

Gabriel Ginani Ferreira

Análise de microRNAs séricos em pacientes diagnosticados com Transtorno comportamental do sono REM - estudo de métodos de purificação e quantificação por RT-qPCR e expressão relativa de miR-7 e miR-19b

Brasília, 2025

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

Gabriel Ginani Ferreira

Análise de microRNAs séricos em pacientes diagnosticados com Transtorno comportamental do sono REM - estudo de métodos de purificação e quantificação por RT-qPCR e expressão relativa de miR-7 e miR-19b

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida

Brasília, 2025

Gabriel Ginani Ferreira

Análise de microRNAs séricos em pacientes diagnosticados com Transtorno comportamental do sono REM - estudo de métodos de purificação e quantificação por RT-qPCR e expressão relativa de miR-7 e miR-19b

Aprovado em 27 de fevereiro de 2025

Banca Examinadora

Ricardo Titze de Almeida – Presidente
Universidade de Brasília

Felipe von Glehn Silva – Membro Interno à UnB
Universidade de Brasília

Fernando Francisco Borges Resende – Membro Externo à UnB
Centro Universitário Planalto Central Aparecido dos Santos

Raimundo Nonato Delgado Rodrigues – Membro Externo à UnB
Unidade do Sono de Brasília

Fabiano José Ferreira de Sant'Ana - Suplente
Universidade de Brasília

Dedico esse trabalho aos meus avôs, José de Abreu Ferreira (in memoriam), Selma Dangelo, Francisco Floripe Ginani e Ianis Cortez Ginani, pelos ensinamentos de vida e incentivo aos estudos e aprimoramento.

AGRADECIMENTOS

A jornada de formação de um cientista é árdua e cheia de obstáculos, e a obtenção do título de doutorado é um passo importante nessa trajetória. O esforço dedicado pelo próprio doutorando jamais deve ser menosprezado; entretanto, essa é uma conquista partilhada com todos aqueles que estiveram ao lado durante o processo, criando as condições necessárias para que o resultado final fosse alcançado. Por isso, no presente trabalho, agradeço a:

À minha família, em especial a: meus pais, Verônica Cortez Ginani, que, por exemplo, me mostrou como um pesquisador sério deve se portar, e Claudio José Dangelo Ferreira, que me ensinou sobre ética no trabalho e comprometimento; meu irmão, João Pedro Ginani Ferreira, sempre disposto a escutar minhas infundadas reclamações sobre as barreiras encontradas na pesquisa; e minha querida esposa, Samara Mendes de Almeida, que foi minha companheira indispensável para vencer os desafios encontrados durante o percurso.

Ao meu orientador, professor Ricardo Titze de Almeida, e a toda a equipe do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, por prover as condições necessárias para que a pesquisa aqui apresentada pudesse ser desenvolvida.

Aos amigos que vivenciaram comigo essa fase, sempre perguntando como estava a pesquisa e quando tudo iria terminar, em especial Gabriel Dias Dória e Elias Couto e Almeida Júnior, entre tantos outros.

Ao Laboratório Sabin de Análises Clínicas, por ter concordado em auxiliar o projeto realizando as coletas de material, à Unidade de Sono de Brasília, por ter auxiliado no recrutamento de pacientes para participar da pesquisa, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro que possibilitou a realização da pesquisa.

A todos os professores e mestres, incluindo especialmente aqueles que, infelizmente, faleceram, como meu antigo orientador de mestrado, professor Riccardo Pratesi, todos os quais foram fundamentais para edificar as bases de todo o meu conhecimento científico, que culmina neste trabalho.

Em suma, a todos aqueles que me ajudaram durante a trajetória deste projeto de doutorado, agora finalizado.

“Se vi mais longe, foi porque estava sobre o ombro de gigantes”.

-Sir Isaac Newton, 1676

RESUMO

A descoberta de moléculas com expressão alterada no sangue periférico de pacientes diagnosticados com distúrbios neurodegenerativos é um tema relevante na neurologia, tanto para fins diagnósticos quanto para o prognóstico clínico. Esse conceito se aplica ao Transtorno Comportamental do Sono REM isolado definido clinicamente (TCSREMi), um distúrbio caracterizado pela perda da atonia muscular durante o sono, levando à encenação de sonhos, o que pode evoluir para outras neuropatologias. A caracterização de moléculas com expressão aberrante contribuirá para a melhor compreensão dessa doença, além de auxiliar na identificação de indivíduos com risco de conversão fenotípica de TCSREMi para sinucleinopatias, como a Doença de Parkinson, a demência por corpos de Lewy e a atrofia de múltiplos sistemas.

Entre os possíveis biomarcadores sanguíneos do TCSREMi, destacam-se os microRNAs, que são RNAs não codificantes que regulam o conteúdo de RNAs mensageiros em nível pós-transcricional. Contudo, a detecção precisa de microRNAs, especialmente os de baixa abundância, requer ensaios científicos cuidadosamente padronizados para purificar os RNAs de outros constituintes do soro e para quantificar os alvos de interesse por RT-qPCR.

O presente estudo comparou duas metodologias de purificação de RNAs e duas metodologias de RT-qPCR voltadas à quantificação de microRNAs relevantes na neurobiologia e em exames moleculares do TCSREMi, definido clinicamente: miR-7 e miR-19b. Foram utilizados dois grupos experimentais: indivíduos diagnosticados com TCSREMi e indivíduos controles saudáveis. Inicialmente, verificou-se que a purificação de RNAs pela metodologia que utiliza tiocianato de guanidina (Kit miRNeasy Serum Plasma Advanced, Qiagen, método 1) apresenta rendimento significativamente superior à metodologia convencional que utiliza separação de fases aquosa e orgânica por fenol-clorofórmio (miRNeasy Serum Plasma, Qiagen, método 2). Os métodos de purificação 1 e 2 renderam, respectivamente, 1,46 ng/μL e 0,75 ng/μL ($P < 0,05$) no grupo com TCSREMi.

Quanto às metodologias de RT-qPCR, ambas utilizaram o sistema TaqMan e foram executadas com kits comerciais (*Applied Biosystems*), sendo as reações calibradas pelo controle endógeno miR-21 e pelo controle exógeno spike-in miR-39 de *C. elegans*. Foram comparados dois sistemas de RT-qPCR: o método denominado tradicional, que utiliza transcrição reversa

alvo-específica, e o método que realiza uma pré-amplificação dos transcritos de RNA, denominado sistema *Advanced*, conforme a nomenclatura do kit comercial. O sistema *Advanced* apresentou resultados superiores para miR-7, com valores de Ct (*Threshold cycle*) abaixo de 30, enquanto no sistema tradicional os valores de Ct ficaram próximos de 35, valor considerado limitante para a precisão do qPCR. As expressões de miR-7 e miR-19b foram significativamente maiores no grupo TCSREMi em comparação ao grupo controle, com valores de acurácia (área sob a curva, AUC) de AUC = 0,93 (P = 0,0176) e AUC = 0,89 (P = 0,025), respectivamente, conforme determinado pela metodologia da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*). A análise combinada de miR-7 e miR-19b, como assinatura de microRNAs, também mostrou acurácia satisfatória (AUC = 0,86, P = 0,0374).

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que é crucial e viável aprimorar as etapas de purificação e RT-qPCR para melhorar a qualidade da quantificação de microRNAs no soro de indivíduos com TCSREMi. A metodologia de purificação com tiocianato de guanidina apresentou rendimento superior na extração de RNAs presentes no soro, assim como o sistema de amplificação '*Advanced*' permitiu a obtenção de Ct adequados, especialmente para microRNAs menos abundantes, como o miR-7. Os dois alvos estudados, miR-7 e miR-19b, isoladamente ou em conjunto, calibrados por miR-21 e cel-miR-39, demonstraram expressão diferenciada de microRNAs em indivíduos com TCSREMi em comparação aos indivíduos controle. Testes subsequentes em uma nova coorte, com maior número de indivíduos, devem ser conduzidos para validar essa assinatura promissora de microRNAs, com o objetivo de identificar indivíduos com expressão diferenciada de microRNAs no TCSREMi. Além disso, esses novos testes também irão avaliar se miR-7 e miR-19b podem servir como biomarcadores precisos para a fenotipagem de TCSREMi em distúrbios neurodegenerativos, como a Doença de Parkinson, a demência por corpos de Lewy e a Atrofia de múltiplos sistemas.

Palavras-chave: Transtorno comportamental do sono REM (TCSREMi), Doença de Parkinson, microRNA, biomarcador, RT-qPCR, miR-7, miR-19b.

ABSTRACT

The discovery of molecules with altered expression in the peripheral blood of patients diagnosed with neurodegenerative disorders is a relevant topic in neurology, both for diagnostic and clinical prognostic purposes. This concept applies to clinically defined Isolated REM Sleep Behavior Disorder (iRBD), a disorder characterized by the loss of muscle atonia during sleep, leading to dream enactment, which can progress to other neuropathologies. Characterizing molecules with aberrant expression will contribute to a better understanding of this disease, as well as assist in identifying individuals at risk of phenotypic conversion from iRBD to synucleinopathies, such as Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy.

Among the possible blood biomarkers for iRBD, microRNAs stand out. These are non-coding RNAs that regulate the content of messenger RNAs at the post-transcriptional level. However, the accurate detection of microRNAs, especially those with low abundance, requires carefully standardized scientific assays to purify the RNAs from other serum components and to quantify the target molecules using RT-qPCR.

This study compared two RNA purification methodologies and two RT-qPCR methodologies aimed at quantifying microRNAs relevant to neurobiology and molecular testing of iRBD, clinically defined: miR-7 and miR-19b. Two experimental groups were used: individuals diagnosed with iRBD and healthy control individuals. Initially, it was found that RNA purification using the methodology that employs guanidine thiocyanate (miRNeasy Serum Plasma Advanced Kit, Qiagen, method 1) provided a significantly higher yield compared to the conventional method that uses phase separation with phenol-chloroform (miRNeasy Serum Plasma, Qiagen, method 2). The purification methods 1 and 2 yielded 1.46 ng/ μ L and 0.75 ng/ μ L ($P < 0.05$), respectively, in the iRBD group.

Regarding the RT-qPCR methodologies, both used the TaqMan system and were performed with commercial kits (Applied Biosystems), with reactions calibrated by the endogenous control miR-21 and the exogenous spike-in control miR-39 from *C. elegans*. Two RT-qPCR systems were compared: the so-called traditional method, which uses target-specific reverse transcription, and the method that performs pre-amplification of RNA transcripts,

referred to as the Advanced system, as per the commercial kit nomenclature. The Advanced system showed superior results for miR-7, with Ct (Threshold cycle) values below 30, while the traditional system showed Ct values close to 35, which is considered a limiting value for qPCR precision. The expressions of miR-7 and miR-19b were significantly higher in the iRBD group compared to the control group, with accuracy values (area under the curve, AUC) of $AUC = 0.93$ ($P = 0.0176$) and $AUC = 0.89$ ($P = 0.025$), respectively, as determined by the ROC curve methodology (Receiver Operating Characteristics). The combined analysis of miR-7 and miR-19b as a microRNA signature also showed satisfactory accuracy ($AUC = 0.86$, $P = 0.0374$).

In conclusion, our study demonstrated that it is crucial and feasible to enhance the purification and RT-qPCR steps to improve the quality of microRNA quantification in the serum of individuals with iRBD. The guanidine thiocyanate purification methodology provided a higher yield of RNAs present in the serum, and the 'Advanced' amplification system allowed for the acquisition of appropriate Ct values, especially for less abundant microRNAs like miR-7. The two targets studied, miR-7 and miR-19b, either separately or together, calibrated by miR-21 and cel-miR-39, demonstrated differentiated microRNA expression in individuals with iRBD compared to control individuals. Subsequent testing in a new cohort with a larger number of individuals should be conducted to validate this promising microRNA signature, aiming to identify individuals with differentiated microRNA expression in iRBD. Furthermore, these new tests will also evaluate whether miR-7 and miR-19b can serve as precise biomarkers for the phenoconversion of iRBD into neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy.

