento nessas áreas (27,28,29,30), a questão fundamental sobre as bases fisiopatológicas da doença de Alzheimer ainda permanece sem resposta.

Clinicamente, a demência de Alzheimer consiste na doença neurodegenerativa associada à idade, tendo como resultado uma deficiência progressiva e uma eventual incapacitação (31,32).

Histopatologicamente, a DA é caracterizada por uma grande perda sináptica, com morte neuronal observada nas regiões cerebrais que desempenham funções cognitivas, incluindo o estriado ventral, o córtex entorrinal, o hipocampo e o córtex cerebral (33). Na DA é possível identificar algumas características histopatológicas no parênquima cerebral dos portadores, como depósitos fibrilares amiloidais que podem ser localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, como também as placas senis, que correspondem a um acúmulo de filamentos anormais da proteína tau, resultando nos emaranhados neurofibrilares (NFT), a perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação (34).

A etiologia da DA é baseada sobre duas hipóteses neuropatológicas, a saber: a cascata amiloidal e o emaranhados neurofibrilares. Na primeira hipótese, temos o processo de amiloidose como fundamento de partida. A proteína  $\beta$ -secretase (*Beta site APP Cleaving Enzyme*), ou BACE-1, é uma aspartil-protease, estando ancorada na membrana lisossômica. O início da cascata amiloidal é feito através da clivagem

da proteína precursora amiloide (9) pela enzima proteolítica chamada  $\beta$ -secretase (BACE) e  $\gamma$ -secretase (35,36). O resultado é um aumento, agregação e deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide de 42 aminoácidos ( $\beta$ A42), tendo como consequência a formação das placas senis (37). Estas placas consistem em achado observável ao exame anátomo-patológico *pos-mortem* e que costuma ser empregado como sinal confirmatório para o diagnóstico conclusivo da doença.

Segunda hipótese consiste nos emaranhados neurofibrilares que tem como constituinte os filamentos helicoidais originados da hiperfosforilação da proteína Tau que forma o citoesqueleto da célula do sistema nervoso (25). A proteína Tau tem como função estabilizar os microtúbulos neuronais. Quando há perda da função da proteína Tau por hiperfosforilação, ocorre desorganização gradual do citoesqueleto celular com formação dos emaranhados neurofibrilares (38), e justifica a degeneração colinérgica. A presença de fusos neurofibrilares é considerada fundamental para o desenvolvimento da DA, e sua concentração e distribuição têm sido consistentemente correlacionadas com a gravidade da demência (39). Em modelos animais, foi observada deficiência de memória acompanhada de disfunção do sistema colinérgico, semelhante ao que ocorre na DA (40).

O primeiro gene identificado com relação causal com a DA consistiu na proteína precursora  $\beta$ -amilóide (APP) (9). O gene da APP está localizado no cromossomo 21, sendo por isso constatado que portadores da síndrome de Down apresentam expressão elevada de proteína precursora do amiloide (34), e justificando prevalência elevada de achados clínicos e neuropatológicos compatíveis com DA entre portadores dessa síndrome mesmo entre os 40 e 50 anos de idade (41). A identificação da proteína APP ocorreu pelo estudo dos casos familiares, com padrão de herança monogênica, autossômica e dominante que caracteriza a forma precoce da DA (42). A proteína precursora amiloide sofre uma clivagem após sua síntese, originando um fragmento chamado  $\beta$ -amilóide 40 e 42 aminoácidos. O fragmento de 42 aminoácidos é neurotóxico, e quando acumulado no tecido cerebral gera formação de fibras amiloides, acarretando formações de placas senis (43,44,45).

Temos diversos estudos associando mutações no gene APP com casos de DA precoce (42,44). Já são relatadas 20 diferentes mutações de troca de aminoácidos no gene da APP (45), mais de 800 polimorfismos na região dos íntrons e 11 nos éxons (46). A primeira mutação correlacionada com DA ocorrendo troca de

aminoácido foi a “London mutation” (V717I). Porém, foi encontrada em poucos pacientes (47). Através da identificação da mutação V717I, tivemos outras mutações sendo correlacionadas com DA de início precoce, como a D678M numa família japonesa (48), as mutações Swedish nos códons 670, 671 (K670M e D671L) (49) e as mutações E693G e A692G (50).

As presenilinas são proteínas que funcionam como subunidades da enzima BACE, direcionando a ação da enzima de modo a cortar APP diferentemente (e liberar beta-amilóide) a depender do seu tipo. A presenilina 1 (PSEN1) possui mais 40 mutações, e é localizada no braço longo do cromossomo 14 (14q24.3). De 18% a 50% dos casos de DA com início precoce tem como responsáveis as mutações na PSEN1 (51). Além da PSEN1, foi encontrado um gene homólogo denominado presenilina 2 (PSEN2), sendo identificado no cromossomo 1 (1q31-q42). Esses achados tiveram uma grande importância na elucidação da patogênese da DA. Pois uma vez que, as presenilinas regulam o processo de formação de APP pelo seu efeito de gama-secretase, uma das enzimas que cliva APP (42). Mutações na PSEN1 são responsáveis pela maior parte dos casos de DA familiar, enquanto as mutações na PSEN2 são as mais raras (52,53).

Apesar de existirem vários fatores de risco genético, como APP, PSEN1, PSEN2, associados a DA precoce, o gene da ApoE tem tido uma associação bem forte com a forma tardia da doença. A variação épsilon 4 ( $\epsilon 4$ ) deste gene, demonstrou uma maior associação ao número de placas senis e placas vasculares, além de uma redução da função colinérgica nos cérebros de pacientes portadores de DA. A presença dessa variação  $\epsilon 4$  do gene ApoE está associada a fatores de risco significativos para a DA, podendo elevar em até quatro vezes o risco para o desenvolvimento da DA. Podendo esse risco aumentar ainda mais se o indivíduo herdar o alelo  $\epsilon 4$  de ambos os pais (54).

No início dos anos 90, foi descrita a associação entre o alelo  $\epsilon 4$  do gene para ApoE e a DA de início tardio (55). Estudos genômicos amplos de alto desempenho (*Genome Wide Association Study - GWAS*) confirmam que o gene ApoE consiste no fator de risco genético que confere maior susceptibilidade para a DA de início tardio (56). Um estudo mostrou que indivíduos com 80 anos de idade que apresentavam genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  possuem taxa de incidência de DA aumentada em três a quatro vezes quando comparados a indivíduos com genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Já o genótipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$  leva a um aumento de quatro a nove vezes na taxa de incidência (57). Mas desde 2009,

foram identificados ao menos nove outros *loci* associados à doença, a saber: CLU, PICALM, CR1, BIN1, ABCA7, MS4A, CD2AP, CD33 e EPHA1 (58). Coletivamente, estes genes explicam 50% das bases genéticas da DA, e apontam para três novas vias explicativas da doença que estão associadas à função do sistema imunitário, ao metabolismo do colesterol e à disfunção sináptica e dos processos das membranas celulares (59).

## 2.2 BIOLOGIA DOS MICRORNAS

### 2.2.1 Descobertas e Biogênese dos MicroRNAs

Há duas décadas, a importância dos miRNAs era completamente desconhecida ou ignorada. Não havia estudos sobre o papel regulatório destas moléculas, sobretudo pelo fato da comunidade científica estar focada sobre genes codificantes de proteínas. Sabemos que o dogma central consiste na transcrição do DNA em RNA o qual é traduzido em proteína, o que colocava de lado estudos sobre sequências não codificadoras de proteínas (60,61).

Em 1993, foram descritos os primeiros miRNAs (miRs ou miRNAs) pelos estudos de desenvolvimento com o nematódeo *C. elegans*. Caracterizados como um grupo de pequenos RNAs não codificadores de proteínas, divergindo dos RNAs codificados no genoma humano, essa variedade de RNA vem se destacando pela grande habilidade de modular uma complexa e enorme rede regulatória de expressão dos genes (62,63). Sabe-se que, em geral, os miRNAs são sintetizados a partir de genes específicos ou de determinadas regiões gênicas não associadas à codificação de proteínas (ex.: introns) (64,65,66).

A biogênese dos miRNAs se dá por transcrição nuclear, com exportação para o citoplasma, seguida do processamento e da maturação (67,68). Inicia-se com a transcrição dos precursores de RNA pela RNA polimerase II, gerando os chamados miRNAs primários (pri-miRNAs). Os pri-miRNAs apresentam uma ou mais estruturas em forma de grampo (*hairpins*), também conhecidos com *stem-loop*. Sua extremidades 5' contem um 7-metilguanossina, enquanto a extremidade 3' é poliadenilada, formando caudas de tamanhos variados podendo ser compostas por mais de mil nucleotídeos. Sendo assim, a conformação do pri-miRNA é composta por dois segmentos de RNA, onde suas bases complementares estão pareadas, originando a região "*stem*" e as regiões não pareadas, devido aos pares de bases não serem complementares, formando então alças circulares, "*loops*" (69,70,71).