Keywords: Clinically isolated REM Sleep behavior disorder, Parkinson's disease, microRNA, biomarker, RT-qPCR, miR-7, miR-19b.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha temporal das manifestações da doença de Parkinson e seus estágios clínicos (Hoehn & Yahr) e patológicos (Braak).....	17
Figura 2. Biogênese e mecanismo de atuação dos miRNAs.....	20
Figura 3. Fluxo dos experimentos.....	37
Figura 4. Rendimento da purificação de RNA extraído utilizando os kits de extração miRNeasy Serum/Plasma e miRNeasy Serum/Plasma Advanced.....	40
Figura 5. Comparação de Cts produzidos pelos diferentes sistemas de qPCR.....	44
Figura 6. Valores de Ct de miR-7.....	45
Figura 7. Comparação da expressão relativa de miR-7 entre o grupo com TCSREMi e controles sadios.....	46
Figura 8. Valores de Ct de miR-19b.....	47
Figura 9. Comparação da expressão relativa de miR-19b entre os grupos Controle sadio e TCSREMi +/-.....	48
Figura 10. Comparativo entre os grupos experimentais usando a expressão relativa combinada dos alvos miR-7 e miR-19b.....	49
Figura 11. Análise do alvo miR-7 usando a metodologia da Curva ROC.....	50
Figura 12. Análise do alvo miR-19b usando a metodologia da Curva ROC.....	51
Figura 13. Análise combinada dos alvos miR-7 e miR-19b usando a metodologia da Curva ROC.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos grupos de pacientes e controle sadio.....	25
Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo.....	25
Tabela 3. Composição da solução mestre usada nas reações de RT-PCR.....	29
Tabela 4. Programação de ciclos na reação de Transcrição Reversa.....	29
Tabela 5. Primers e sequências maduras de cada alvo usado nas reações de qPCR.....	30
Tabela 6. Composição da solução mestra usada nas reações de qPCR.....	30
Tabela 7. Programação de ciclos para reação de qPCR.....	31
Tabela 8. Composição da solução mestre usada nas reações de adição da cauda Poli-A.....	32
Tabela 9. Condições experimentais para a adição da cauda poli-A.....	32
Tabela 10. Composição da solução mestre usada nas reações de adição do adaptador.....	33
Tabela 11. Condições experimentais para a adição do adaptador.....	33
Tabela 12. Composição da solução mestre usada nas reações de transcrição reversa.....	34
Tabela 13. Condições experimentais para transcrição reversa.....	34
Tabela 14. Composição da solução mestre usada nas reações de miR-Amp.....	35
Tabela 15. Condições experimentais para reação de miR-Amp.....	35
Tabela 16. Composição da solução mestre usada nas reações de qPCR.....	36
Tabela 17. Condições experimentais para qPCR.....	36
Tabela 18. Resultados das extrações.....	40
Tabela 19. Dados comparativos entre as metodologias de qPCR.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO – Proteína Argonauta
AUC – Area under the curve
CT – Ciclo de quantificação
DCL – Demência por corpos de Lewy
DGCR8 – Di George Critical Region 8, Proteína nuclear
DP – Doença de Parkinson
HUB – Hospital Universitário de Brasília
iRBD - Clinically isolated REM Sleep behavior disorder
miRNA – MicroRNA
mRNA – RNA Mensageiro
MSA – Atrofia de múltiplos sistemas
PACT – Proteína de ligação
RNA – Ácido ribonucléico
RNAi – Interferência de RNA
RT – Transcrição reversa
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TCSREMi – Transtorno comportamental do sono REM isolado, definido clinicamente
UFC – Universidade Federal do Ceará
UnB – Universidade de Brasília
USB – Unidade do Sono de Brasília
UTR – Untranslated region

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Material e métodos.....	25
3.1 Indivíduos.....	25
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	25
3.3 Coleta de amostras.....	26
3.4 Purificação de RNA de amostras de soro.....	26
(i) miRNeasy Serum/Plasma.....	26
(ii) miRNeasy Serum/Plasma Advanced.....	27
3.5 Quantificação de RNAs extraídos e armazenamento.....	28
3.6 Quantificação de microRNAs alvos via RT-PCR.....	28
(i) qPCR tradicional.....	28
(ii) qPCR com pré-amplificação ou “Advanced”.....	31
a) Adição da cauda poli-A.....	31
b) Adição do adaptador.....	32
c) Reação de transcrição reversa.....	33
d) Reação de miR-Amp.....	34
e) Reação de qPCR.....	35
3.7 Análise estatística.....	37
3.8 Comitê de ética.....	37
3.9 Delineamento experimental.....	37
4. Resultados.....	38
4.1 Purificação de RNA.....	38
4.2 qPCR tradicional versus qPCR com pré-amplificação.....	41
4.3 Dados tratados de qPCR.....	44
4.4 Curva ROC.....	49
5. Discussão.....	52
6. Conclusões.....	59
7. Referências bibliográficas.....	61
8. Apêndice.....	69

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional observado na população humana, de maneira geral, cria um novo paradoxo na Saúde Pública: como garantir a qualidade de vida dos indivíduos à medida que o tempo de vida desses mesmos indivíduos se alonga (1). O cenário global mostra que, de forma concomitante ao aumento da expectativa de vida, há um aumento nos quadros patológicos crônicos relacionados à idade avançada, fato que gera grande interesse no estudo dessas patologias (2).

O estudo global denominado "Carga Global de Doença" (em inglês, "Global Burden of Disease") identificou que as doenças neurológicas são a maior causa de deficiências, sendo que os casos de Doença de Parkinson (DP), em particular, têm aumentado de forma constante mundialmente (3).

A Doença de Parkinson é a segunda condição neurodegenerativa mais comum no mundo, o que desperta notório interesse em seu estudo (4). Trata-se de uma patologia complexa e com diagnóstico desafiador por diversos fatores, como a sobreposição de sintomas com outras doenças, além do tempo necessário para identificar os sinais clássicos da doença (5). A formação e o acúmulo das estruturas celulares denominadas Corpos de Lewy são elementos-chave da patologia da Doença de Parkinson (DP). Braak e colaboradores propuseram modelos para a progressão da patologia, mas ainda não existe um modelo definitivo para sua evolução, sendo que, nos últimos anos, foram propostos modelos de propagação semelhantes aos dos príons (6,7).

Em razão desse longo tempo para alcançar um diagnóstico, juntamente com a complexidade dos sintomas e falta de um modelo definitivo para a progressão patológica, existe um grande interesse no estudo de biomarcadores para a DP, que poderiam tornar o diagnóstico da doença mais objetivo e célere (8). Além disso, marcadores da fase prodrômica da Doença de Parkinson (DP), que se estende por um longo período anterior aos sinais clássicos da doença, são uma possível via para investigação, tanto para formas de diagnóstico quanto para o desenvolvimento da doença em si (5).

De forma convencional, podemos definir que a Doença de Parkinson (DP) se manifesta clinicamente quando diversos sintomas motores aparecem, em particular os tremores de

repouso, rigidez e bradicinesia (4). Nesse estágio, a doença já avançou consideravelmente no sistema nervoso do paciente, e cerca de 50% dos neurônios localizados na região da substância nigra já foram perdidos. Portanto, estratégias terapêuticas poderiam ser mais eficazes se fossem implementadas em um momento anterior ao dos sinais motores, durante a fase prodromal da doença (9).

Entre os diversos sintomas prodromais, que, portanto, precedem a Doença de Parkinson (DP) manifesta, estão certos distúrbios do sono. Tais parassonias aparecem como sinais que normalmente se manifestam cerca de 10 anos antes da fenoc conversão em DP em proporção significativa dos pacientes, como pode ser visto na figura 1. Portanto, constituem-se em biomarcadores de fenoc conversão importantes (10).

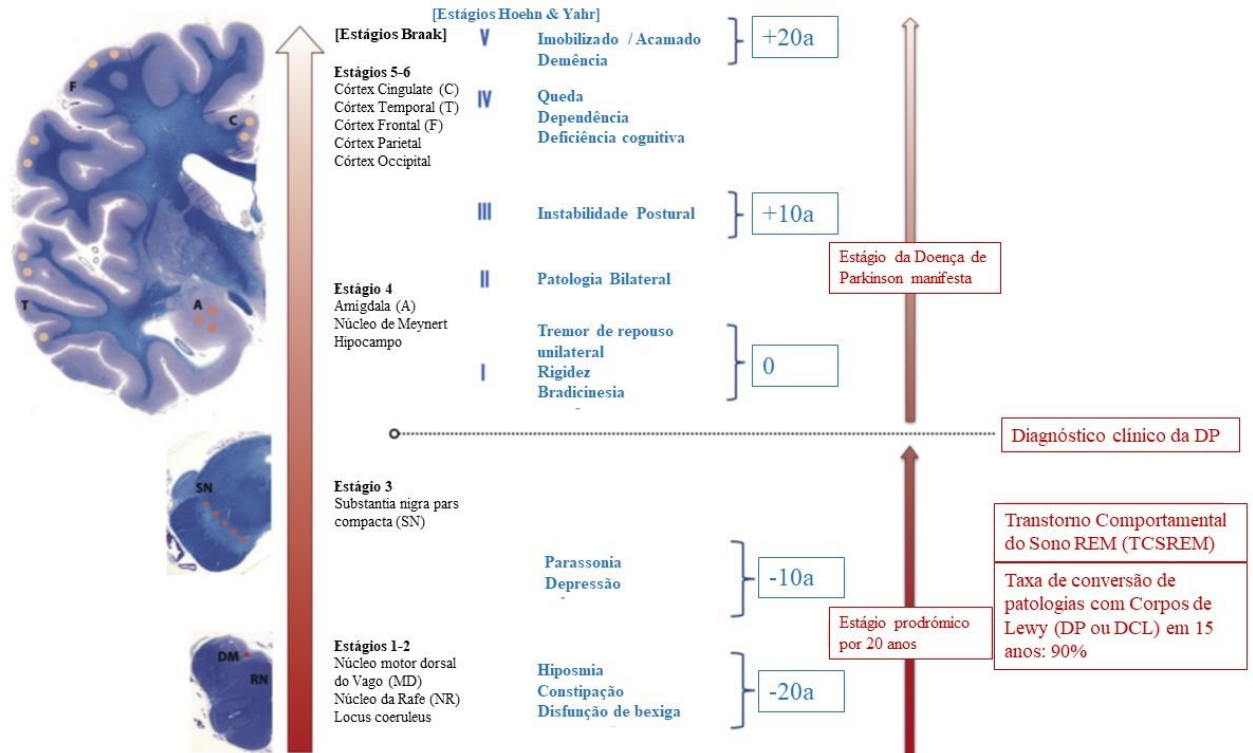


Figura 1. Linha temporal das manifestações da doença de Parkinson e seus estágios clínicos (Hoehn & Yahr) e patológicos (Braak) (11,12). A doença começa na fase pré-motora ou prodômica, nos estágios de Braak 1 e 2. Ela passa pelo início de mudanças motoras muito sutis (Braak 3) até mudanças motoras manifestas (Braak 4) e também ilustra o estágio avançado, quando há um nível mais alto de comprometimento funcional e cognitivo (assim como problemas de marcha e equilíbrio), que se correlacionam com os corpos de Lewy distribuídos difusamente no córtex cerebral. Um foco particular é dado à fase pré-motora e ao distúrbio comportamental do sono REM, intimamente relacionado à alfa-sinucleinopatia nos núcleos pontinos, como o locus subcoeruleus (núcleo sublateralodorsal), núcleos gigantocelulares, paragigantocelulares e núcleos do Rafe dorsal. Para simplificação, colocamos os sinais motores da DP que possibilitam o diagnóstico clínico ligeiramente acima do início do Estágio 3 de Braak, quando os neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN) começam a ser afetados. Devemos enfatizar que há um longo período até que cerca de 50% dos neurônios nigrais sejam perdidos. Além disso, o Estágio 4 de Braak também está implicado na fase inicial da disfunção motora (13). NR: núcleos da rafe; MD: núcleo motor dorsal do nervo vago; A: amígdala; T: lobo temporal; C: córtex cingulado; SN: substância negra; F: córtex frontal. Reimpresso com permissão e adaptado da referência ["(10)"]

No final da década de 1980, Carlos H. Schenck, após anos atendendo diversos pacientes com parassonias, descreveu a condição chamada Transtorno Comportamental do Sono REM isolado (TCSREMi), onde pacientes apresentavam comportamento onírico e perda de atonia durante o sono REM (14). Após aprofundar o estudo dessa parassonia, foi estabelecida uma forte correlação entre ela e a Doença de Parkinson (DP), gerando grande interesse em investigar essa condição como um marcador prodromal da doença de Parkinson (14,15).

Desde a descoberta da fase REM do sono, em 1953, por Aserinsky e Kleitman, sabemos que o sono é composto por duas fases distintas: o sono REM e o sono não-REM. Embora a relação exata entre esses dois estágios ainda não seja completamente elucidada, assim como a necessidade fisiológica do sono e os motivos pelos quais ele precisa ser dividido nessas duas fases, a descoberta das fases do sono abriu portas para a descrição das patologias relacionadas a ele (16,17).

O TCSREMi é caracterizado por alterações na fase REM do sono, mais especificamente pela perda de atonia da musculatura esquelética durante o sono REM, levando ao comportamento de encenação de sonhos e/ou pesadelos (18–20). Esse padrão diferenciado de comportamento durante o sono REM foi inicialmente descrito por Jouvett em gatos com lesões cerebrais, em 1965 (21,22). Posteriormente, em humanos, autores descreveram condição semelhante em pacientes em abstinência alcoólica, usando o termo “Estágio I-REM com eletromiografia tônica” (23).

Além da associação com o parkinsonismo, o grupo de Schenck estabeleceu a relação desse transtorno com diversas outras doenças neurológicas, como a narcolepsia (14) e a atrofia de múltiplos sistemas (MSA) (24). A prevalência do TCSREMi em pacientes com DP é relativamente alta, variando entre 15% e 40% nos estudos de triagem, e naqueles que utilizaram polissonografia, a prevalência é ainda maior, de 50% (25). Tal achado corrobora a observação de que existe uma grande associação entre o TCSREMi e doenças relacionadas ao depósito de alfa-sinucleína, como DP, MSA e a demência por corpos de Lewy (DCL) (19,23,26).

Pacientes com associação entre DP e TCSREMi apresentam uma forma clínica mais grave de DP (POSTUMA et al., 2008), sugerindo que o TCSREMi atua como um fator de risco ou marcador para uma doença com maior gravidade de sintomas motores (27). Observa-se, ainda, uma maior prevalência de “freezing”, maior frequência de sintomas autonômicos, como hipotensão ortostática, e ocorrência mais precoce de demência em indivíduos com TCSREMi

e DP. Assim, o TCSREMi parece estar associado a um fenótipo da DP com maior gravidade de sintomas motores e não motores.

Como já foi dito anteriormente, distúrbios do sono estão entre os sinais presentes no estágio prodrômico da DP, logo estudos que abordam a relação entre o TCSREMi e sinucleinopatias são extremamente relevantes, uma vez que o primeiro pode fazer parte do estágio prodrômico de doenças degenerativas; o pródromo de DP é considerado uma fase crítica para o uso de estratégias neuroprotetoras no futuro, o que seria fundamental para desacelerar a evolução da doença e assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes (28,29).

Já existe um alto grau de degeneração no sistema nervoso central de pacientes que apresentam os sinais clínicos da DP, portanto, o diagnóstico precoce de DP pode ser um marco importante para o teste de diversos fármacos no futuro, podendo diminuir vieses na interpretação de resultados (30,31), além de ser importante para melhor orientação dos pacientes quanto a terapias não farmacológicas (ex.: exercício físico) (30–34).