Ainda dentro do núcleo da célula, os pri-miRNAs são clivados na estrutura *hairpin* em seu arcabouço por um complexo enzimático chamado Drosha. Essa clivagem pela Drosha gera um molécula precursora do miRNA chamada de pre-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (72,73). A passagem do pre-miRNA do

núcleo para o citoplasma é feita graças à exportina-5 (Exp5), que é uma proteína transportadora que utiliza Ran-GTP como co-fator (74).

Já no citoplasma, essas pre-miRNAs são clivadas por uma enzima chamada Dicer (RNase III), removendo a alça na estrutura *stem-loop*, formando um RNA de fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos (75). Este dúplex de RNA se liga ao complexo de silenciamento induzido por RNA, a RISC (*RNA-induced silence complex*), que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Essa junção da fita dupla de RNA com o RISC faz com que haja a separação da fita dupla. Dessa forma, apenas uma destas fitas permanece ligada ao RISC constituindo o miRNA maduro, fazendo com que a outra fita complementar venha ser degradada (70,73,75).

A escolha entre as fitas que irá constituir o miRNA maduro parece ser feita com base na estabilidade termodinâmica da fita dupla, sendo escolhida a fita cuja extremidade 5' possuir menor estabilidade termodinâmica (72).

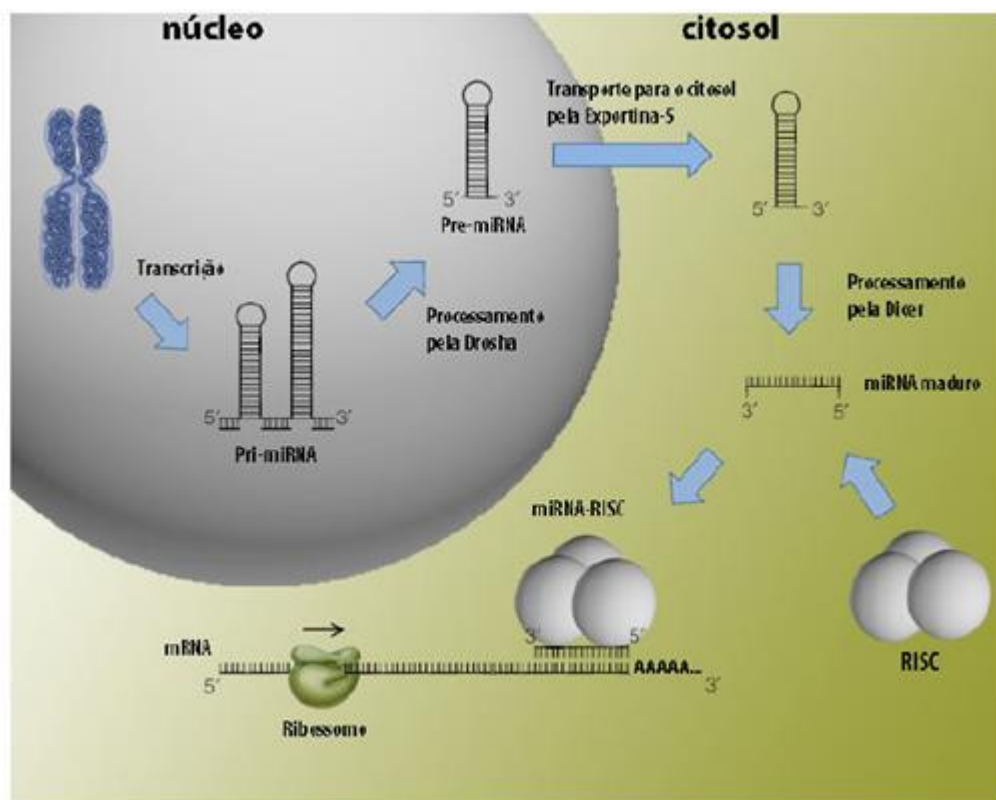


Figura 1 – Esquema representativo da biogênese dos microRNAs. mRNA - RNA mensageiro; miRNA - microRNA; RISC - Complexo de indução do silenciamento do RNA. Adaptado de Oliveira-Carvalho V e cols., Arq Bras Cardiol.2012;98(4):362-70.



## 2.2.2 Conceito, Características e Nomenclatura dos MicroRNAs

MicroRNAs atuam regulando diversas funções celulares, como a diferenciação tecidual, o ciclo celular, a proliferação e a apoptose (73), o que permite inferir que defeitos nesses sistemas estão relacionados a uma gama de doenças como câncer, alterações neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, problemas cardíacos entre outros (75,76).

Durante a última década, conhecimento substancial se acumulou sobre a biogênese de miRNAs, seus mecanismos moleculares e papéis funcionais em uma variedade de contextos celulares. Expressão alterada de determinados miRNAs nos tecidos cerebrais de pacientes com doenças neurodegenerativas, tais como DA e Parkinson, sugere que miRNAs poderiam ter um papel etiológico ou regulador fundamental nestes distúrbios. Além disso, evidências apontam para miRNAs específicos que visam a regulação da expressão de proteínas específicas que são fundamentais para a patogênese destas doenças (77).

Atualmente, sabe-se que os miRNAs são sintetizados a partir de genes específicos ou de determinados subprodutos da expressão codificantes de proteínas (ex.: íntrons excisados) (78). A maturação dos miRNAs envolve uma complexa via de processamento que se inicia no núcleo e se estende até o citoplasma celular (79).

Com o avanço sobre a descoberta das diversas formas de miRNAs existente desde 2000, foi criada um banco de dados chamada *The miRNA Registry*, tendo evoluído para o miRBase, o que conhecemos atualmente (80). Estão registrados nesta base de dados oficial de miRNA um total de 1881 precursores e 2588 maduros em *homo sapiens*. Por participar na etiopatogenia de vários distúrbios, miRNAs podem contribuir como ferramenta diagnóstica e de prognóstico clínico, abrindo novo caminho para terapêuticas na área médica (81,82). Um número de estudos revela que alguns miRNAs são diferencialmente expressos no cérebro humano e regulam a expressão de genes associados a perturbações neurodegenerativas específicas (83,84,85).

Os miRNAs validados e disponíveis no miRBase tem em sua nomenclatura três caracteres que indica o nome da espécie, como hsa-mir para *Homo sapiens*, dme-mir para a mosca *Drosophila melanogaster*, cel-mir para *Caenorhabditis*

*elegans*, dentre outras. Os miRNAs tem uma numeração que segue a ordem sequencial de sua caracterização e registro (80). Cada miRNA maduro terá em sua nomenclatura o prefixo “miR”, e o pre-miRNA terá o prefixo “mir”. Os miRNAs que diferem em apenas uma ou duas posições com relação a sequencias parálogas (sequencias distintas em um mesmo organismo, mas oriunda de uma mesma sequencia ancestral), tem adição de um sufixo designado por letra em sua nomenclatura oficial, a exemplo de hsa-miR-34a e hsa-miR-34b. Os miRNAs maduros mas provenientes de grampos diferentes recebem um complemento numérico ao seu nome, como sufixo, a exemplo de hsa-miR-16-1 e hsa-miR-16-2. Já aqueles miRNAs maduros provenientes do mesmo pre-miRNA recebem o sufixo 5p, apontando que o miRNA corresponde à fita da região 5’ do grampo, e o sufixo 3p corresponde a região 3’ do grampo (ex: miR-30-5p e miR-30-3p) (86).

Quando se conhecem os níveis de expressão relativas destes miRNAs vindo do mesmo pre-miRNA, há uma outra nomenclatura a ser utilizada. Após o nome é acrescentado um asterisco, indicando o miRNA expresso em níveis baixos em relação ao miRNA do braço oposto de um mesmo grampo. Já o miRNA que possui maiores níveis de expressão relativa, e que fará parte do complexo RISC, seguirá todas as regras referidas sem adição do asterisco, a exemplo dos miRNAs miR-181 e miR181\* (80).

### 2.3 MICRORNAS E DOENÇA DE ALZHEIMER

Até o momento, o diagnóstico de DA provável é essencialmente baseado em avaliações clínicas e neuropsicológicas (87). Técnicas de neuroimagem estrutural (MRI) e funcional (PET) assim como mensurações de níveis de A $\beta$ 42 e de da proteína Tau no líquido cefalorraquidiano (LCR) estão sendo desenvolvidas para apoio ao diagnóstico da DA, sem utilidade clínica atualmente (88,89). Em linha com o pensamento de que não há biomarcadores suficientemente confiáveis para auxiliar no diagnóstico da DA, miRNAs podem ser estudados enquanto ferramentas para rastreio, diagnóstico diferencial e acompanhamento da progressão da doença (90).