Com o objetivo de auxiliar o estudo do estágio prodrômico de doenças degenerativas, o Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica tem desenvolvido métodos moleculares para auxiliar o diagnóstico dessas doenças. Os microRNAs (miRNAs) se mostraram candidatos promissores como moléculas biomarcadoras não invasivas, pois são detectáveis no sangue periférico e suas alterações podem refletir alterações fisiológicas e patologias em curso (35,36). Portanto, são úteis para os testes que relacionam essas patologias às suas alterações fisiológicas.

Os miRNAs, descritos inicialmente pelo grupo coordenado por Ambros et al. em 1993, ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2024, são fragmentos pequenos de RNA de fita dupla (18 a 24 pares de bases) que regulam a expressão de RNAs mensageiros (mRNA) via interferência de RNA (RNAi) (37). A atuação dessas moléculas nas células depende de diversas proteínas acessórias, entre elas Drosha, DGCR8, Dicer e Argonauta-2, que participam do processo que leva o miRNA maduro a se ligar na região 3' UTR (Untranslated Region) do mRNA alvo, processo que pode ser visto em mais detalhes na figura 2 (38). Os miRNAs regulam a expressão gênica de centenas de alvos, e sua expressão aberrante desempenha um papel crítico no desenvolvimento de patologias (39,40).

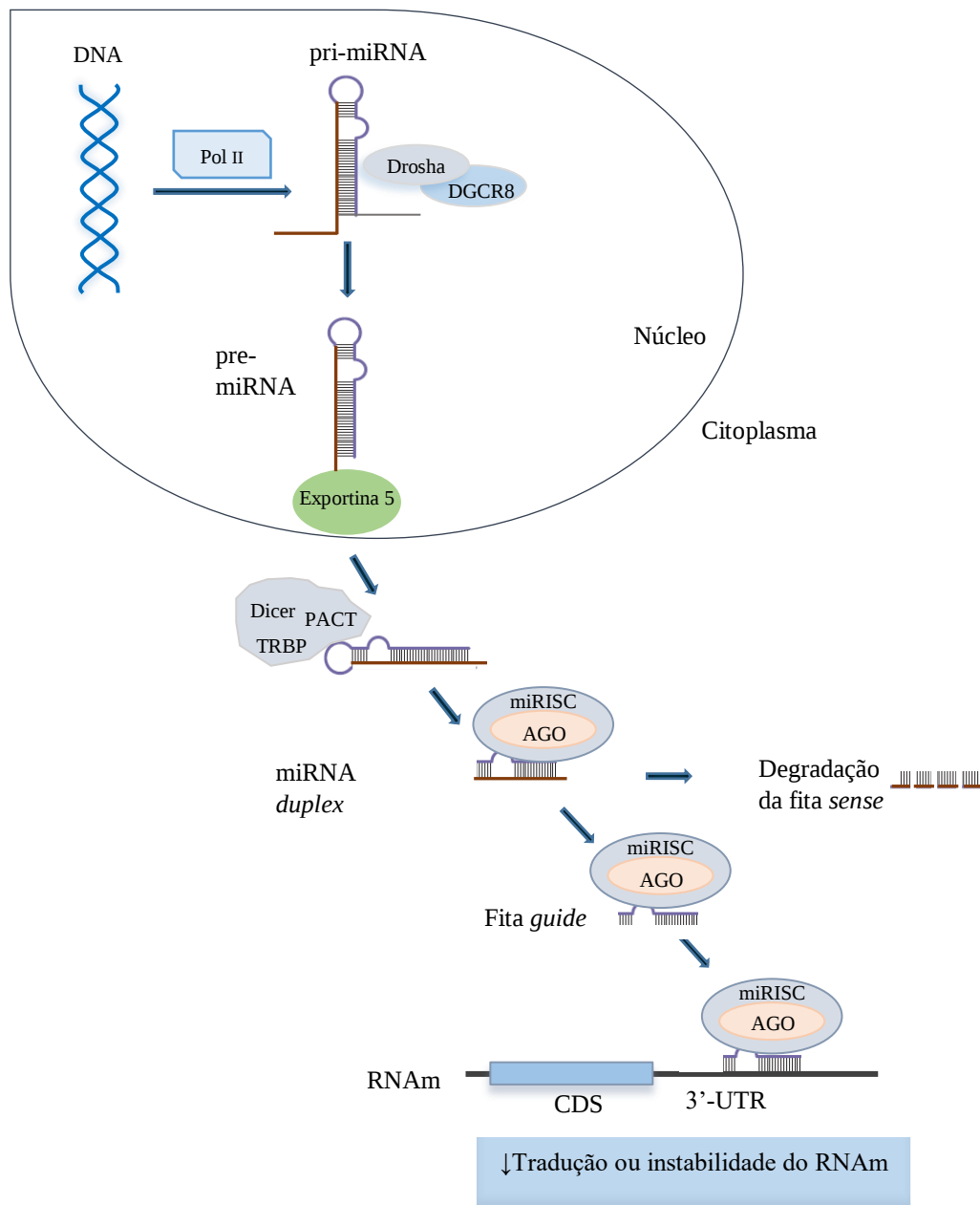


Figura 2. Biogênese e mecanismo de atuação dos miRNAs. A síntese dos microRNAs primários (pri-miRNA) começa no núcleo celular, sendo mediada pela RNA polimerase II. O pri-miRNA passa por um processamento no núcleo mediado pelo complexo Drosha/DGR8, resultando na formação dos pre-miRNAs. Em seguida, a proteína exportina 5 transporta os pre-miRNAs para o citoplasma, onde eles são clivados pela Dicer, gerando os microRNAs maduros (miRNA duplex). O complexo RISC se associa ao miRNA duplex, removendo a fita sense e orientando a fita *guide* para o RNA mensageiro alvo. Nesse estágio, o miRNA de fita simples se liga parcialmente à região 3'-UTR do RNAm por meio de pontes de hidrogênio, o que resulta na diminuição da tradução ou estabilidade do RNA mensageiro. Este processo é conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (Adaptado de Titze-de-Almeida et al., 2018) (41).

Como estratégia para possibilitar o diagnóstico ou mesmo como elemento para confirmá-lo, a pesquisa de marcadores moleculares não invasivos é prioritária dentro da neurologia, com atenção diferenciada de instituições como a Michael J. Fox Foundation. Em associação com manifestações do estágio prodrômico, como o TCSREMI, esses marcadores são muito promissores. Um exemplo de projeto bem-sucedido utilizando essa estratégia é o projeto PPMI “Parkinson Progression Marker Initiative” (<https://www.michaeljfox.org/ppmi-clinical-study>).

Por haver diversos trabalhos que buscaram alvos e, posteriormente, validaram os resultados por qPCR, especialmente oriundos dos grupos do Prof. Alex Iranzo e Rubén Fernandez-Santiago, na Espanha, e do Prof. Epaminondas Doxakis, da Grécia, o presente trabalho se concentrou em testar os alvos descobertos e não testados por qPCR dentro da população brasileira. Cabe ressaltar que, mesmo nesses estudos de descoberta de novos alvos, os autores optaram por incluir alvos já descritos anteriormente em outros trabalhos (42–44).

O grupo localizado na Espanha realizou vários estudos sobre a relação dos miRNAs e doenças neurodegenerativas. Em 2014, Botta-Orfila e colaboradores analisaram um conjunto de 377 miRNAs no sangue de 95 pacientes com doença de Parkinson idiopática, 30 pacientes de Parkinson com uma mutação no LRRK2 e 95 controles sadios utilizando ferramentas baseadas em qPCR, identificando 3 alvos expressos diferencialmente em pacientes com DP, miR-29c, miR-19a e miR-19b. Esses miRNAs, em especial miR-19a e miR-19b, mostraram-se associados a diversos alvos de interesse para o mecanismo da doença, como mTOR e vias de projeção neural (45). Posteriormente, em 2015, Fernandez-Santiago e colaboradores publicaram um trabalho que avaliou esses alvos em pacientes com TCSREMI antes e depois da conversão para DP. Esses pacientes foram observados por um período de cerca de 10 anos e foi verificado que a expressão de miR-19b se encontrava alterada em pacientes após a conversão em uma sinucleinopatia, DP ou demência com corpos de Lewy, o que reiterou a importância de miR-19b como um alvo para estudo (46). O grupo continuou com estudos sobre a expressão alterada de miRNAs em pacientes com TCSREMI, gerando em 2022 nova publicação que identificou 12 alvos com expressão aberrante, incluindo miR-19b e o miR-29c, anteriormente investigados e assim, obtiveram uma acurácia de 98% usando o método da curva ROC (44). Esses diversos estudos do grupo elencaram o miR-19b como um importante alvo, e desta forma foi selecionado para o presente estudo.

O grupo do professor Epaminondas Doxakis na Grécia, também produziu diversas publicações associando miRNAs e a doença de Parkinson com o objetivo de verificar seu

potencial uso como uma molécula biomarcadora. Em 2020 publicaram artigo explorando “*brain-enriched*” miRNAs (miRNAs prevalentes no cérebro) como marcadores para disfunções no sistema nervoso. O estudo incluiu 100 controles saudáveis, 99 portadores de DP idiopática e 53 portadores de DP relacionada a mutações específicas, em amostras de plasma analisadas por qPCR. Foram avaliados 20 miRNAs, nominalmente miR-7-5p, miR-22-3p, miR-124-3p, miR-127-3p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-136-3p, miR-139-5p, miR-153-3p, miR-154-5p, miR-323a-3p, miR-330-5p, miR-338-3p, miR-382-5p, miR-409-3p, miR-410-3p, miR-431-3p, miR-433-3p, miR-485-5p miR-495-3p. Foi determinado que um grupo de 5 miRNAs possuíam uma boa sensibilidade para DP idiopática: miR-7-5p, miR-124-3p, miR-127-3p, miR-139-5p e miR-431-3p (42). Em especial, destaque o miR-7-5p foi selecionado especificamente por ter como alvo a alfa-sinucleína, molécula criticamente importante nos mecanismos subjacentes da DP (47).

Com base nos achados desses grupos, assim como estudos desenvolvidos pelo próprio grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica da Universidade de Brasília, que executou o atual projeto, os miRNAs miR-7 e miR-19b foram escolhidos como alvos.

Além disso, esses miRNAs têm grande relevância para o presente estudo, tendo em vista seu papel fisiológico. O miR-7, como dito anteriormente, é um miRNA expresso de forma abundante no cérebro, mas, além disso, também apresenta alta expressão no baço e no pâncreas, estando intrinsecamente ligado a processos celulares importantes. O microRNA miR-7 está envolvido nos processos de proliferação e crescimento celular, inflamação, além de ser descrito como um importante supressor de tumores (48–50).

O outro alvo escolhido, miR-19b, por outro lado, é normalmente descrito como oncogene. Quando expresso de forma aumentada, ele está relacionado a processos carcinogênicos e, atualmente, tem sido associado ao desenvolvimento precoce de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (DP) e a Doença de Alzheimer. Outro miRNA com grande potencial disruptivo em casos de expressão aberrante em tecidos (51–53)

Em síntese, a escolha deveu-se ao número de resultados publicados sobre o miR-19b e sua associação com doenças neurodegenerativas e à associação entre o miR-7 e a alfa-sinucleína, principal alvo de interesse na doença de Parkinson, bem como ao estudo como biomarcador acima descrito. Devido à falta de publicação na literatura científica associando o

TCSREMi e miRNAs na população brasileira, torna-se ainda mais relevante a realização de estudos sobre alvos já descritos em novas populações (54).

O presente trabalho, entretanto, foi apenas uma das linhas de pesquisa desenvolvidas, utilizando a relação entre elementos genéticos no sangue periférico e patologias. Em paralelo à pesquisa desenvolvida em humanos, o teste diagnóstico descrito na atual tese também foi validado em outros modelos, nomeadamente na dissertação de mestrado intitulada 'QUANTIFICAÇÃO DE MICRORNAS LIGADOS À EPILEPTOGÊNESE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS EPILÉPTICOS', da autora Leidiane Lima de Souza, e na tese de doutorado intitulada 'DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO COMPARATIVA DE microRNAs EM PLASMA E SORO DE GATOS DOMÉSTICOS COM DOENÇA DOS RINS POLICÍSTICOS', da autora Marcela Corrêa Scalon (55).

Em ambos os trabalhos, a validação de um teste molecular usando elementos do sangue periférico foi a base do estudo, gerando resultados inéditos para as espécies em estudo e demonstrando a importância da validação metodológica desenvolvida na presente tese.

A expressão aumentada de miR-7 e miR-19 em pacientes previamente diagnosticados com TCSREMi isolado, definido clinicamente, indica uma possível assinatura molecular que caracteriza a doença e poderia ser traduzida em avaliações de patologia clínica. No entanto, nossos achados precisam ser validados em coortes independentes de indivíduos com diagnóstico confirmado da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar metodologias de purificação e quantificação de microRNAs presentes no soro para desenvolver biomarcadores precisos, com base em miR-7 e miR-19b, visando identificar expressão diferenciada de miRNAs em indivíduos com Transtorno Comportamental do Sono REM isolado, definido clinicamente (TCSREMi).

2.2. Objetivos específicos

- a) Comparar duas metodologias de purificação de RNAs e duas metodologias de RT-qPCR para quantificação de microRNAs relevantes na neurobiologia e como possível biomarcador do Transtorno Comportamental do Sono REM isolado, definido clinicamente (TCSREMi);
- b) Analisar a expressão de miR-7 e miR-19b em indivíduos diagnosticados com TCSREMi isolado e em indivíduos saudáveis, visando identificar diferenças estatisticamente significativas que possam contribuir para uma melhor caracterização da doença;
- c) Avaliar a capacidade dos microRNAs miR-7 e miR-19b, isoladamente ou em conjunto, calibrados por miR-21 e cel-miR-39, de identificar expressão diferenciada em pacientes com TCSREMi com uma acurácia acima de 85%, com potencial para utilização como biomarcadores no TCSREMi;
- d) Propor a validação da assinatura promissora de miRNAs em uma nova coorte com maior número de indivíduos, visando confirmar a precisão e eficácia dos biomarcadores miR-7 e miR-19b como ferramenta para identificar expressão genética diferenciada em pacientes com TCSREMi e na predição de possíveis conversões fenotípicas para outros distúrbios neurodegenerativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indivíduos

Coortes de pacientes do Hospital Universitário de Brasília – HUB, da Unidade do Sono de Brasília – USB, do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará – UFC e do Projeto Probe-PD. Com o objetivo de avaliar o padrão de expressão gênica de pacientes com diferentes fenótipos, o presente projeto testou uma coorte de pacientes composta por 3 grupos (G1 a G3) com as características descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição dos grupos de pacientes e controle sadio.

Denominação	Fenótipo	N Amostral
G1	TCSREMi+/DP+	4
G2	TCSREMi+/DP-	6
G3	Controle	6

Grupo G1: pacientes com TCSREMi e DP; Grupo G2: pacientes com TCSREMi, porém sem DP, possivelmente parte deles na fase prodromal da DP; Grupo G3: controles sadios, pareados com as mesmas características demográficas e sem quaisquer distúrbios neurológicos

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo.

Denominação do Grupo	Número total de indivíduos	Distribuição de Gênero M/F	Idade média ao doar a amostra
G1	4	2/2	69,5, $\pm$ 1,5
G2	6	3/3	71, $\pm$ 6,29
G3	6	2/4	68,83, $\pm$ 5,93

Idade dos indivíduos é mostrada com a média seguida de desvio padrão.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Para a definição de casos de DP, foram utilizados os critérios de diagnósticos do banco de cérebros de Londres/Queen Square. Para casos de TCSREMi, foram utilizados os critérios diagnósticos da Terceira Classificação Internacional da Academia Americana de Medicina do Sono, incluindo avaliação vídeo-polissonográfica, sempre que possível. Foram excluídos do projeto pacientes que apresentarem sinais de outras doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer, atrofia de múltiplos sistemas, demência com corpos de Lewy, entre outras. A ocorrência de epilepsia, narcolepsia, e apneia obstrutiva do sono também serviu como critério

de exclusão. Pacientes com DP com demência, idade menor que 18 anos, gestação, claustrofobia, e indivíduos em uso de anticolinérgicos ou mirtazapina serão excluídos.

3.3. Coleta de amostras

A coleta de sangue e separação do soro foi realizada mediante parceria com os Laboratórios Sabin em Brasília e pelo próprio hospital universitário no caso das amostras coletadas na UFC. Foram coletadas duas amostras de cada paciente em tubos próprios (VACUETTE® TUBE Z Serum Separator Clot Activator; Greiner-Bio-One, Áustria). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos, centrifugados (1500g, 4°C, 10 min) para separação do soro e armazenados a 80°C no Departamento de Pesquisa do Sabin ou em local próprio no hospital universitário, até serem transportados para o Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, FAV-UnB. Uma vez no laboratório, o soro foi então suavemente homogeneizado por meio de pipetagem e transferido para microtubos de 2 mL para armazenamento em -80°C até seu posterior uso.

3.4. Purificação de RNA de amostras de soro

O RNA total foi obtido das amostras de soro utilizando-se um dos seguintes kits comerciais, miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) ou miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen). Foi também utilizado o oligonucleotídeo miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (Qiagen), uma sequência de ribonucleotídeos que imita o miRNA cel-miR-39-3p de *C. elegans*, exógena, desenhada para normalizar reações de qPCR como controle positivo de extração, conforme descrito pelo fabricante. O protocolo utilizado para cada um dos kits comerciais está detalhado a seguir.

(i) *miRNeasy Serum/Plasma*

Para utilização desse kit alguns cuidados foram necessários. Inicialmente, o material permaneceu no máximo 6 horas refrigerado entre 2-8°C para uso durante o processo de extração. Os tampões foram homogeneizados antes do uso, verificando a presença de qualquer precipitação de sal. Qualquer reagente contendo hipoclorito de sódio foi evitado, uma vez que o kit utiliza sais de guanidina, que são incompatíveis com tal substância. As amostras de soro foram descongeladas, homogeneizadas via vórtex e então levemente centrifugadas – *spin* –, de forma a assentar toda a amostra na base dos microtubos antes do início do ensaio, para prosseguir-se com a extração. Um volume de reagente de lise QIAzol, na quantidade de 5 vezes o volume da amostra, foi adicionado ao microtubo contendo a alíquota de amostra. A mistura

foi agitada no vórtex até não haver visível separação de fases, para então ser incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, havendo formação de floculações. Um volume de clorofórmio igual àquele inicial de amostra foi então adicionado à mistura, que foi novamente agitada no vórtex por 15 segundos, adquirindo um aspecto rosa leitoso. Adicionalmente, realizou-se período de incubação antes do próximo passo, 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Os microtubos contendo a mistura foram então centrifugados a 4°C por 15 minutos a 12000 g. Após essa centrifugação, formaram-se 3 fases visíveis dentro dos microtubos, um sobrenadante incolor, uma interfase viscosa branca, e um líquido de fundo rosa, rico em reagente de lise, a fase fenólica ou orgânica. O sobrenadante incolor, denominado ‘fase aquosa’, foi cuidadosamente removido do microtubo, deixando-se de pipetar pequeno volume de sobrenadante (filete) para assim evitar a interfase viscosa. Essa fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. Segue-se à adição de etanol absoluto, na quantidade de 1,5 vezes o volume da fase aquosa, sempre homogeneizando cuidadosamente a nova mistura. A mistura de etanol e sobrenadante foi então pipetada na coluna do kit, no máximo 700 µL por vez, seguindo-se à centrifugação a 8000 g por 15 segundos. O RNA ficou retido na coluna e o filtrado foi descartado. Se houver volume superior a 700 µL, repete-se essa etapa de pipetagem e centrifugação. A seguir foram feitas etapas de lavagem das colunas. Cada coluna foi lavada um total de 3 vezes, uma vez utilizando-se 700 µL de tampão RWT, uma vez com 500 µL de tampão RPE e uma última vez com 500 µL de etanol 80%. Após cada etapa de lavagem, foi feita centrifugação a 8000 g por 15 segundos e descarte dos filtrados. Após as lavagens, as colunas foram secas mediante centrifugação na velocidade máxima de centrífuga, por 5 minutos. Finalmente, foi feita adição de 14 µL com água pura livre de ribonucleases, no centro da membrana da coluna, e posterior centrifugação na velocidade máxima por 1 minuto, para eluição do RNA ligado à coluna. Como o ‘volume morto’ da coluna é de 2 µL, 12 µL de amostra extraída serão obtidos para utilização. O material foi armazenado a -80°C até ser utilizado nos ensaios posteriores. O procedimento está esquematizado na Figura 1 do Anexo 1, conforme manual de uso do fabricante.

(ii) *miRNeasy Serum/Plasma Advanced*

Para utilização desse kit comercial, foram observados os mesmos cuidados descritos para o kit miRNeasy Serum/Plasma. A grande vantagem desse kit em relação ao anterior é que não são utilizados nem clorofórmio nem fenol para extração, tornando-o mais seguro para o usuário e evitando-se a potencial interferência desses componentes nas reações de qPCR. Após aliquotar as amostras de soro em microtubos próprios para uso, 60 µL de tampão RPL foram

adicionados à amostra. A mistura foi homogeneizada usando-se vortex por 5 segundos, posteriormente sendo incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos. Após a incubação, 20 µL de tampão RPP foram adicionados à mistura, que foi homogeneizada vigorosamente por 20 segundos com vortex, seguido por nova incubação de 3 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12000 g por 3 minutos, formando-se duas fases no microtubo. O sobrenadante incolor foi transferido cuidadosamente para um novo tubo, e homogeneizado com igual volume de isopropanol. Todo o volume obtido foi transferido para coluna de coleta, que foi centrifugada a 8000 g por 15 segundos, ficando retidos ácidos ribonucleicos na coluna. Assim como no kit miRNeasy Serum/Plasma, 3 etapas de lavagem foram realizadas, uma vez utilizando 700 µL de tampão RWT, uma vez com 500 µL de tampão RPE e uma última vez com 500 µL de etanol 80%. Em todas etapas de lavagem, o filtrado obtido após centrifugação foi descartado. Após as lavagens, as colunas foram secas mediante centrifugação na velocidade máxima de centrífuga por 5 minutos. Antes da eluição ser realizada, as colunas foram deixadas abertas por um minuto. Após foram adicionados 20 µL água livre de ribonucleases para posterior eluição dos ácidos ribonucleicos. A eluição foi feita via centrifugação à velocidade máxima por 1 minuto. Na figura 1 do anexo 1, apresenta-se esquema contendo o conjunto de etapas desse procedimento.

3.5 Quantificação de RNAs extraídos e armazenamento

Os miRNAs extraídos foram quantificados por fluorimetria (firmware Qubit® 2.0 3.11; Thermo Fisher Scientific, Inc.) imediatamente antes de serem processados via qPCR. Amostras foram descongeladas no máximo 3 vezes para reduzir o risco de degradação dos miRNAs extraídos.

3.6 Quantificação de microRNAs alvos via RT-qPCR

Foram utilizados dois métodos de qPCR para quantificar os microRNAs de interesse presentes nas amostras, denominados de qPCR tradicional e de qPCR com pré-amplificação ou “Advanced”, conforme descrito a seguir.

(i) *qPCR tradicional*

Após purificação do RNA das amostras de soro descrita acima, mediante kits de extração descritos anteriormente, foi utilizado o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) para transcrição reversa (RT) do RNA obtido. Todos reagentes e amostras foram inicialmente descongelados em bloco de gelo,

homogeneizados utilizando-se vortex, e centrifugados levemente para assentar todo material no fundo de seus respectivos vasilhames. Foi preparada uma solução mestre seguindo as quantidades descritas na Tabela 3, respeitando-se o número de amostras e alvos que seriam utilizados.

Tabela 3. Composição da solução mestre usada nas reações de RT-PCR.

Componente	Volume
100 mM dNTPs (com DTTP*)	0,15 µL
Transcriptase Reversa MultiScribe [®] , 50U/µL	1,00 µL
Tampão de RT 10X	1,50 µL
Inibidor de RNase, 20U/µL	0,19 µL
Água livre de nucleases	3,16 µL
Spike-in*	1,00 µL
Volume final de cada reação	7,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para transcrição reversa no caso de apenas uma reação.

*Esse elemento consiste no controle exógeno RNA Spike-In kit, Qiagen. *DTTP - *Deoxythymidine triphosphate*

Após preparo da solução mestre, o ensaio prosseguiu preparando-se alíquotas de 7µL da solução de um microtubo individual para cada reação realizada. A esses microtubos foi adicionado um mix de 3µL de primer específico para cada alvo ou controle, como discriminado na Tabela 5, e 5µL de amostra contendo 1 ng de RNA, conforme quantificado no equipamento Qubit[®] (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Após a preparação da reação total, cada microtubo foi disposto no termociclador para a reação de RT, com ciclagem descrita na Tabela 4.

Tabela 4. Programação de ciclos para reação de Transcrição Reversa

Passo	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	16°C	30 minutos
	42°C	30 minutos
Parada da Reação	85°C	5 minutos
Hold	4°C	∞

Fonte: TaqMan Small RNA Assay Guia de Usuário.

Tabela 5. Primers e sequências maduras de cada alvo usado nas reações de qPCR

Código do Primer	Sequência de RNA Maduro	Descrição
hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU	Alvo
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	Alvo
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	Controle endógeno
cel-miR-39	UCACCGGGUGGAAAUCAGUUAG	Controle exógeno

Após a síntese do cDNA, prosseguiu-se para a PCR em tempo real. Para essa etapa, todos os reagentes foram descongelados em bloco térmico, homogeneizados utilizando-se vortex e então levemente centrifugados de forma que todo material se assentasse no fundo dos respectivos microtubos. Diversos mixes foram preparados para cada alvo que seria analisado nas reações, já que a reação é alvo-específica. Todos os ensaios foram realizados em triplicada, conforme recomendações para qPCR (56). A composição de cada mix segue o descrito na tabela 6.

Tabela 6. Composição da solução mestra usada nas reações de qPCR.

Componente	Volume
Taqman™ Fast Master Mix	10 µL
Primer	1,00 µL
Água livre de nucleases	7,00 µL
Volume final por poço de reação	18,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para PCR em tempo real no caso de apenas uma reação.

Após preparar a solução mestra, 18 µL de reação foram adicionados em cada poço necessário para o ensaio em uma microplaca específica para o equipamento utilizado (QuantStudio 12k Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher), incluindo 3 poços em cada placa onde não foi adicionado material genético, mas sim água, como controle negativo da reação. A cada poço foram então adicionados 2 µL de material proveniente da RT-PCR realizada anteriormente. As placas foram então seladas com adesivo específico para esse fim e

então levemente centrifugadas em centrífuga para placas de PCR, para então serem carregadas no termociclador onde a reação foi realizada conforme ciclagem descrita na tabela 7.

Tabela 7. Programação de ciclos para reação de qPCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da Enzima	95°C	20 segundos	1 Ciclos
Desnaturação	95°C	1 segundo	40 Ciclos
Anelamento/Extensão	60°C	20 segundos	

Fonte: TaqMan Small RNA Assay Guia de Usuário.

A expressão relativa será determinada pelo método de $\Delta\Delta$ Ct descrito por Livak et al. (2001) (57).

(ii) *qPCR com pré amplificação ou “Advanced”*

O presente método também utiliza RNA extraído mediante kits de extração acima citados. Para tanto, selecionou-se o kit TaqMan Advanced MicroRNA Assay (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) para a série de passos experimentais que resulta na amplificação do RNA obtido. Os reagentes e amostras foram inicialmente descongelados em bloco térmico, homogeneizados utilizando-se vortex e centrifugados levemente para levar todo material ao fundo de cada microtubo. Diferente do visto no qPCR tradicional, a reação “Advanced” tem algumas etapas prévias em relação à reação de RT-PCR, conforme descrito a seguir.

a) *Adição de cauda poli-A*

Foi preparada uma solução mestre seguindo as relações presentes na Tabela 8 para cada ensaio, respeitando-se o número de amostras do ensaio.