Em 2007, Lukiw e colaboradores usaram estudos de perfis de pequena escala para fornecer as primeiras pistas sobre mudanças de miRNA em DA (91). Desde então, vários grupos, incluindo o de Lukiw, têm realizado estudos genômicos em larga escala, demonstrando que os padrões de expressão de miRNA não são apenas no tecido cerebral mas também no líquido cefalorraquidiano e no plasma sanguíneo (91,92,93,94,95,96,97,98). Os dados de perfil mais recentes mostram que um subconjunto destes pequenos RNAs parece ser alterado de forma específica no cérebro com DA. Este padrão inclui microRNAs como miR-9, miR-15, miR-29, miR-101 e miR-106, miR-107, miR-146, miR-181, todos apontados independentemente por dois ou mais estudos. Curiosamente, vários desses candidatos podem desempenhar um papel direto na modulação da expressão de genes relacionados com a etiologia da DA (99).

Revisão sistemática por Ying e colaboradores constatou que há diferentes níveis de miRNAs em pacientes com DA e controles. Sete miRNAs (miR-29b, miR-181c, miR-15b, miR146a, miR-342-3p, miR-191-5p e let-7d-5p) apresentaram baixa expressão em mais de um estudo, enquanto quatro miRNAs (miR-9, miR-34a, miR-93 e miR-143) tiveram resultados discordantes entre os estudos (100).

## 2.4 MICRORNAS CIRCULANTES NO SANGUE

Os miRNAs circulantes têm demonstrado estabilidade no LCR e no sangue, provavelmente devido ao fato de poderem ser transportados por lipossomas ou lipoproteínas que impedem a sua degradação (101). Eles são considerados reprodutíveis e consistentes entre indivíduos da mesma espécie, podendo apresentar uma expressão alterada em certas doenças (102). Com isso, são os candidatos desejáveis a biomarcadores para doenças, como a DA. Pois permanecem estáveis por um tempo longo, mesmo sofrendo repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, seja plasma ou soro (103,104).

Neste sentido, estudo de Mitchell isolou uma fração de RNA de 18 a 24 nucleotídeos de uma amostra de plasma humano. Com uso das técnicas como RT-PCR e qRT-PCR, constatou-se a presença de miRNAs maduros (miR-15b, miR-16 e miR-24) no plasma humano. Em seguida, eles procuraram saber a estabilidade dos miRNAs no plasma, enquanto pré-requisito de grande valor para utilidade como um biomarcador. Verificou-se a estabilidade dos miRNAs por testes que consistiam em incubação prolongada à temperatura ambiente por 24 horas ou por vários processos de congelamento e descongelamento da amostra de plasma. Chegaram à conclusão que os miRNAs no plasma são bastante estáveis (103).

No trabalho pioneiro de Leidinger e seus colaboradores, foram identificados miRNAs em amostra de sangue de 48 pacientes com DA e 22 controles. Dentre os miRNAs analisados, o miR-30d-5p apresentou-se em concentração circulante aumentada, enquanto o miR-144-5p demonstrou concentração reduzida (105). Os miRNAs do sangue periférico total (não fracionado) são eleitos os biomarcadores ideais, pelo fato de terem um acesso fácil, sendo forma pouco invasiva e econômica de obtenção de material biológico. É por isso que há estudos explorando o valor prognóstico deste tipo de miRNAs para a DA (80,99,106,107,108,109).

### 3 JUSTIFICATIVA

Dentre os novos candidatos a fatores de risco para distúrbios crônicos associados ao envelhecimento, a recente compreensão de que a expressão de miRNAs interfere em praticamente todos os processos fisiológicos humanos têm tido destaque pelo envolvimento de cada um destes mediadores em uma multiplicidade de elementos genéticos (110) assim como pelo envolvimento com mecanismos neurodegenerativos de interesse para este estudo (77). Deste modo, é plausível que determinadas formas de miRs modulem a expressão de genes etiológicos para DA, influenciando assim no risco de desenvolvimento da demência a depender do padrão de expressão destes elementos.

Ademais, descobriu-se que miRs extracelulares circulam na corrente sanguínea, sendo notavelmente estáveis em termos de conformação e integridade molecular (111). Exocitados ativamente na forma de vesículas de origem endossomal, estes exossomas (como são denominados) constituem partículas de 30 a 100 nm de diâmetro com delimitação por uma bicamada lipídica com proteínas transmembrânicas e um núcleo hidrofílico contendo proteínas, mRNAs e miRNAs (112). Desta forma, exossomas podem atuar como vesículas extracelulares responsáveis por transportar miRNA de modo estável em uma grande variedade de fluidos biológicos, incluindo sangue total (113). Além disso, cabe recordar que o sangue total compartilha elementos figurados que atravessam a barreira hematoencefálica, contendo assim exemplares que circulam no tecido cerebral afetado pela DA, de modo a fornecer a melhor amostragem periférica (não invasiva) possível do que ocorre na neurodegeneração central.

Por se entender que a progressão dos distúrbios crônicos do envelhecimento possuem um importante contributo pela desregulação de miRNAs, nossa pesquisa consistirá na análise da expressão das formas dessas biomoléculas que são apontados pela literatura como as mais intimamente associadas com processos neurodegenerativos (92,93,95,99).

## 4 OBJETIVO

O objetivo central deste trabalho consiste em comparar variáveis discretas representativas da concentração sanguínea total de miRNAs selecionados por seu papel modulatório da expressão de genes associados à etiologia da doença, entre indivíduos portadores e não portadores de DA manifesta, com vistas à prospecção de marcadores moleculares que se associem com o fenótipo demencial.

### 4.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar e comparar a expressão das formas de miRNAs selecionadas para estudo entre as amostras portadora e não portadora de DA provável.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRA

Os participantes foram recrutados dentre pacientes atendidos no Centro de Medicina do Idoso (CMI) do Hospital Universitário de Brasília (HUB), afiliado à Universidade de Brasília, sendo um centro de referência local para atendimento médico de idosos, com ênfase no tratamento de distúrbios cognitivos.

Como idade, sexo e genótipo da apolipoproteína E (APOE) são os principais fatores de risco não modificáveis conhecidos pelo início da DA (114), recrutamos uma amostra de conveniência constituída exclusivamente por pacientes do sexo feminino com idade  $\geq 55$  anos e portadoras do alelo  $\epsilon 4$ . Como os participantes foram recrutados para estudos clínicos e moleculares anteriores (115,116,117), com seus genótipos de APOE determinados de acordo com uma técnica clássica (118) e disponível no banco de dados, foi possível a priori o recrutamento seletivo de portadores de  $\epsilon 4$  (homozigotos e heterozigotos). Além disso, a admissão precoce no centro (ocorrendo até 2012) permitiu que pacientes com demência fossem avaliados para conversão em outros diagnósticos de demência, enquanto pacientes cognitivamente intactos na linha de base foram monitorados para excluir a possibilidade de declínio cognitivo durante o período. Portanto, todos os casos de demência que não apresentaram conversão diagnóstica (e foram caracterizados como casos esporádicos e não familiares de início tardio sem sinais de um componente vascular associado) foram considerados elegíveis para constituir o grupo DA. Da mesma forma, apenas os pacientes do grupo controle que não apresentaram declínio clinicamente importante durante o período foram incluídos. Para esse fim, foram realizadas reavaliações clínicas pelo menos uma vez para cada paciente entre 36 e 60 meses após a avaliação cognitiva na admissão no centro.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sendo os experimentos conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes e seus cuidadores para posterior coleta de material biológico.

## 5.2 AVALIAÇÃO AMBULATORIAL

A avaliação clínica inicial e o acompanhamento clínico de todos os pacientes incluíram a administração do mini exame do estado mental (MEEM) para rastrear o comprometimento cognitivo (119). Os casos suspeitos foram investigados com base nos critérios da American Psychiatric Association (APA / DSM-IV) para confirmação da demência e da Escala de avaliação da doença de Alzheimer - subescala cognitiva (ADAS-Cog) para diagnóstico de Alzheimer provável (120). A gravidade da demência foi determinada usando a escala de classificação da demência clínica (CDR) (121).

Outras variáveis investigadas nessas avaliações incluíram hábitos de vida, presença de comorbidades (por exemplo, diabetes e hipertensão), condições médicas (por exemplo, obesidade e lesão cerebral traumática prévia), distúrbios psiquiátricos incidentais e prévios (por exemplo, doença de Parkinson, depressão) e medicamentos em uso.



### 5.3 SELEÇÃO DOS MICRORNAS

Para seleccionar o conjunto de miRNAs a serem investigados, pesquisamos o DIANA Tools (TarBase v7.0) por miRNAs validados experimentalmente como interagindo com genes-alvo ligados à neuropatologia da forma de início tardio da DA, concentrando-se nos genes que codificam proteínas-chave. Detalhado na revisão realizada por Moraes et al. (116), como se segue: a apolipoproteína E (ApoE), a proteína precursora de amilóide (APP), presenilinas 1 (Psen1) e 2 (Psen2), a proteína tau (MAPT), clusterina (Clu), a proteína de montagem de clatrina de ligação ao fosfatidilinositol (Picalm) e a enzima de clivagem APP do local  $\beta$  1 (Bace1).