Tabela 8. Composição da solução mestre usada nas reações de adição da cauda poli-A.

Componente	Volume
Tampão Poli-A 10x	0,50 µL
ATP	0,50 µL
Enzima Poli(A)	0,30 µL
Água livre de nucleases	0,70 µL
Spike-in*	1,00 µL
Volume final de cada reação	3,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para adição de cauda poli-A para uma única reação. *Esse elemento consiste no controle exógeno RNA Spike-In kit, Qiagen.

Após preparo da solução mestre, essa solução foi homogeneizada cuidadosamente e 3µL da solução foram aliquoteados em microtubos individuais para cada reação. A esses microtubos, foi adicionado 2 µL de amostra contendo 1 ng de RNA com volume final de 5 µL. Após a preparação da reação total, cada microtubo foi colocado em termociclador para a reação de adição de cauda poli-A, com ciclagem descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Condições experimentais para a adição da cauda poli-A

Passo	Temperatura	Tempo
Poliadenização	37°C	45 minutos
Parada da reação	65°C	10 minutos
Hold	4°C	∞

Fonte: TaqMan Advanced miRNA Assay Guia de Usuário.

Após a reação ser finalizada, seguiu-se para o próximo passo imediatamente.

b) Adição do adaptador

Preparou-se uma solução mestre seguindo as relações presentes na Tabela 10, de acordo com o número de amostras preparadas no passo anterior.

Tabela 10. Composição da solução mestre usada nas reações de adição do adaptador.

Componente	Volume
Tampão para DNA Ligase 5X	3,00 µL
50% PEG 8000*	4,50 µL
Adaptador de Ligação 25X	0,60 µL
Ligase de RNA	1,50 µL
Água livre de nucleases	0,40 µL
Volume final de cada reação	10,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para adição do adaptador para uma reação.

*O PEG 8000 é um reagente extremamente viscoso, deve estar em temperatura ambiente para ser usado e pipetado lentamente, com extremo cuidado, de forma a evitar diferença no volume desejado em relação àquele de fato pipetado.

Após preparo da solução mestre, a solução foi homogeneizada cuidadosamente e 10 µL da solução foram aliquotados em cada um dos microtubos. O volume final nesse passo foi 15 µL. Após a preparação da reação, cada microtubo foi disposto em termociclador, onde realizou-se a reação de adição do adaptador, com ciclagem descrita na Tabela 11.

Tabela 11. Condições experimentais para a adição do adaptador.

Passo	Temperatura	Tempo
Ligação	16°C	60 minutos
Hold	4°C	∞

Fonte: TaqMan Advanced miRNA Assay Guia de Usuário.

Após a reação ser finalizada, seguiu-se para o próximo passo experimental, imediatamente.

c) *Reação de transcrição reversa*

Foi preparada solução mestre seguindo as relações presentes na Tabela 12 para cada ensaio, de acordo com o número de amostras do passo anterior.

Tabela 12. Composição da solução mestre usada nas reações de transcrição reversa.

Componente	Volume
Tampão para RT 5X	6,00 µL
dNTP Mix (25 mM de cada)	1,20 µL
Primer Universal de RT 20X	1,50 µL
Mix de Enzima de RT 10X	3,00 µL
Água livre de nucleases	3,30 µL
Volume final de cada reação	15,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para transcrição reversa no caso de apenas uma reação.

Após preparo da solução mestre, essa solução foi homogeneizada cuidadosamente e 15 µL da solução foram aliquotados em cada um dos microtubos. O volume final nesse passo foi de 30 µL. Após a preparação da reação total, cada microtubo foi disposto em termociclador para a reação de transcrição reversa (RT), com ciclagem descrita na Tabela 13.

Tabela 13. Condições experimentais para a transcrição reversa.

Passo	Temperatura	Tempo
Transcrição Reversa	42°C	15 minutos
Parada da reação	85°C	5 minutos
Hold	4°C	∞

Fonte: TaqMan Advanced miRNA Assay Guia de Usuário.

Diferente dos passos anteriores, esse passo permite uma parada do experimento para retomar-se em momento posterior. Ou seja, a reação de RT pode ser armazenada a -20°C por até 2 meses. O passo seguinte denomina-se reação de miR-Amp.

d) *Reação de miR-Amp*

Os reagentes e produtos dos passos anteriores foram descongelados e cuidadosamente homogeneizados. Preparou-se uma solução mestre, seguindo as relações presentes na Tabela 14 para cada ensaio utilizado nessa etapa, de acordo com o número de amostras do passo anterior.

Tabela 14. Composição da solução mestre usada nas reações de miR-Amp.

Componente	Volume
2X miR-Amp Master Mix	25,00 μ L
20X miR-Amp Primer Mix	2,50 μ L
Água livre de nucleases	17,50 μ L
Volume final de cada reação	45,00 μ L

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para miR-Amp no caso de apenas uma reação.

Após preparo da solução mestre, a solução foi homogeneizada cuidadosamente e 45 μ L da solução foram aliquotados em novos microtubos individuais, um para cada reação de RT anteriormente utilizada. Adicionou-se o volume de 5 μ L de material do passo anterior a cada um desses microtubos que já continham 45 μ L, totalizando-se o volume final de 50 μ L. O material produzido no passo de RT que não foi utilizado na reação de miR-Amp foi armazenado para eventual uso futuro, desde que no tempo de validade. Após a preparação da reação total, cada microtubo foi levado a um termociclador para a reação de miR-Amp, com ciclagem descrita na Tabela 15.

Tabela 15. Condições experimentais para a reação de miR-Amp.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da Enzima	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	3 segundos	14
Anelamento/Extensão	60°C	30 segundos	
Parada da reação	99°C	10 minutos	1
Hold	4°C	∞	1

Fonte: TaqMan Advanced miRNA Assay Guia de Usuário.

Assim como no passo de transcrição reversa, esse pode ser um ponto de parada. A reação de miR-Amp pode ser armazenada em -20°C por até 2 meses. Seguiu-se à etapa final do ensaio, a reação de qPCR.

e) Reação de qPCR

Os reagentes foram descongelados em bloco térmico, homogeneizados utilizando-se vortex e então levemente centrifugados de forma que todo material se assentasse no fundo dos

respectivos microtubos. Como no qPCR tradicional, diversos mixes (soluções ‘mestre’) foram preparados para cada alvo que seria analisado nas reações, já que a reação nessa etapa é alvo-específica. Todos os ensaios foram realizados em triplicada, conforme recomendações para qPCR (56,58). A composição de cada mix seguiu o descrito na tabela 16.

Tabela 16. Composição da solução mestre usada nas reações de qPCR.

Componente	Volume
Taqman™ Fast Master Mix	10 µL
Primer	1,00 µL
Água livre de nucleases	4,00 µL
Volume final por poço de reação	15,00 µL

Volume de cada um dos componentes da solução mestre para PCR em tempo real no caso de apenas uma reação.

Após preparar a solução mestre, preparou-se também uma diluição do material produzido no passo de miR-Amp. Conforme recomendado pelo fabricante, utilizou-se uma diluição de 1:10. Assim, 15 µL de solução mestre para qPCR foram adicionados em cada poço do ensaio em uma microplaca específica para o equipamento utilizado (QuantStudio 12k Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher). Incluiu-se também 3 poços em cada placa como controle negativo da reação, substituindo-se a amostra de RNA pelo mesmo volume de água. A cada poço foram então adicionados 5 µL de material diluído anteriormente. As placas foram seladas com adesivo específico e então levemente centrifugadas em centrífuga para placas de PCR, sendo dispostas no termociclador de qPCR para a reação de amplificação, conforme descrito na tabela 17.

Tabela 17. Condições experimentais para qPCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da Enzima	95°C	20 segundos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	1 segundo	40 ciclos
Anelamento/Extensão	60°C	20 segundos	

Fonte: TaqMan Small RNA Assay Guia de Usuário.

A expressão relativa foi determinada pelo método de $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), da mesma forma que na outra metodologia de qPCR(57).

3.7. Análise estatística

A acurácia do biomarcador foi examinada mediante o método da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), visando-se validar a acurácia dos alvos da assinatura de miRNAs em pacientes com TCSREMi. Foram considerados como alvos elegíveis aqueles que apresentassem acurácia > 85%, especificidade > 0,8, sensibilidade > 0,7.

3.8. Comitê de ética

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, parecer 4.984.260. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme as normas adotadas pelo comitê.

3.9. Delineamento experimental

O fluxo experimental pode ser visualizado na figura 3.



Figura 3. Fluxo dos experimentos.

Representação das etapas experimentais do projeto. Inicialmente temos a obtenção do material dos participantes e sua posterior separação em frações, obtendo-se o soro. Após, o RNA foi purificado mediante kits comerciais com coluna de sílica e quantificado por fluorometria. Finalmente, microRNAs alvos específicos foram quantificados pelo método de qPCR, seguindo-se ao cálculo da expressão relativa pelo método de $\Delta\Delta$ Ct.

4. RESULTADOS

Com o objetivo de apresentar os dados de forma clara e organizada, essa seção foi dividida em 4 partes: 4.1. Purificação de RNA; 4.2. qPCR tradicional *versus* qPCR com Pré-amplificação; 4.3. Dados tratados de qPCR; 4.4. Curva ROC.

4.1. Purificação de RNA

Inicialmente foi necessário otimizar o volume de amostra inicial de soro utilizada na purificação de RNA dos pacientes. Para tanto, foi realizado ensaio onde diferentes volumes foram testados, nominalmente 100 μ L, 200 μ L e 400 μ L de soro, como recomendado pela fabricante dos kits de extração (Qiagen). Foi verificado que tanto as alíquotas de 100 μ L quanto as de 400 μ L não registraram quantificação no Qubit[®], havendo apenas quantificação na alíquota de 200 μ L, concentração de 0,286 ng/ μ L. O resultado desfavorável obtido na purificação com volume inicial de 400 μ L possivelmente pode ser explicado por entupimento da coluna de sílica, que é uma possibilidade descrita na seção de *Troubleshooting* dos manuais dos kits de extração, quando o volume inicial de amostra é alto. No caso das alíquotas de 100 μ L, a explicação mais plausível é a baixa quantidade de material presente, uma vez que a concentração de RNA obtida na purificação com o dobro dessa quantidade (200 μ L) ainda assim estava próxima ao limite de detecção do equipamento utilizado (Qubit, ThermoFisher), cerca de 0,25 ng/ μ L. Com base nesses resultados o volume de 200 μ L foi considerado ideal para trabalho. A literatura demonstra que existe bastante variação na quantidade ideal de material para extração, havendo casos em que a quantidade de 100 μ L foi considerada apropriada para a purificação (59,60), casos nos quais a quantidade de material é concordante com aquela usada nesse estudo (61) e, ainda, há protocolos diferenciados para obter maior quantidade final de RNA, como dupla eluição na coluna de sílica (62). O exposto evidencia que é preciso buscar uma quantidade inicial ideal para cada tipo de experimento e amostra utilizada.

Após definida a quantidade ideal para os ensaios realizados, foram realizados testes com ambos os kits de purificação, miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) e miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen). Os resultados da tabela 18 e figura 4 mostram que o kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced de fato possui um rendimento superior ao miRNeasy Serum/Plasma. Mais do que o teste de dois kits comerciais, esses resultados comparam dois sistemas de extração de material genético distintos, o sistema mais tradicional de extração com fenol/clorofórmio e um sistema utilizando sais de guanidina, o qual além de possuir um

rendimento maior ainda evita a possível contaminação por fenol, um potencial problema de diversos protocolos de purificação de RNA, que pode afetar a qPCR.

Já ao utilizar o kit de purificação baseado em sais de guanidina, miRNeasy Serum/Plasma Advanced, foi obtido rendimento superior. No caso dos controles sadios, a concentração média obtida nas extrações foi de 1,1995 ng/ μ L, concentração 1,59 vezes maior de material quando comparada à obtida utilizando-se o sistema fenol/clorofórmio, uma diferença de rendimento estatisticamente significativa ($p=0,0127$). No grupo TCSREMi+/DP- a diferença foi ainda mais relevante, rendimento médio de 2,2233 ng/ μ L, 3,48 vezes maior ao observado no kit miRNeasy Serum/Plasma (0,6388 ng/ μ L), $p<0,0001$. Apenas no grupo TCSREMi +/DP+ não existe diferença estatisticamente relevante ($p=0,0571$), porem mesmo nesse grupo existe uma clara tendência de aumento no rendimento médio, que foi de 0,853 ng/ μ L no kit com sais de guanidina, rendimento 2,91 vezes maior do que o verificado com o kit de fenol/clorofórmio (0,2926 ng/ μ L).

Utilizando-se o kit miRNeasy Serum/Plasma, baseado na extração com fenol/clorofórmio, foi obtido um resultado médio de 0,7521 ng/ μ L de RNA total nas purificações de amostras de soro de controles saudáveis. Esse resultado não apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado com a média obtida nas extrações feitas com soro de pacientes TCSREMi+/PD-, que teve como média 0,6388 ng/ μ L. Curiosamente, existe diferença estatisticamente relevante entre o resultado médio das purificações dos controles sadios e pacientes TCSREMi+/PD+, que nesse caso tiveram uma média significativamente menor, de 0,2926 ng/ μ L.

Entretanto, é importante ressaltar que a quantidade de RNA extraído com ambos os kits atende à quantidade mínima de material para os demais ensaios realizados.