Uma pesquisa manual foi realizada inserindo cada nome de gene individualmente e os hsa-miRNAs eram elegíveis para estudo se o banco de dados relatasse uma associação (resultado positivo) e tivesse o tecido de origem especificado. A partir da lista de miRNAs produzidos, uma análise posterior da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) permitiu restringir a seleção a 25 miRNAs com base na seleção de caminhos implicados na neurofisiologia.

#### 5.4 AMOSTRA SANGUÍNEA E EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Após o período mínimo de acompanhamento clínico de cada paciente, as amostras de sangue total foram coletadas por punção venosa em tubos de vacutainer contendo EDTA (Becton Dickinson - BD, Brasil). As contagens de glóbulos brancos (total e de subconjuntos comuns) foram determinadas por um procedimento automatizado, Cell-Dyn 3700 (Abbott®, EUA). Para proteção do RNA, as amostras foram fracionadas como alíquotas de 0,7 mL na presença de um volume igual de RNA Later (Thermo Fisher Scientific, EUA). Cada alíquota foi congelada imediatamente para a extração subsequente dos RNAs totais, purificados com o kit mirVANA PARIS (Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, com a modificação do uso de várias (2 ou 3) partições consecutivas do lisado com fenol-clorofórmio (Invitrogen, EUA), se necessário. Após a extração, a quantificação e a análise das amostras foram realizadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific™, EUA), com controle de qualidade realizado através da avaliação da razão OD de 260/280 nm. As amostras totais de RNA foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

## 5.5 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE MICRORNAS POR qRT-PCR

A análise da expressão dos miRNAs selecionados para o estudo foi realizada utilizando kit comercialmente disponível, utilizando ensaios de miRNA TaqMan® RT-qPCR em stem-loop para procedimentos quantitativos (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado para preparar o DNA complementar (cDNA). Nesse caso, cada reação continha 20 ng de RNA total, 12,5 nM de primers específicos para heptaplex stem-loop microRNA, dNTPs 2 mM, 100 U MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 5 U do inibidor de RNase em volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 30 min a 16°C, por 30 min a 42°C e 5 min a 85°C para inativação enzimática.

Quantidades relativas de miRNAs foram calculadas usando o método do limiar do ciclo comparativo (Ct). O nível total de cada miRNA foi avaliado por normalização para níveis de um *small nucleolar RNA 43* (RNU43), elegível com base em evidências anteriores de sua utilidade (um dos membros da família) para normalizar a expressão de miRNA em amostras de sangue (122), com sua concentração em nosso contexto. Avaliados quanto à estabilidade entre amostras através do método do limiar do ciclo comparativo ( $\Delta C_t$ ). Com essa abordagem, o RNU43 tornou-se adequado como referência (controle interno) e a quantificação relativa foi realizada usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (123). Para cada ensaio de quantificação relativa de miRNAs individuais, foram utilizados 0,75 µL de TaqMan MicroRNA Primer, 1,2 µL de cDNA (em diluições em série, conforme descrito mais adiante nesta seção), 7,5 µL 2× TaqMan Universal Mix Master PCR sem UNG e 5,55 µL de água livre de nuclease, no total de 15 µL de reações executadas usando o Eco™ Real-Time PCR System, versão 4.0 (Illumina®, San Diego, CA, EUA) com ciclagem a 50°C por 2 minutos, a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Todas as reações foram realizadas em duplicada, e os valores individuais do limite médio do ciclo (Ct) foram determinados para cada amostra. Os ciclos de miRNAs e da referência endógena de cada amostra foram configurados na mesma placa de reação para minimizar a variação entre ensaios.

A faixa dinâmica de cada ensaio foi determinada por reações de amplificação com o uso paralelo de diluições em série da mesma amostra, inicialmente em 3,33 ng /  $\mu$ L, com um conjunto mínimo de 3 amostras independentes, seguido por análise de regressão linear simples dos valores obtidos (123). Foram estabelecidos intervalos de proporcionalidade comparáveis entre os escores de Ct e os valores logarítmicos das concentrações dos modelos para cada miRNA e controle endógeno. Com base na faixa dinâmica, a eficiência da amplificação (E) de cada reação foi calculada usando a equação  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ .

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por análise exploratória para variáveis dependentes discretas. As comparações entre grupos de variáveis clínicas contínuas distribuídas normalmente foram realizadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes, enquanto o teste do qui-quadrado foi usado para comparar as frequências de condições médicas. Comparações de variáveis não normalmente distribuídas (incluindo níveis de miRNA circulantes) foram realizadas pelo teste de Wilcoxon (Mann-Whitney *U*). Além disso, regressões logísticas binárias foram usadas para avaliar o impacto da variável no *odds ratio* para DA. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo para essas análises.

Particularmente para análises não paramétricas que envolvem os dados de miRNA, um valor *P* bicaudal foi definido como significativo após a correção de Bonferroni para *k* variáveis independentes testadas em uma mesma característica ( $k = 25$  testes, depois  $\alpha = 0,002$ ). Todas as análises foram executadas no SPSS® for Windows®, versão 17.0.

## 6 RESULTADOS

Após a triagem para elegibilidade usando os registros médicos e de pesquisa de 614 pacientes, amostras de sangue total puderam ser obtidas de um total de 74 mulheres idosas (38 controles e 36 pacientes com provável DA), com exclusões e falhas de recrutamento, conforme mostrado na Figura 1, e dados biológicos, bem como características clínicas clássicas, foram comparados em uma avaliação inicial entre o grupo controle (pacientes sem demência) e o grupo DA.

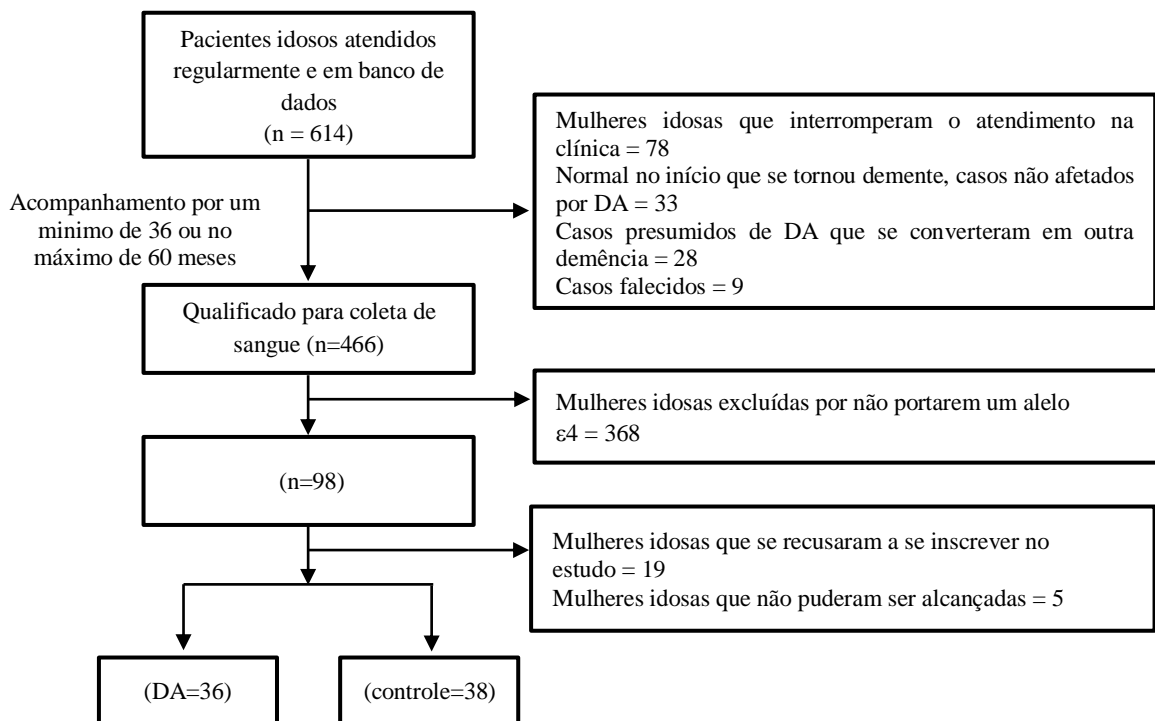


Figura 1. Composição da amostra de idosas consideradas para análise.

Os grupos não diferiram significativamente na idade ou em outras variáveis clínicas, incluindo contagens totais de glóbulos brancos (Tabela 1) e subpopulações clássicas de leucócitos (dados não mostrados). Como esperado, os escores do MEEM diferiram entre os dois grupos. Os grupos foram comparáveis em termos de anos de escolaridade. Além de todos os participantes serem portadores de  $\epsilon 4$ , a frequência dos genótipos  $\epsilon 2\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3\epsilon 4$  e  $\epsilon 4\epsilon 4$  foi avaliada e encontrada similarmente entre os grupos, com predominância do genótipo  $\epsilon 3\epsilon 4$ , conforme esperado. Os grupos também foram comparáveis na frequência de usuários de agentes

psicoativos (agrupados em antipsicóticos, antidepressivos e anticonvulsivantes), bem como em termos de usuários dos agentes metabólicos mais comuns (anti-hipertensivos e hipoglicêmicos).