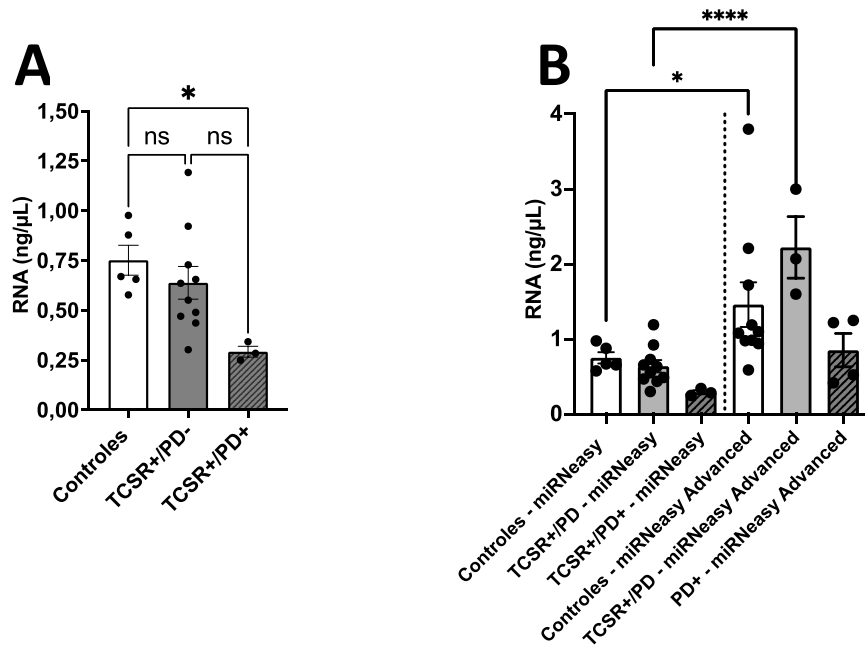


Figura 4. Rendimento da purificação de RNA extraído utilizando os kits de extração miRNeasy Serum/Plasma e miRNeasy Serum/Plasma Advanced. Concentrações de RNA total de extrações com os kits miRNeasy Serum/Plasma e miRNeasy Serum/Plasma Advanced. Na figura A estão apresentadas as concentrações médias obtidas entre pacientes do grupo controle, grupo TCSREMi+/PD- e grupo TCSR+/PD+ ao utilizar o kit miRNeasy Serum/Plasma. A figura B mostra os mesmos grupos quando comparados com o resultado das extrações realizadas com o kit versão *Advanced*, mostrando a diferença de rendimento de acordo com o kit usado em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 18. Resultados das extrações.

Grupos	miRNeasy	miRNeasy Advanced	Valor de p
Controle	0,7521	1,1995	0,0127
TCSREMi +/DP -	0,6388	2,2233	<0,0001
TCSREMi +/DP +	0,2926	0,853	0,0571

Rendimento médio de extrações utilizando os kits miRNeasy Serum/Plasma e miRNeasy Serum/Plasma Advanced. Valor de p determinado usando o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, comparando os resultados obtidos dentro do mesmo grupo experimental usando os diferentes kits.

4.2. qPCR tradicional versus qPCR com pré-amplificação

Após realizar a purificação do RNA total presente no soro dos pacientes participantes do estudo, de acordo com o desenho experimental proposto, o próximo passo foi quantificar os miRNAs de interesse para examinar se haveria expressão diferencial no TCSREMi. Dentre as metodologias existentes, o PCR em tempo real (qPCR) foi escolhido como o mais adequado, em vista de ser uma metodologia acurada, considerada “padrão-ouro”, e amplamente utilizada em estudos similares. A técnica possui natureza exponencial da reação de qPCR, sendo técnica com alto grau de sensibilidade, assim capaz de detectar pequenas quantidades de material (63–66).

Entretanto, já nos primeiros ensaios foi identificado um problema grave para a quantificação de um dos alvos propostos: o ciclo de amplificação, “Ct” (*cycle threshold*) que indicará o número do ciclo em que a reação cruza o limiar de fluorescência, portanto, que o miRNA alvo foi detectado (56). De acordo com o visto na literatura e nos próprios manuais de boas práticas fornecidos pelos fabricantes dos equipamentos, ciclos mais tardios são menos precisos, podendo ser resultado de uma amplificação inespecífica. Após revisar cuidadosamente a literatura, definimos o ciclo 35 como limitante para interpretação dos dados (58).

Os resultados iniciais demonstraram que no caso de miR-7, Cts muito próximos ou mesmo acima de 35 foram frequentemente obtidos. No grupo de controles saudáveis, para miR-7 tivemos um Ct médio de 34,9, com valores variando de 33,3 a 36,4, desvio padrão de 0,543. Nos pacientes TCSREMi+/DP - os valores foram ainda mais altos, com Ct médio de 35,4 (desvio padrão de 0,307), valores variando de 34,3 a 36,5 (Tabela 18; Figura 4). Esses valores estão claramente acima do que seria aceitável para análise correta, criando um possível viés de aferição para o trabalho.

Para miR-19b, entretanto, tal problema não foi verificado. No caso dos controles saudáveis, o Ct médio foi de 26,2 (desvio padrão de 0,359), com resultados entre 24,7 e 27,3 (Tabela 18; Figura 4). Já em pacientes TCRSEM +/- DP -, o Ct médio foi de 25,2 (desvio padrão de 0,438), com resultados entre 21,8 e 26,6. Esses Cts estão dentro do adequado para interpretação confiável dos dados, e mesmo que pudessem ser considerados elevados em outros modelos de estudos, como cultivo celular, são Cts perfeitamente aceitáveis para amostras clínicas. Mesmo com esses resultados positivos para miR-19b, os resultados para miR-7 tornaram a utilização do qPCR convencional inadequado para análise conjunta dos alvos, requerendo-se a busca de um protocolo alternativo.

Essa dificuldade em analisar dados obtidos via qPCR com material proveniente de sangue é condizente com o encontrado na literatura e é devido à baixa concentração de certos alvos no sangue. Em um de seus estudos, Ruben-Santiago e colaboradores, por exemplo, determinaram que qualquer valor acima de 33 para o Ct seria considerado como 33 para poder prosseguir com as análises propostas (67). Outro estudo também indica grande dificuldade em normalizar os resultados usando endógenos, demonstrando desafios para análises usando amostras de sangue periférico (68).

Com objetivo de superar o problema encontrado para quantificar miR-7, buscamos na literatura alternativas para trabalhar com soro usando técnicas de PCR, e encontramos metodologias que utilizam a pré-amplificação dos RNAs anterior à etapa de quantificação (69,70).

Após adotar esse protocolo, foi verificado uma melhora considerável nos resultados produzidos para miR-7. Nos controles sadios o resultado médio de Ct foi de 28,1 (desvio padrão de 0,47), com valores variando entre 25,2 e 30,7. Para os pacientes TCSREMi+/DP -, a média dos Cts foi de 26,2 (desvio padrão 1,11), com valores entre 22,4 e 28,9. Esses valores estão bem abaixo do limite proposto para os dados (Ct=35), sendo considerados resultados confiáveis.

No caso do alvo miR-19b também foram obtidos ciclos de amplificação mais precoces, porém tendo em vista que a metodologia anterior já estará adequada para esse alvo, esse fato não trouxe qualquer alteração para a análise dos dados. Os controles sadios tiveram Ct médio de 23,3 (desvio padrão de 0,5), 2,9 ciclos a menos do que o visto no convencional, e os pacientes TCSREMi+/DP- tiveram Ct médio de 21,1 (desvio padrão de 0,942), 4,1 ciclos a menos do que o visto com o qPCR convencional. É importante ressaltar que mesmo não afetando as análises, esses resultados mostram uma diferença significativa em relação ao resultado obtido com as duas técnicas, uma vez que a diferença de um ciclo indica o dobro da quantidade de material na amostra. Os resultados descritos podem ser visualizados na tabela 18 e na figura 4.

Com base nos resultados descritos, a metodologia de qPCR com pré-amplificação foi considerada a mais adequada para o estudo, já que permitiu a análise confiável dos resultados para ambos os alvos, miR-7 e miR-19b.

Curiosamente, observando os dados produzidos pela metodologia de qPCR com pré-amplificação, é possível identificar uma maior amplitude, isso é, diferença entre os valores máximos e mínimos obtidos, na distribuição dos dados obtidos. No caso de controles sadios, temos amplitude de 3,11 e 5,52 para o miR-7 nos resultados obtidos usando o qPCR convencional e o qPCR com pré-amplificação, respectivamente, e amplitude de 2,54 e 4,42 para miR-19b, nesse mesmo grupo de controles. Para os pacientes TCSREMi+/DP- temos amplitude

de 2,23 e 6,53, quando comparando as metodologias de qPCR convencional e qPCR com pré-amplificação para miR-7, e 4,75 e 5,3 quando analisamos o miR-19b. Esse resultado pode ser devido a um grande número de fatores, como efeito da maior sensibilidade do método com pré-amplificação ou uma variação criada pelo maior número de etapas de reação na metodologia como pré-amplificação.

Tabela 19. Dados comparativos entre as metodologias de qPCR

Alvo	Grupo Experimental	Média de Ct (SEM)		Diferença entre as Médias (SEM)	Valor de p*	Mínimo Máximo (Amplitude)	–	Coeficiente de Variação	
		qPCR	qPCR Advanced			qPCR	qPCR Advanced	qPCR	qPCR Advanced
miR-7	Controle	34,9 (0,543)	28,1 (0,47)	6,832 (0,7540)	0,0002	33,3 – 36,4 (3,11)	25,2 – 30,7 (5,52)	3,81%	5,55%
	TCSREMi	35,4 (0,307)	26,2 (1,11)	9,206 (1,011)	0,0007	34,3 – 36,5 (2,23)	22,4 – 28,9 (6,53)	2,45%	10,4%
miR-19b	Controle	26,2 (0,359)	23,3 (0,500)	2,862 (0,6425)	0,0023	24,7 – 27,3 (2,54)	21,4 – 25,8 (4,42)	4,11%	7,11%
	TCSREMi	25,2 (0,438)	21,1 (0,942)	4,045 (0,9053)	0,0011	21,8 – 26,6 (4,75)	18,1 – 23,4 (5,3)	5,78%	10,9%

*Teste de Mann-Whitney para análise de diferença nos valores de Ct das duas metodologias, qPCR e qPCR *Advanced*, em cada grupo experimental.

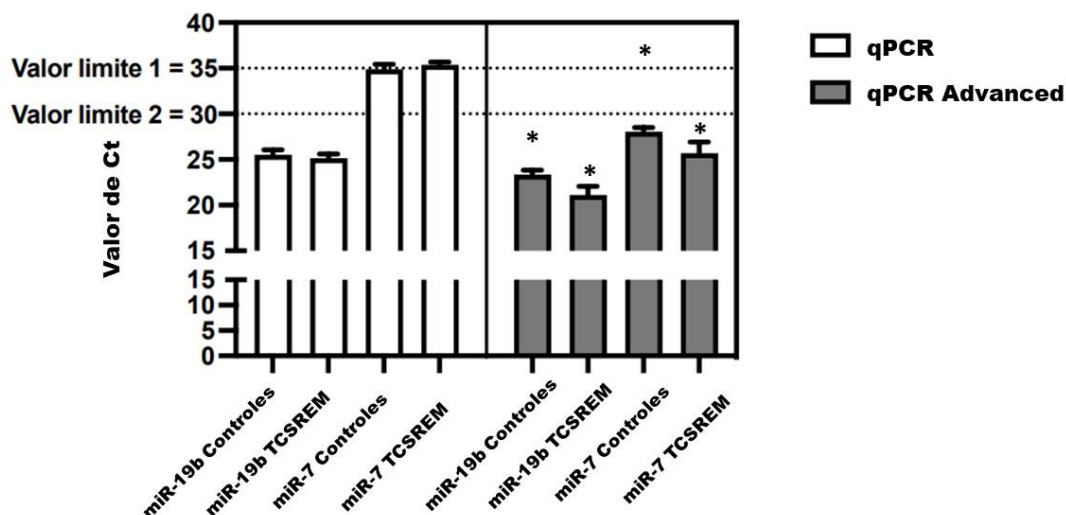


Figura 5. Comparação de Cts produzidos pelos diferentes sistemas de qPCR. Quantificação dos alvos, miR-7 e miR-19b, utilizando duas metodologias para qPCR, a metodologia tradicional e a metodologia com pré-amplificação da amostra. Vide tabela 18 para valores exatos de Ct e valores de p. Os tracejados representados no gráfico são: para o valor limite 1 o limiar considerado aceitável para qPCR, Ct=35, segundo a literatura; para o valor limite 2 o limiar considerado aceitável na prática diária no laboratório. * $p < 0,05$; Teste de Mann-Whitney para análise de diferença as metodologias nos grupos experimentais avaliados.

4.3. Dados tratados de qPCR

Após determinar qual método de qPCR seria mais adequado para gerar dados confiáveis com ambos os alvos, seguiu-se para a próxima etapa, avaliar os resultados produzidos. Ao se comparar os valores de Ct de miR-7 dos grupos controle e pacientes TCSREMi+/DP-, não foi possível identificar uma diferença estatisticamente relevante entre a expressão desse miRNA nesses grupos (Ct=28,1; Ct=26,2; respectivamente). O que é observado é uma tendência de redução numérica entre a média dos Cts no grupo TCSREMi quando comparado ao grupo de controles saudáveis, o que significa um potencial aumento da expressão desse miRNA no grupo TCSREMi+/DP-. miR-7 é um miRNA ricamente expresso no sistema nervoso central, uma vez que doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, Atrofia múltipla de sistemas e Demência por Corpos de Lewy, existe a possibilidade desse miRNA ter expressão aberrante durante um quadro de doença por algum efeito relacionado com a patologia (71). Tal relação não está elucidada na literatura, entretanto, sendo um bom alvo para estudo. Um estudo anterior do grupo usando modelo animal mostrou expressão aberrante de miR-7 na região cerebral do estriado quando um processo patológico similar ao Parkinson foi reproduzido no modelo da

rotenona, indicando mais uma vez que existe uma relação entre a patologia e a expressão aberrante desse miRNA (72). Ainda mais, podemos ver na literatura outros trabalhos relacionando esse miRNA com patologia, tanto em artigos originais quanto revisões sobre miRNAs envolvidos na patogênese do Parkinson e com possível uso como biomarcador (73,74).