**Tabela 1** - Comparação das variáveis contínuas (média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil) e variáveis categóricas (proporção (%)) entre mulheres idosas do grupo controle não demenciados e do grupo DA.

Variável	Controle (n = 38)	DA (n = 36)	P*
	Média (ou Mediana)	Média (ou Mediana)	
Idade (anos)	76.4 ± 9.2	79.5 ± 6.0	0.106
CC (cm)	93.7 ± 11.6	91.4 ± 12.2	0.411
PAS (mm Hg)	137.9 ± 18.3	131.8 ± 18.4	0.159
PAD (mm Hg)	80.9 ± 17.4	76.9 ± 10.1	0.235
MEEM (score)	24.0 (22.0–26.0)	12.0 (7.2–19.5)	< 0.001*
LEU (10 <sup>9</sup> /L)	6.4 (5.5–7.3)	6.7 (5.9–7.8)	0.435
	%	%	
Genótipo ε3ε4	66.6	86.8	0.115 <sup>§</sup>
≤ 4 anos escolaridade	42.1	61.1	0.216 <sup>§</sup>
CDR ≤ 2	-	33.3	-
Hachinski ≤ 4	-	86.1	-
Uso de			
Inibidor de AChE	-	52.8	-
Antagonista de rNMDA	-	19.4	-
Antipsicóticos	2.6	0.0	0.883 <sup>§</sup>
Antidepressivos	10.5	5.6	0.286 <sup>§</sup>
Anticonvulsivantes	0.0	2.6	0.796 <sup>§</sup>
Antihipertensivos	65.8	50.0	0.162 <sup>§</sup>
Antidiabéticos	21.0	13.9	0.322 <sup>§</sup>

DA= doença de Alzheimer; CC = circunferência de cintura; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; CDR = classificação clínica de demência; MMSE= mini exame do estado mental; Leu= Leucograma; AchE = acetilcolinesterase; rNMDA = receptor de N-metil D-aspartato.

\*Verificação de significância para o teste *t* de Student, \* Teste de Wilcoxon, <sup>§</sup> Teste do qui-quadrado.

Em seguida, avaliamos a concentração sanguínea total de miRNAs humanos submetidos a quantificação relativa (qRT-PCR) em pacientes controle e DA. Todos os 25 miRs alvo e o controle interno podem ser detectados nas amostras. As análises correlacionais não revelaram influência dos fatores de risco clássicos da DA em qualquer um dos miRNAs avaliados ao longo da idade (característica contínua) ou APOE (ε2ε4 / ε3ε4 vs. ε4ε4), independentemente de realizar análises de uma amostra inteira ou realizar cada grupo (DA ou controle) de cada vez. De todos os miRNAs avaliados, apenas a concentração de miR-9-5p diferiu entre os grupos (P = 0,001), com uma diminuição mediana de 3 vezes nos níveis circulantes em

pacientes com DA em comparação com os controles (Tabela 2). Foi observada uma tendência para uma diferença relevante (se considerado o limiar convencional de  $P < 0,05$ ), embora não atingisse significância de acordo com nossos padrões, para os níveis de miR-21-5p e miR-29b-3p. Análises subsequentes usando regressão binária garantiram os níveis de miR-9-5p como importantes responsáveis pelo fenótipo da DA, confirmando que mulheres mais velhas cognitivamente preservadas têm maior probabilidade de expressar níveis circulantes totais mais altos do microRNA (OR = 1,041; IC95% 1,003-1,080 ;  $P = 0,035$ ) na amostra, sem que essa contribuição ocorra a partir dos níveis de miR-21-5p ( $P = 0,520$ ) ou miR-29b-3p ( $P = 0,057$ ).

**Tabela 2** - Descrição da identificação de hsa-miRNA e níveis relativos entre idosas controle não demenciadas e DA.

Fita Alvo miR	Ordem de Grandeza	Controle (n = 38)	DA (n = 36)	P
miR-1-3p	$10^0$	2.90 [1.02, 14.50]	3.03 [1.33, 8.09]	0.875
miR-1-2-5p	$10^{-1}$	2.15 [0.89, 8.75]	1.16 [0.36, 3.61]	0.134
miR-9-5p	$10^1$	3.27 [1.84, 6.42]	1.02 [0.66, 2.76]	0.001
miR-16-2-3p	$10^{-1}$	7.70 [0.78, 70.08]	8.59 [1.66, 26.11]	0.990
miR-21-5p	$10^{-4}$	2.81 [1.02, 15.18]	1.47 [0.35, 3.48]	0.038
miR-27b-3p	$10^{-1}$	0.89 [0.46, 1.89]	0.66 [0.29, 1.35]	0.171
miR-29b-3p	$10^0$	0.31 [0.10, 0.63]	0.14 [0.06, 0.25]	0.014
miR-30a-3p	$10^0$	2.50 [0.52, 14.64]	2.32 [0.69, 4.44]	0.525
miR-34a-5p	$10^0$	1.80 [0.65, 4.66]	2.79 [0.69, 5.10]	0.650
miR-34c-5p	$10^{-1}$	0.66 [0.32, 1.37]	0.90 [0.36, 1.96]	0.320
miR-92a-3p	$10^{-5}$	0.86 [0.42, 1.58]	0.74 [0.34, 2.22]	0.791
miR-100-5p	$10^{-1}$	2.00 [0.21, 5.38]	1.00 [0.26, 6.20]	0.830
miR-126-3p	$10^{-4}$	1.32 [0.55, 2.60]	1.20 [0.45, 2.40]	0.873
miR-130a-3p	$10^{-3}$	2.84 [0.74, 7.62]	3.98 [0.76, 6.74]	0.697
miR-141-3p	$10^0$	1.67 [0.42, 4.46]	1.21 [0.29, 4.00]	0.673
miR-145-5p	$10^{-1}$	1.05 [0.39, 3.08]	0.72 [0.44, 1.89]	0.402
miR-146a-5p	$10^{-3}$	2.01 [0.67, 11.16]	1.62 [0.65, 2.72]	0.329
miR-155-5p	$10^{-2}$	7.53 [2.94, 22.36]	6.68 [3.37, 9.37]	0.530
miR-181a-5p	$10^{-3}$	1.88 [0.53, 4.07]	0.98 [0.49, 4.72]	0.424
miR-181c-5p	$10^0$	0.84 [0.34, 1.99]	0.80 [0.23, 1.54]	0.270
miR-183-5p	$10^{-3}$	1.05 [0.60, 5.12]	1.02 [0.42, 2.98]	0.364
miR-200a-3p	$10^0$	2.16 [0.82, 6.90]	1.75 [0.95, 3.49]	0.456
miR-221-3p	$10^{-2}$	1.12 [0.52, 2.90]	1.18 [0.52, 1.96]	0.615
miR-371-3p	$10^0$	0.98 [0.36, 2.20]	0.92 [0.38, 3.40]	0.858
miR-373-5p	$10^{-2}$	0.22 [0.14, 0.34]	0.20 [0.11, 0.27]	0.496

DA= doença de Alzheimer; hsa= *homo sapiens*. Os dados são expressos em valor mediano com intervalo interquartil para traços contínuos com distribuição não gaussiana. Os valores de P são resultados do teste de Wilcoxon.



## 7 DISCUSSÃO

O MiR-9 é um pequeno RNA não codificante envolvido na regulação da expressão de múltiplos genes (124). Apesar de possuir uma estrutura primária altamente conservada, os padrões de expressão do miR-9 não são iguais entre as diferentes espécies. Em *Drosophila sp.*, nos estágios embrionários iniciais, o miR-9 é expresso na maioria das células epiteliais, exceto no ectoderma ventral (125). Nos vertebrados, a expressão do miR-9 está confinada ao sistema nervoso, sugerindo funções neurogênicas e neurofisiológicas altamente especializadas (126). Em humanos, o miR-9 maduro consiste em 21 nucleotídeos que são processados por Dicer na extremidade 5' do pré-miR-9 (124). Uma função essencial do miR-9 é regular a diferenciação morfológica dos neurônios pós-mitóticos das células progenitoras neurais (127). A esse respeito, não é de surpreender que estudos sugeram que a desregulação do miR-9 possa desempenhar um papel nas doenças neurodegenerativas (128).

Na DA, sabe-se que o peptídeo  $\beta$ -amilóide em sua forma insolúvel de 42 aminoácidos (A $\beta$ 42) é produzido por clivagem enzimática seqüencial de APP por BACE1 e  $\gamma$ -secretase (129), gerando assim uma via amiloidogênica. As evidências sugerem que o miR-9 pode desempenhar um papel na regulação negativa da BACE1 (130). Níveis mais baixos de miR-9 podem aumentar a expressão de BACE1, aumentando assim a produção de A $\beta$ 42 (131). Portanto, a regulação negativa da expressão de miR-9 no sistema nervoso central (SNC) pode ter implicações patológicas pela promoção do processamento amiloidogênico, levando à agregação pronunciada de A $\beta$ 42 e deposição em placas senis (132).

Na mesma linha, um estudo usando o ensaio de luciferase em células HEK293 mostrou que a supressão do miR-9 aumenta os níveis de tau fosforilada (p-tau) e a amiloidogênese pela superexpressão da proteína quinase 2 dependente de cálcio / calmodulina (CAMKK2), um alvo do miR -9 (133,134). Outro alvo do miR-9 é o gene que codifica a sirtuína 1 (SIRT1), uma enzima desacetilase que interage com a tau e regula sua fosforilação (135,136). Estudos sugerem que o SIRT1 desempenha um papel na proteção neuronal em pacientes com DA (137), uma vez que a expressão regular do SIRT1 impede a hiperfosforilação da tau, mantendo o transporte axonal de neurotransmissores pelos neurônios.

Além de evidências de que o miR-9 desempenha um papel em diferentes estágios da neurogênese e neurofisiologia, sua participação em processos como apoptose, inflamação e estresse oxidativo parece consistente (127,131). Em vista do envolvimento desses fatores no desenvolvimento da DA, os autores não descartam a participação do miR-9 em outras vias que contribuem para essa forma de neurodegeneração.

Vários estudos demonstraram que a expressão do miR-9 é alterada no cérebro da DA (138), sendo regulada para baixo ou para cima. Em pacientes com DA, há evidências de níveis reduzidos de miR-9 no córtex temporal anterior, juntamente com superexpressão no hipocampo (128,131). Um estudo comparando APP23 transgênico com camundongos não transgênicos relatou níveis reduzidos de miR-9 no hipocampo (139). Em amostras de cérebro derivadas de autópsia, 4 miRNAs (incluindo miR-9) foram regulados negativamente em pacientes com DA (140). Níveis desse mesmo miRNA foram comparados no soro de pacientes com DA, com comprometimento cognitivo leve (MCI) e controle, com níveis circulantes reduzidos do miR-9 sendo encontrados entre os pacientes com DA (136). Outro estudo independente determinou a concentração de 6 miRNAs (incluindo miR-9) no plasma sanguíneo e no LCR de pacientes com e sem DA, e mais uma vez o miR-9 foi encontrado em níveis mais baixos entre os pacientes com DA (141).

Em suma, e apesar de indescritível que uma descoberta da circulação seja extrapolada para um meio especializado como o SNC, o conjunto de evidências revisado acima aponta para uma redução geral na concentração de miR-9 em amostras biológicas humanas tão diversas quanto tecido cerebral, LCR, plasma e soro no contexto da DA. No nosso caso, os resultados sugerem que a concentração de miR-9 também é alterada no meio do sangue total, apoiando a hipótese de que o miR-9 pode constituir um biomarcador acessível para a DA. Os resultados do nosso são corroborados por outro ensaio de expressão de miRNA realizado com sangue total, mostrando também uma diminuição na concentração periférica do has-miR-9-5p nos casos de DA (142). Demonstrando que essa associação persiste mesmo quando a amostra subconjuntos estão em jogo (como as portadoras  $\geq 4$  em média > 75 anos mais velhas consideradas aqui), nosso trabalho tende a contribuir com a pesquisa translacional e a literatura sobre biomarcadores, expandindo o repertório de possíveis elementos de diagnóstico de DA, ferramentas e fontes biológicas,

forneendo evidências possivelmente reduzidas em vieses devido à idade, sexo e genótipo APOE, como principais fatores de risco não modificáveis para DA. Da mesma forma, os grupos apresentaram um equilíbrio razoável na contagem de indivíduos que usavam medicamentos de ação metabólica (antidiabéticos e anti-hipertensivos) e sob farmacoterapia psicoativa (antipsicóticos, antidepressivos ou anticonvulsivantes), tornando improvável que os resultados fossem altamente influenciados pelos efeitos desnivelados de medicamentos comuns entre os grupos. Sobre o consumo de inibidores da acetilcolinesterase e de antagonistas do receptor NMDA exclusivamente por pacientes com DA (como esperado), os autores afirmam com o máximo de seu conhecimento, não conhecendo nenhum efeito dessas classes na transcrição ou processamento do miR-9.

Apesar de padronizar os participantes em termos de fatores de risco não modificáveis relevantes para a DA, nosso estudo tem limitações. Primeiro, nenhum cálculo de potência foi realizado para estimar um tamanho de amostra pequeno ideal, o que poderia ser processado como uma falha. Segundo, nem a extraordinária mistura genética da população brasileira, nem o hábito alimentar e as características hematológicas profundas desses pacientes foram considerados ou controlados em nossas análises. Pelo menos, as contagens totais e diferenciais de glóbulos brancos foram determinadas e provaram-se inalteradas entre os participantes, o que pode evitar suspeitas de que os níveis de miR sejam influenciados pela flutuação nos elementos nucleados transmitidos pelo sangue.

Outra limitação inerente a esse tipo de estudo é a dificuldade em relacionar os achados em amostras de sangue periférico a processos fisiopatológicos em órgãos / tecidos ou compartimentos corporais específicos, como é o caso do SNC. Nesse contexto, a barreira hematoencefálica é uma estrutura formada por células endoteliais alinhadas com capilares que permitem a passagem seletiva de substâncias, controlando particularmente a entrada de substâncias tóxicas (143). Entretanto, as microvesículas contendo miRNAs (exossomos) são conhecidas por atravessarem a barreira hematoencefálica do cérebro para o sangue e vice-versa por mecanismos ainda desconhecidos (144,145,146). Portanto, é plausível que os níveis biodisponíveis de miR-9 no sangue reflitam proporções do mesmo mediador no nível do sistema nervoso central.

## 8 CONCLUSÃO

É evidente que ainda é necessário muito trabalho para elucidar e determinar os vários papéis que um determinado miRNA pode desempenhar nas vias patológicas e na identificação de condições médicas. No entanto, concluímos que os níveis de miR-9-5p no sangue total estão diminuídos em pacientes com DA em comparação com os controles. Estudos clínicos subsequentes podem confirmar o valor preditivo desse biomarcador candidato e se estratégias para a manutenção dos níveis de expressão do miR-9 podem atrasar aspectos relacionados à neurofisiologia e até à sintomatologia da DA.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
2. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 2006;15(spec1):R17-29.
3. Zhou X, Zuo Z, Zhou F, Zhao W, Sakaguchi Y, Suzuki T, Cheng H, Zhou R. Profiling sex-specific piRNAs in zebrafish. *Genetics*. 2010;186(4):1175-85.
4. Chang TC, Mendell JT. MicroRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007;8:215-39.
5. Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396-400.
6. Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Chezzi L, Cioffi SM, Arighi A, Fumagalli G, Scarpini E. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* : 2014;42(4):1261–1267.
7. Veras R. Population aging today: demands, challenges and innovations. *Rev Saúde Pública* 2009;43(3):548-54
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira (2012). Rio de Janeiro: IBGE.
9. Relatório 2012: Demência - uma prioridade de saúde pública. [acessado em 8 mar 2017]. Disponível em: <http://www.alz.co.uk/WHO-dementia-report>
10. Lopes MA, Bottino C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2002;60(1):61-9.
11. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).
12. Povova J, Ambroz P, Bar M, Pavukova V, Sery O, Tomaskova H, Janout V. Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156(2):108-14.

13. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. Neurology in Clinical Practice. 4th Edition. Butterworth-Heinemann; Massachusetts: 2004.
14. Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. JAMA 1997;227(10):813-7.
15. Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2002;16(2):103-8.
16. Herrera E Jr, Caramelli P, Nitrini R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo, Brasil. Arch clin psychiatry (São Paulo, Impr). 1998;25(2):70-3.
17. Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. Neurology. 1998;51(Suppl1):S2-17; discussion S65-7.
18. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease A review of 17 epidemiologic studies. Neurology. 1996;47(2):425-32.
19. Askin-Edgas S, Whiti KE, Cummings JL. Aspectos neuropsiquiátricos da doença de Alzheimer e de outras demências. In: Neuropsiquiatria e neurociência na prática clínica. 4ª edição. São Paulo: Editora Artemd. 785-786, 2006.
20. Nee LE, Eldridge R, Sunderland T, Thomas CB, Katz D, Thompson KE, Weingartner H, Weiss H, Julian C, Cohen R. Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs. Neurology. 1987;37(3):359-63.
21. Green RC. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. JAMA. 2002;287(3):329.
22. Almeida OP. Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel? Rev. Assoc. Med. Bras. 1997;43(1):77-81.
23. Alzheimer A. A peculiar disease of the cerebral cortex. Allgemeine Zeitschrift. 1907;64:146-48.
24. Verhey FR. Alois Alzheimer (1864-1915). J Neurol. 2009;256(3):502-3.