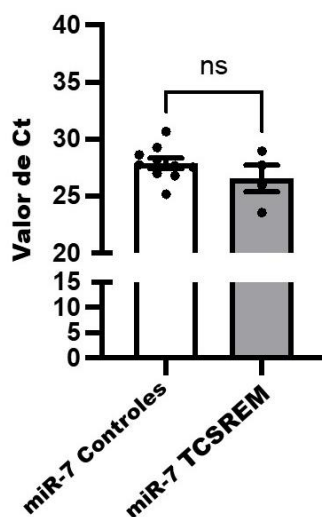


Figura 6. Valores de Ct de miR-7. Análise do valor de Ct de miR-7, determinado por RT-qPCR, em amostras de soro de controles sadios e pacientes diagnosticados com TCSREMi. Ns – Não significativo

Com o objetivo de determinar se a expressão de miR-7 estaria alterada nos pacientes com TCSREMi em relação aos controles saudáveis, foi determinada a expressão relativa por RT-qPCR e dados expressos pelo método $\Delta\Delta Ct$. Ao realizar os cálculos, verifica-se que miR-7 está expresso de forma aumentada no grupo TCSREMi+/DP– em relação ao grupo de controles sadios (Figura 6), 5,39 vezes mais expresso (mediana da expressão relativa do grupo TCSREMi=5,44 versus 1,010 para o grupo controle) nesse grupo em relação aos controles. Esse é um dado relevante na busca de um alvo capaz de diferenciar pacientes com TCSREMi de indivíduos controles. Determinou-se que com um valor de *cut-off* $> 1,615$ foi escolhido com base no maior valor de *likelihood ratio* ou razão de verossimilhança, valor de 4,167. Essa escolha de valor de *cut-off* pode ser alterada no futuro, caso o clínico deseje ter uma maior sensibilidade ou, ao contrário, uma maior especificidade no teste. Como ainda não temos um dado clínico norteador, optamos por escolher pela maior razão de verossimilhança.

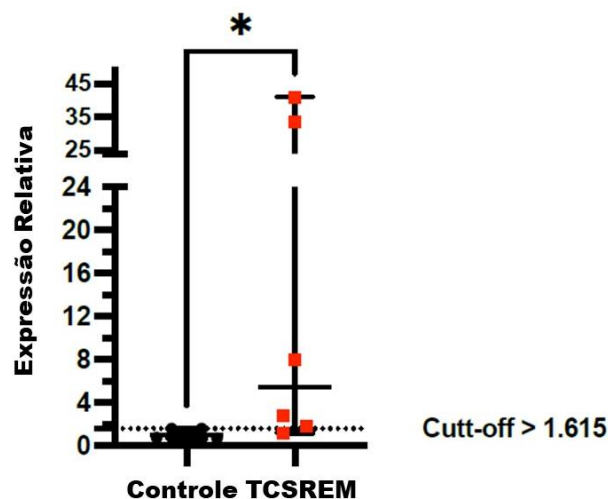


Figura 7. Comparação da expressão relativa de miR-7 entre grupo com TCSREMI e controles saudáveis. Expressão relativa do alvo miR-7 nos grupos estudados: controles saudáveis e pacientes TCSREMI. A expressão relativa de miR-7 foi determinada por RT-qPCR, e expressa segundo o método de $\Delta\Delta Ct$. * $p < 0,05$, Teste U de Mann-Whitney

Os resultados de miR-19b, diferentemente de miR-7, ensejam um bom tema para discussão. Esse alvo entrou no escopo do estudo na fase de levantamento bibliográfico, na qual foi identificado o trabalho de Ruben-Santiago et al. publicado em 2015. Nesse trabalho foi demonstrado que ao longo de diversos anos, pacientes com TCSREMI, monitorados em um hospital de Barcelona apresentavam uma redução nos níveis periféricos de miR-19b após fenotransição em doença de Parkinson (46).

Esse estudo, entretanto, foi refutado posteriormente pelo mesmo grupo que o produziu (44). Nesse novo estudo foi verificado o oposto do que foi observado no primeiro trabalho, com um aumento na expressão periférica de miR-19b. Tal observação revela a importância de uma adequada padronização do método de qPCR, evidenciando-se a geração de dados que não correspondem ao perfil real de expressão gênica nos indivíduos.

Nos nossos ensaios, o que foi visto, independente da metodologia para qPCR usada, foi uma redução numérica do Ct quando comparamos o grupo TCSREMI com o grupo controle, o que indica aumento na expressão desse miRNA no primeiro grupo em relação ao segundo, dado que concorda com achados da segunda publicação do grupo de Iranzo et al. (75).

Essa interpretação discordante entre trabalhos do mesmo grupo demonstra a dificuldade no trabalho com amostras de sangue, cujo material genético é pouco abundante, e o rigor que deve ser aplicado na escolha das metodologias de qPCR e controles endógenos.

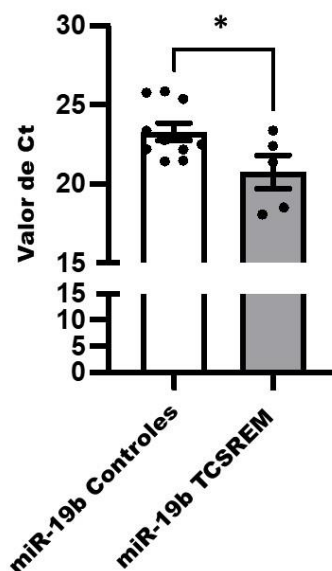


Figura 8. Valores de Ct de miR-19b. Valores de Ct do alvo miR-19b. Análise dos valores de Ct de miR-19b, determinado por RT-qPCR, em amostras de soro de indivíduos controles sadios e pacientes diagnosticados com TCSREMi. * $p < 0,05$, teste U de Mann-Whitney.

Prosseguiu-se então para o tratamento usando a metodologia do $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (57), como descrito anteriormente na seção de material e métodos, para análise da expressão relativa do alvo miR-19b nos grupos experimentais.

Consistente com o observado no comparativo de Ct, miR-19b apresentou-se expresso de forma elevada no grupo de pacientes com TCSREMi, quando comparados com controles sadios (Figura 8). A expressão desse alvo foi 2,89 vezes maior no grupo onde a doença estava presente (mediana da expressão relativa do grupo TCSREMi=3,725 versus 1,290 para o grupo controle), uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Um valor de *cut-off*, utilizando máxima verossimilhança estatística ou o parâmetro de máxima verossimilhança como descrito anteriormente, valor de 5,0, capaz de confirmar o diagnóstico de pessoas com TCSREMi foi definido como $>1,925$.

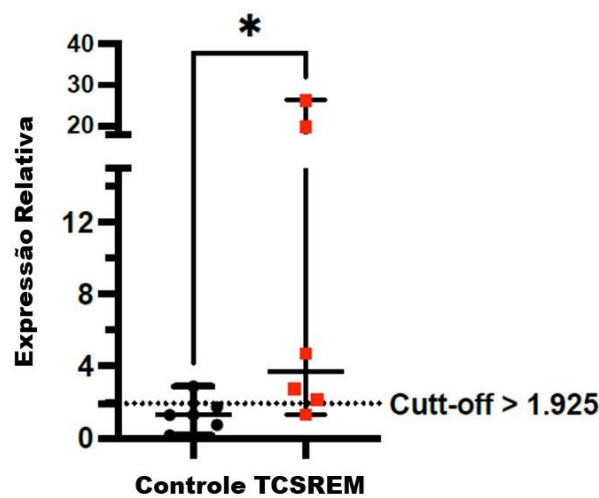


Figura 9. Expressão relativa de miR-19b entre os grupos Controle sadio e TCSREMI. Expressão relativa do alvo miR-19b nos grupos estudados: controles sadios e pacientes TCSREMI. A expressão relativa de miR-19b foi determinada por RT-qPCR, e expressa segundo o método $\Delta\Delta C_t$. * $p < 0,05$, teste U de Mann-Whitney.

Finalmente, compilou-se os dois dados de expressão relativa em conjunto, miR-7 e miR-19b, verificou-se que os níveis combinados de expressão dos alvos estavam aumentados no grupo de pacientes com TCSREMI quando comparado com o grupo de controles sadios, dado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Com base nessa combinação, foi determinado *cut-off* $> 1,840$, utilizando a razão de verossimilhança, para diferenciar os dois grupos, um valor base caso um possível teste molecular venha a ser desenvolvido com base nos resultados apresentados.

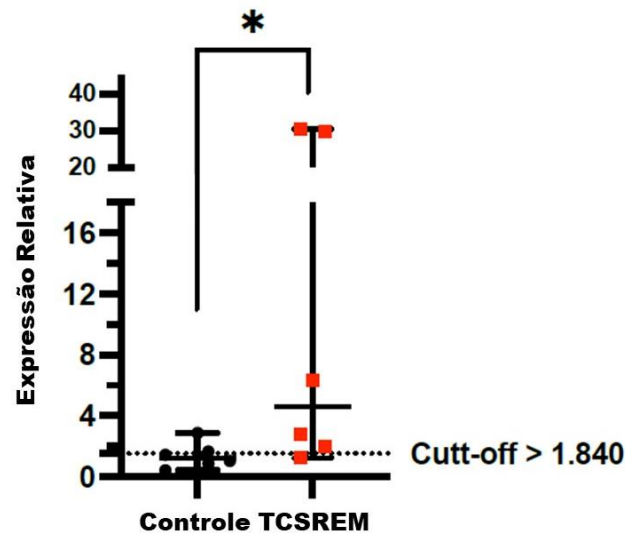


Figura 10. Comparativo entre os grupos experimentais usando a expressão relativa combinada dos alvos miR-7 e miR-19b. Comparativo entre os dois grupos experimentais em relação a expressão relativa dos dois alvos analisadas de forma combinada, miR-7 e miR-19b. Expressão relativa de miR-7 e miR-19b, combinados, determinada por RT-qPCR, e expressa segundo o método $\Delta\Delta Ct$. * $p < 0,05$, teste U de Mann-Whitney

4.4. Curva ROC

Os dados produzidos via qPCR mostraram diferença significativa na expressão de miR-7 e miR-19b, assim demonstrando expressão diferenciada de miRNAs em pacientes com TCSREMi quando comparados com controles saudáveis. Contudo, faz-se necessário examinar parâmetros adicionais, incluindo a acurácia, sensibilidade e especificidade do ensaio. Assim, é necessário examinar-se a correlação entre os valores de expressão relativa e a condição fisiológica do indivíduo experimental em questão, mediante metodologia da curva ROC como ferramenta estatística.

Originalmente desenvolvida na Segunda Guerra Mundial como uma estratégia para melhorar a detecção de sinais de radar, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) é um teste de classificação binária com o objetivo de criar um melhor valor preditivo ao classificar um elemento entre verdadeiro ou falso segundo os critérios escolhidos (76). Inicialmente, especialistas de radar usavam esse método para distinguir sinais que fossem meras interferências (e.g., pássaros, peixes e outros elementos interferentes) de sinais referentes a embarcações inimigas, o verdadeiro objeto de interesse de suas observações. Nos anos seguintes, essa metodologia foi rapidamente adotada para avaliar a acurácia de testes diagnósticos devido à sua capacidade de determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia

do teste, além da capacidade de determinar verdadeiros positivos e verdadeiros negativos nesses testes (76).

Ao se executar a análise da curva ROC, um gráfico é produzido. A área abaixo da linha do gráfico desenhado é chamada de AUC (*Area under the curve*), uma representação gráfica da chance de o teste analisado apresentar um verdadeiro positivo ou verdadeiro negativo; em resumo, a sua acurácia. Assim, quanto maior a AUC resultante, mais confiável é o resultado do teste em questão. Com base nisso, realizamos a análise da curva ROC de cada um dos alvos do estudo.

Um teste “ideal” teria como valor 1,0, correspondendo a 100% de acurácia em determinar se o paciente em questão é ou não portador da doença investigada, ou se apresenta determinado biomarcador alterado em amostras biológicas. Logicamente, isso é apenas um ideal; testes reais têm um valor preditivo mais baixo em vários casos e, mesmo assim, são considerados válidos. Ao analisar os resultados produzidos em relação ao alvo miR-7, obteve-se um valor de AUC de 0,93, bem próximo do valor ideal, o que nos permite afirmar que o miR-7 é um bom marcador para identificar indivíduos com TCSREMi. O valor foi estatisticamente relevante, com $p = 0,0176$.

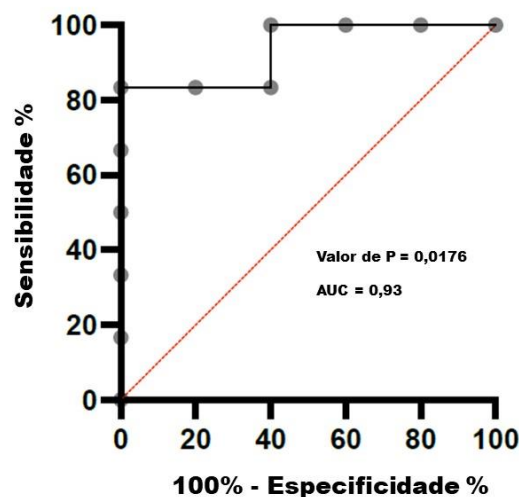


Figura 11. Análise do alvo miR-7 usando a metodologia da Curva ROC. Gráficos de curva ROC analisando o alvo miR-7. AUC produzida foi de 0,93, com $p=0,0176$.