25. About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson). *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1987;1(1):3-8.
26. Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie.* 1911;4(1):356-85.
27. Burns AS, Levy R. *Clinical diversity in late onset Alzheimer's disease*: Oxford University Press, USA; 1992.
28. Förstl H, Burns A, Cairns N, Luthert P, Levy R. Basal ganglia mineralization in Alzheimer's disease: a comparative study of clinical, neuroradiological and neuropathological findings. *Behav Neurol.* 1992;5(1):53-7.
29. Förstl H, Burns A, Levy R, Cairns N, Luthert P, Lantos P. Neuropathological correlates of behavioural disturbance in confirmed Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry.* 1993;163:364-8.
30. Pearson RC, Powell TP. The neuroanatomy of Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 1989;2(2):101-22.
31. Zhao Q, Tang XC. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur J Pharmacol.* 2002;455(2-3):101-7.
32. Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 2001;73(5):873-86.
33. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001;81(2):741-66.
34. Sereniki A, Vital MABF. Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features. *Rev. psiquiatr. Rio Gd.* 2008;30(1 suppl).
35. Ghosh AK, Brindisi M, Tang J. Developing  $\beta$ -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012;120 Suppl 1:71-83.
36. Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, Schwile P, Schulz JB, Schroeder C, Simons M, Jennings G, Knölker HJ, Simons K. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase by membrane targeting. *Science.* 2008;320(5875):520-3.
37. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6.

38. Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci*. 2004;11(5):456-67.
39. McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1991;30(2):156-65.
40. Bartus RT, Emerich DF. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *JAMA*. 1999;282(23):2208-9.
41. Malamud N. Neuropathology of organic brain syndromes associated with aging. In: Gaitz CM, editor. *Aging and the brain*. New York: Plenum Press; 1972. p. 63-87.
42. Fridman C, Gregorio SP, Dias Neto E, Ojopi ÉPB. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*. 2004;31(1):19-25.
43. Gandy S. The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1121-9.
44. St George-Hyslop P, McLachlan DC, Tsuda T, Rogaev E, Karlinsky H, Lippa CF, Pollen D. Alzheimer's disease and possible gene interaction. *Science*. 1994;263:537.
45. Theuns J, Marjaux E, Vandenbulcke M, Van Laere K, Kumar-Singh S, Bormans G, Brouwers N, Van den Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, De Strooper B, Van Broeckhoven C, Vandenberghe R. Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Human mutation*. 2006;27(9):888-96.
46. NCBI. National Center for Biotechnology Information. SNP – Single Nucleotide Polymorphism. [acessado em 8 mar 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/351>
47. Goate A, Chartier-Harlin M-C. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349(6311):704.
48. Wakutani Y, Watanabe K, Adachi Y, Wada-Isoe K, Urakami K, Ninomiya H, Saido TC, Hashimoto T, Iwatsubo T, Nakashima K. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*. 2004;75(7):1039-42.



- 49.** Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus for  $\beta$ -amyloid. *Nature Genet.* 1992;1(5):345-7
- 50.** Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nature Neuroscience.* 2001;4(9):887-93.
- 51.** Rogaeva E. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine.* 2002;2(1):1-10.
- 52.** Wattamwar PR, Mathuranath P. An overview of biomarkers in Alzheimer's disease. *Annals of Indian Academy of Neurology.* 2010;13(6):116.
- 53.** Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(6):1449-57.
- 54.** Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92(26):12260-4.
- 55.** Alves L, Correia ASA, Miguel R, Alegria P, Bugalho P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. *Frontiers in neurology.* 2012;3:63.
- 56.** Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2007;68(4):613-8.
- 57.** Mahley RW, Rall Jr SC. Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and Human genetics.* 2000;1(1):507-37.
- 58.** Tan L, Yu JT, Zhang W, Wu ZC, Zhang Q, Liu QY, Wang W, Wang HF, Ma XY, Cui WZ. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. *Alzheimer's & Dementia.* 2013;9(5):546-53.
- 59.** Morgan K. The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathology and applied neurobiology.* 2011;37(4):353-7.
- 60.** Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.

- 61.** Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62
- 62.** Lee, RC; Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-64.
- 63.** Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
- 64.** Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5b): 1811-19.
- 65.** Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs – micro in size but macro in function. *FEBS Journal*. 2008;275(20): 4929-44.
- 66.** Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;59(5):725-37.
- 67.** Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 2004;23(20):4051-60.
- 68.** Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
- 69.** Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
- 70.** Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
- 71.** Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *Journal of internal medicine*. 2008;263(4):366-75.
- 72.** Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(2):126-39.
- 73.** Bushati N, Cohen SM. microRNA Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205.

- 74.** Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutics potential of RNA interference, microRNA and antagomirs. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008;117(1):94-104.
- 75.** Amaral BA, Nonaka CFW, Freitas RA, Souza LB, Pinto LP. MicroRNAs: biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontologia Clínica-Científica (Online)*. 2010;9(2):105-09.
- 76.** Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal*. 2010;31(6):659-66.
- 77.** Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;133(2):142–50.
- 78.** Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*. 2004;14(10A):1902-10.
- 79.** Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. Exercício físico e microRNAs: novas fronteiras na insuficiência cardíaca. *Arq. Bras. Cardiol*. 2012;98(5): 459-66.
- 80.** Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic acids research*. 2004;32(suppl1):D109-D11.
- 81.** Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science*. 2005;96(2):111-5.
- 82.** Brase JC, Johannes M, Scholomm T. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International journal of cancer*. 2011;128(3):608-16.
- 83.** Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(12), 837–41.
- 84.** Provost P. MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation. Alzheimer's and prion diseases. *Brain Research*. 2010;1338, 58–66.
- 85.** Sonntag, KC. MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain Research*. 2010;1338, 48–57.

- 86.** Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006;34(suppl1):D140-D4.
- 87.** Frota NAF, Nitrini R, Damasceno B, Forlenza O, Dias-Tosta E, Silva AB, Herrera EJ, Magaldi RM. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement neuropsychol*. 2011;5(supl 1).
- 88.** Jack CR, Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2013;80(6):1347-58.
- 89.** Femminella GD, Edison P. Evaluation of neuroprotective effect of glucagon-like peptide 1 analogs using neuroimaging. *Alzheimer's & Dementia*. 2014;10(1):S55-S61.
- 90.** Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers Physiology*. 2015;6:40.
- 91.** Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*. 2007;18(3):297–300.
- 92.** Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, Kelnar K, Kempainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *Journal Alzheimers Disease*. 2008;14(1):27–41.
- 93.** Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(17):6415-20.
- 94.** Nelson PT, Wang W-X. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *Journal Alzheimer's Disease*. 2010;21(1):75–9.
- 95.** Nunez-Iglesias J, Liu C-C, Morgan TE, Finch CE, Zhou XJ. Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One*. 2010; 5(2):e8898.
- 96.** Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regulation and Systems Biology*. 2007;1:263–74.

- 97.** Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator 3. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2010;36(4):320–30.
- 98.** Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I, Nelson PT. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(5):1213–23.
- 99.** Delay C, Mandemakers W, Hébert SS. MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 2012;46(2):285–90.
- 100.** Wu HZY, Ong KL, Seeher K, Armstrong NJ, Thalamuthu A, Brodaty H, Sachdev P, Mather K. Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: a systematic review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;49(3):755-66.
- 101.** Dorval V, Nelson PT, Hébert SS. Circulating microRNAs in Alzheimer's disease: the search for novel biomarkers. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2013;6:24.
- 102.** Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*. 2008;18(10): 997-1006.
- 103.** Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(30):10513-18.
- 104.** Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*. 2011;39:7223-33.
- 105.** Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biology*. 2013;14(7):R78.

- 106.** Zafari S, Backes C, Meese E, Keller A. Circulating biomarker panels in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 2015;61(6):497-503.
- 107.** Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Kirby J, Shaw PJ. Neuronal dark matter: The emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Frontier Cell Neuroscience*. 2013;7,178.
- 108.** Lau P, Frigerio CS, De Strooper B. Variance in the identification of microRNAs deregulated in Alzheimer's disease and possible role of lincRNAs in the pathology: the need of larger datasets. *Ageing Research Reviews*. 2014;17:43-53.
- 109.** Danborg PB, Simonsen AH, Waldemar G, Heegaard NH. The potential of microRNAs as biofluid markers of neurodegenerative diseases—a systematic review. *Biomarkers*. 2014;19(4):259-68.
- 110.** Jin Jung HJ, Suh Y. MicroRNA in Aging: From Discovery to Biology. *Current genomics*. 2012;13(7):548-57.
- 111.** Tijssen AJ, Pinto YM, Creemers EE. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012;303(9):H1085-95.
- 112.** Fang DY, King HW, Li JY, Gleadle JM. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology*. 2013;18(1):1-10.
- 113.** Ciesla M, Skrzypek K,; Kozakowska M, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2011;401(7):2051-61.
- 114.** Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:134-147.
- 115.** Benedet AL, Moraes CF, Camargos EF, Oliveira LF, Souza VC, Lins TC, Henriques AD, Carmo DGS, Machado-Silva W, Araújo CN, Córdova C Pereira RW, Nóbrega OT. Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012;33(5):311-317.
- 116.** Moraes CF, Lins TC, Carmargos EF, Naves JO, Pereira RW, Nobrega OT. Lessons from genome-wide association studies findings in Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*. 2012;12(1):62-73.
- 117.** Quintas JL, Souza VC, Henriques AD, et al. Lack of association between apolipoprotein E genotypes and cognitive performance in the non-demented elderly. *Psychogeriatrics*. 2014;14(1):11-16.

- 118.** Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimaki T, Pulkki K, Kairisto V. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis. *Clin Chem.* 1999;45(1):143-146.
- 119.** Nitrini R, Caramelli P, Bottino CMC, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: avaliação cognitiva e funcional. *Arq neuropsiquiatr.* 2005;63(3-A):720-727.
- 120.** Nitrini R, Caramelli P, Bottino CMC, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: critérios diagnósticos e exames complementares. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(3-A):713-719.
- 121.** Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43(11):2412-2414.
- 122.** Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee MLT, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3(11):e3694.
- 123.** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
- 124.** Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ, Lu X, Gross N, Kulesz-Martin M, Wang D, Lu SL. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2012;48(1):73-78.
- 125.** Li Y, Wang F, Lee JA, Gao FB. MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2006;20(20):2793-2805.
- 126.** Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell.* 2005;123(6):1133-1146.
- 127.** Yuva-Aydemir Y, Simkin A, Gascon E, Gao FB. MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biol.* 2011;8(4):557-564.
- 128.** Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport.* 2007;18(3):297-300.

- 129.** Gupta P, Bhattacharjee S, Sharma AR, Sharma G, Lee S, Chakraborty C. miRNAs in Alzheimer Disease—A Therapeutic Perspective. *Current Alzheimer Research*. 2017;14(11):1198-1206.
- 130.** Holohan KN, Lahiri DK, Schneider BP, Foroud T, Saykin AJ. Functional microRNAs in Alzheimer's disease and cancer: differential regulation of common mechanisms and pathways. *Front Genet*. 2012;3:323.
- 131.** Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(17):6415-6420.
- 132.** Miya Shaik M, Tamargo IA, Abubakar MB, Kamal MA, Greig NH, Gan SH. The Role of microRNAs in Alzheimer's Disease and Their Therapeutic Potentials. *Genes (Basel)*. 2018;9(4).
- 133.** Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron*. 2013;78(1):94-108.
- 134.** Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2011;118(4):460-474.
- 135.** Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol*. 2015;6:40.
- 136.** Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental neurology*. 2012;235(2):491-496.
- 137.** Julien C, Tremblay C, Emond V, Lebbadi M, Salem Jr N, Bennett DA, Calon F. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(1):48-58.
- 138.** Delay C, Mandemakers W, Hebert SS. MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2012;46(2):285-290.
- 139.** Schonrock N, Ke YD, Humphreys D, Staufenbiel M, Ittner LM, Preiss T, Götz J. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta. *PLoS One*. 2010;5(6):e11070.



- 140.** Geekiyanage H, Chan C. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid beta, novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011;31(41):14820-14830.
- 141.** Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(2):253-259.
- 142.** Yilmaz SG, Erdal ME, Ozge AA, Sungur MA. Can Peripheral MicroRNA Expression Data Serve as Epigenomic (Upstream) Biomarkers of Alzheimer's Disease? *OMICS.* 2016;20(8):456-461.
- 143.** Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):26-32.
- 144.** Pusic AD, Pusic KM, Kraig RP. What are exosomes and how can they be used in multiple sclerosis therapy? *Expert Rev Neurother.* 2014;14(4):353-355.
- 145.** Wang Q, Li P, Li A, Jiang W, Wang H, Wang J, Xie K. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2012;31(1):97.
- 146.** Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011;19(10):1769-1779

## ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores potenciais para distúrbios crônicos do envelhecimento humano: microRNAs circulantes e teciduais.

**Pesquisador:** Otávio de Tolêdo Nóbrega

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);

**Versão:** 1

**CAAE:** 42256214.4.3001.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.072.651

**Data da Relatoria:** 20/05/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de estudo de microRNAs em sangue periférico de pacientes idosos de vários grupos avaliados prospectivamente em Brasília com participação do Banco de Encéfalos e da Urologia FMUSP.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Identificar marcadores prognósticos por biologia molecular de sangue periférico de pacientes geriátricos com diversas síndromes clínicas.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco muito baixo, coleta única de pouco material(30ml)de população em acompanhamento ambulatorial.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um projeto multicêntrico, chefiada por pesquisador da UNB, e que será executado com materiais de várias frentes incluindo dois grupos da FMUSP que anuem com o projeto. O projeto foi avaliado e aprovado pela CE FM UNB, dentro da plataforma Brasil.

<b>Endereço:</b> DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	
<b>Bairro:</b> PACAEMBU	<b>CEP:</b> 01.246-903
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO
<b>Telefone:</b> (11)3893-4401	<b>E-mail:</b> cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.072.651

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os TCLE são regionalizados e o acompanhamento dos pacientes de responsabilidade das unidades específicas, que são usualmente de cobertura SUS. Não há comentários inadequados e a leitura é fluida em geral, já que cada instituição corre com o seu TCLE. Há um pedido de dispensa de termo de assentimento para falecidos com material estocado, o que é interessante, mas há também um termo de assentimento para familiares.

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SAO PAULO, 21 de Maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**Roger Chammas**  
**(Coordenador)**

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - HUB**  
**CENTRO DE MEDICINA DO IDOSO - CMI**



### **tecnologia e atenção à saúde aplicadas ao estudo dos determinantes genômicos dos transtornos demenciais**

O envelhecimento pode ocasionar doenças ou o agravamento de suas manifestações no organismo, diminuindo a qualidade de vida da pessoa. Por isso, nós do Centro de Medicina do Idoso do Hospital Universitário de Brasília (HUB), em conjunto com pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB), estamos trabalhando na busca por sinais clínicos e de laboratório que permitam prevenir o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas relacionadas à perda de memória e das funções mentais.

Assim sendo, com o objetivo de encontrar características do organismo que possam contribuir para o diagnóstico precoce de doenças como a demência de Alzheimer, necessitamos do seu consentimento para a realização de uma avaliação médica e de exames laboratoriais por testes genéticos. Esta pesquisa poderá possibilitar uma melhoria da compreensão do processo de envelhecimento do ser humano, o que por sua vez permitirá melhorar o atendimento e o aconselhamento prestados a pessoas idosas assistidas tanto pelos programas públicos e quanto privados de saúde.

Dependendo dos resultados e de sua avaliação, o(a) senhor(a) poderá ser incluído(a) no grupo de portadores ou não-portadores de alguma doença.

### **Termo de consentimento**

Ao aceitar participar desta pesquisa, fui informado que poderei a qualquer momento recusar-me a continuar, retirando meu consentimento sem sofrer qualquer penalização. Fui informado que o protocolo experimental consistirá basicamente em uma avaliação médica e por exames laboratoriais, e que tais procedimentos não comprometerão minhas atividades cotidianas. Responderei algumas perguntas sobre os medicamentos que estou usando e como faço o tratamento recomendado, mas terei plena liberdade de me recusar a responder caso eu não queira. Fui informado(a) ainda que este trabalho não oferecerá riscos expressivos à minha saúde, já que não realizarei movimentos anormais, não terei mudança da minha rotina, não entrarei em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terei qualquer instrumento introduzido em meu corpo, a não ser por ocasião de uma coleta de sangue, onde me foi assegurada utilização de agulhas descartáveis. A equipe do projeto se responsabilizou por prestar esclarecimentos a mim a qualquer momento da pesquisa, inclusive relativos a exames de laboratório realizados, disponibilizando para tanto as formas de contato presentes no rodapé desta página.

O pesquisador garantiu sigilo sobre minha identidade pois os dados ficarão sob sua guarda, não sendo permitido acesso por pessoas não relacionadas à pesquisa, sendo ainda a melhor conduta para preservação da minha integridade física. O pesquisador responsabilizou-se por qualquer dano que eu venha a sofrer, e também explicou que as amostras coletadas poderão ser armazenadas para outras pesquisas, mas que serei contatado para conceder minha autorização para cada nova utilização.

Assim, por meio deste documento, dou meu consentimento à exploração dos dados coletados por este projeto de pesquisa, do qual participarei voluntariamente.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Nome do paciente

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do responsável ou do paciente

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do profissional que prestou informações