Após o resultado bastante positivo obtido em relação ao miR-7, seguiu-se para a análise de miR-19b, alvo amplamente estudado pelo grupo de pesquisa do professor Alejandro Iranzo (Universidade de Barcelona). O objetivo foi de determinar se este também seria um alvo

acurado ou preciso para identificar expressão genética diferenciada em indivíduos clinicamente diagnosticados com TCSREMi. Assim como ocorreu para miR-7, o alvo miR-19b produziu um valor de AUC elevado, o que o caracteriza como um bom alvo para um teste molecular. O valor de AUC foi de 0,89, com $p = 0,025$. Esses dados demonstram a confiabilidade dos alvos escolhidos no estudo e seu potencial para um futuro teste molecular capaz de auxiliar no diagnóstico do TCSREMi.

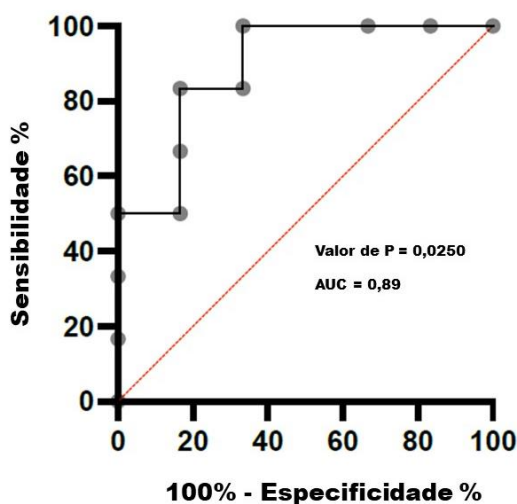


Figura 12. Análise do alvo miR-19b usando a metodologia da Curva ROC. Gráficos de curva ROC analisando o alvo miR-19b. AUC produzida foi de 0,89, com $p=0,025$.

Mesmo levando em conta os altos resultados produzidos individualmente pelos alvos do estudo, levantou-se o questionamento de que uma combinação dos dois alvos poderia gerar uma assinatura mais precisa. Assim realizou-se uma análise de curva ROC combinada de miR-7 e miR-19b. Foi obtido um valor de AUC inferior ao produzido pelas análises individuais, com AUC de 0,86, porém mantendo a significância estatística, valor de $p = 0,0374$. Entretanto, devemos considerar duas observações em relação a esse resultado. Primeiramente, o resultado da análise apresenta uma acurácia interessante para um teste molecular. Em segundo lugar, testes moleculares com um único elemento podem estar abertos a falhas metodológicas, já que examinam um único alvo. Dessa forma, buscar assinaturas múltiplas representa um caminho mais seguro, independentemente de a análise conjunta de miR-7 e miR-19b não apresentar resultados melhores que os obtidos com as análises individuais dos alvos.

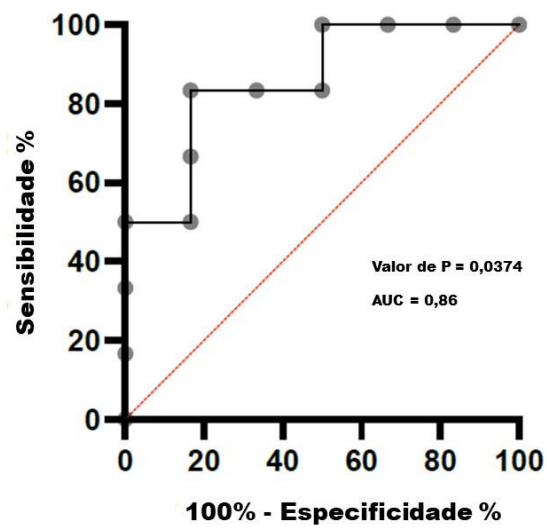


Figura 13. Análise combinada dos alvos miR-7 e miR-19b usando a metodologia da Curva ROC. Gráfico de curva ROC analisando os alvos miR-7 e miR-19b de forma combinada. AUC produzida foi de 0,86, com $p=0,0374$.

5. DISCUSSÃO

É possível resumir a relevância desta tese de doutorado em dois pontos principais: a validação de um teste molecular utilizando sangue periférico de pacientes brasileiros com miRNAs e o resultado obtido ao usar os miRNAs alvos para determinar expressão gênica diferenciada em indivíduos com TCSREMi isolado, definido clinicamente, em relação aos indivíduos controles.

Ao pesquisar a associação entre TCSREMi e miRNAs no banco de dados PubMed, apenas 20 resultados são exibidos, o que indica uma escassez de conhecimento científico sobre esse aspecto da fisiologia da patologia. Schenck, em sua publicação mais recente, destacou os miRNAs como uma das prioridades para a pesquisa sobre TCSREMi, o que sublinha a relevância do tema. Esse fato evidencia a lacuna existente, dada a escassez de material disponível sobre o assunto (54).

A lacuna no estudo da associação entre TCSREMi e miRNAs torna-se ainda mais evidente quando comparamos com as sinucleinopatias, como a doença de Parkinson (DP), que apresenta 1310 resultados na busca por miRNAs, enquanto a atrofia de múltiplos sistemas (MSA) conta com 85 resultados e a demência com corpos de Lewy (DCL) possui 54 resultados. Esse dado, por si só, já torna o estudo desenvolvido relevante. É interessante destacar que a estratégia adotada aqui é uma via de pesquisa adotada por outras equipes em diferentes populações, o que evidencia o crescente interesse no assunto e seu potencial.

Em 2024, Li e colaboradores realizaram estudos com o objetivo de identificar biomarcadores não invasivos para a intervenção precoce na doença de Parkinson (DP). Assim como no presente estudo, os pesquisadores optaram por utilizar pacientes com TCSREMi para diagnóstico por meio de NGS (Next Generation Sequencing) de miRNAs. O estudo incluiu 56 pacientes com TCSREMi, 53 com DP e 60 indivíduos controles. A técnica de *machine learning* foi utilizada para analisar os dados de pacientes com TCSREMi durante uma média de 3,3 anos de acompanhamento, período em que o algoritmo demonstrou ser capaz de identificar os três grupos de estudo (77).

Outro estudo, conduzido pelo grupo de Yu e colaboradores em 2024, investigou pacientes com TCSREMi e indivíduos controles. Um total de 1203 participantes, entre pacientes com TCSREMi e controles, foram recrutados em 8 regiões da China para os testes. Ao analisar o

miR-44438 presente no plasma desses pacientes, foi possível detectar um aumento nos níveis do marcador em casos de sinucleinopatias. No entanto, não foi possível diferenciar a expressão dessa molécula entre pacientes com doença de Parkinson (DP) e aqueles com atrofia de múltiplos sistemas (MSA), indicando que esse marcador é eficaz apenas para a detecção de sinucleinopatias, mas não para a discriminação entre elas, ou seja, tem sensibilidade mas não possui especificidade adequada (78).

Essas publicações reforçam a relevância do primeiro ponto do trabalho, a validação de um teste molecular utilizando pacientes brasileiros, uma vez que, por mais que existam outros trabalhos semelhantes em outros países, cada população apresenta diferenças em certos aspectos genéticos, o que pode levar a diferentes prevalências de certas doenças (79), como, por exemplo, a prevalência de câncer de próstata em populações japonesas (80) e a prevalência de doença celíaca em determinadas populações devido à frequência de alelos HLA-DQ, principalmente nas populações europeias e norte-americana (81,82). De fato, com base na literatura produzida atualmente, é possível afirmar que existe um grande interesse em estudos que avaliam as diferenças genéticas dentro de diferentes populações como uma forma de auxiliar no combate a patologias e entender sua fisiologia (83,84), inclusive no estudo de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (85).

No entanto, o trabalho de Yu e colaboradores encontrou problemas em relação à diferenciação das sinucleinopatias com base na metodologia empregada, o que, se reproduzido nesta tese, poderia colocar em questão o segundo ponto de interesse: o resultado obtido ao usar esses miRNAs poderia identificar expressão gênica diferenciada em pacientes com TCSREMi em relação a indivíduos controle. Essa questão é de fundamental importância para a produção de um teste molecular válido, uma vez que, para produzir um laudo, seria necessário determinar se os resultados estão diretamente relacionados ao TCSREMi ou se, na verdade, são indicativos de um estudo sobre marcadores de neurodegeneração, como observado pelo grupo de Yu, e a relação com o TCSREMi pode ter sido mal interpretada.

Com esse questionamento em mente, buscamos analisar os trabalhos dos grupos espanhol e grego, que foram as principais referências para o presente estudo, para entender como esses grupos trataram esse questionamento. No caso do grupo espanhol, os estudos iniciais envolveram pacientes com Parkinson apresentando a mutação LRRK2. Dois estudos focaram nesse tema: o de Botta-Orfila, publicado em 2014, e o de Podlesniy, de 2019. O estudo de Botta-Orfila pode ser caracterizado como um *screening*, buscando miRNAs expressos de forma

aberrante nos pacientes. Dessa forma, ele também poderia ser alvo da mesma crítica levantada anteriormente, pois não existe um teste celular de hipótese, como o apresentado no estudo de Podlesniy, realizado posteriormente (69,86). Em relação ao trabalho com pacientes com TCSREMi, destaca-se o estudo publicado em 2015 por Fernández-Santiago, que pode ser considerado uma continuação direta da pesquisa apresentada em 2014 por Botta-Orfila, utilizando os mesmos alvos. Mais uma vez, poderia ser feita a crítica sobre se o efeito observado nos resultados é ou não um efeito direto da doença em estudo. Em 2022, o trabalho produzido por Soto tentou mitigar tais críticas, utilizando técnicas de *machine learning* (46,75).

O grupo do professor Doxakis, como mencionado anteriormente, também realizou estudos relacionando a doença de Parkinson (DP) e miRNAs. No artigo publicado em 2020, que explora '*brain-enriched*' miRNAs (ou seja, aqueles prevalentes no cérebro) como marcadores para disfunções no sistema nervoso, a forma de avaliação dos miRNAs não permite identificar de maneira categórica se os resultados observados são específicos da doença em estudo ou se poderiam ser um marcador para neurodegeneração em geral. No mesmo ano, o professor Doxakis publicou um artigo integrando diversos trabalhos com o objetivo de explorar a consistência dos resultados sobre a associação entre DP e miRNAs circulantes. O artigo sugere dificuldades na análise das informações produzidas e conclui pela necessidade de mais estudos na área, aproveitando os dados obtidos por meio da análise bioinformática (42,87).

A conclusão do professor Doxakis em seu artigo de 2020 pode trazer uma resposta prática para o questionamento levantado sobre a especificidade dos dados produzidos. De forma geral, mais estudos são necessários para avaliar a relação entre as patologias e as expressões aberrantes de miRNAs, embora esse seja um questionamento válido em diversos estudos, como o presente. É de fato algo complexo certificar a correlação entre elementos genéticos e patologias, porém isso não tira o mérito das inferências estatísticas produzidas em estudos iniciais, principalmente em relação a dados de populações locais (83).

A população brasileira tem ancestralidade única, sendo composta primariamente por três grupos de ancestrais: europeus, populações indígenas e africanos (88,89). Se analisarmos a quantidade de material produzido em relação à caracterização genética, essa população ainda tem uma quantidade inferior a 1000 publicações na plataforma PubMed quando pesquisados os termos "*genetic characterization of brazilian population*", uma lacuna não tão grande quanto a de material produzido sobre a associação de miRNAs e TCSREMi, mas ainda uma lacuna no conhecimento, o que gera relevância para estudos abordando o assunto, como a presente tese

de doutorado. De fato, o único trabalho resultante na pesquisa dos termos “miRNA”, “iRBD” e “Brazil” é o artigo de revisão de nosso grupo, publicado no decorrer desta tese em 2021 (10).

Até o momento discutimos o mérito em si da pesquisa realizada, não obstante, os dados produzidos também são de interesse, e trazem mérito por si só para o trabalho. Trabalhos explorando a associação entre o miR-7 e o TCSREMi são escassos, porém, ao considerar o transtorno como uma fase prodromal da DP, uma visão evidentemente simplista, mas útil para uma análise pontual, podemos buscar nas publicações produzidas sobre DP e o miR-7 um parâmetro para discutirmos os dados produzidos.

Nesse estudo, demonstramos que o miR-7 está expresso de forma aumentada no grupo TCSREMi+/DP– em relação aos indivíduos controles, 5,39 vezes mais expresso (mediana da expressão relativa do grupo TCSREMi=5,44 versus 1,010 para o grupo controle). Esse dado é coerente com o visto para Parkinson pelo grupo de Citterio e colaboradores em 2023, que, ao estudar 45 pacientes com DP e 49 indivíduos controles com idade e gêneros pareados com os indivíduos afetados, encontraram níveis de miR-7 significativamente elevados no plasma desses pacientes em relação a controles saudáveis e determinaram, pelo método da curva ROC, que a expressão desse alvo foi diferente entre os dois grupos examinados, usando a combinação entre miR-7 e miR-223-3P. Esse trabalho também analisou o nível sérico de α -sinucleína, de forma a correlacionar tal dado com o nível de miR-7, concluindo que existe potencial nesse miRNA como biomarcador não invasivo para DP (90). O grupo de Cao e colaboradores também produziu dados concordantes sobre a expressão do miR-7 e a DP ao analisar o modelo animal de ratos tratados com MPP+, modelo para parkinsonismo. Ao investigar a neuroinflamação produzida nesse modelo, após indução de injúria com o MPP+, o grupo analisou o gene SNHG1 (*Small nucleolar RNA host gene 1*) como um marcador para neuroinflamação. O estudo mostrou que a expressão desse fator estava inversamente relacionada com o miR-7, ou seja, SNHG mostrou-se diminuído enquanto miR-7 apresentou valores aumentados na injúria por MPP+ (91). Curiosamente, esse achado em modelo animal é discordante com trabalho anterior do grupo de pesquisa da presente tese de doutorado, que encontrou o miR-7 com expressão diminuída em ratos com lesão induzida pelo modelo de rotenona (72). Trata-se de toxina com estrutura química distinta em relação à molécula de MPP+, apesar de que ambas toxinas atuam na mitocôndria. Ademais, tal discordância poderia ser devido à análise feita pelo nosso grupo ter sido do material proveniente do estriado dos ratos com parkinsonismo induzido por MPP, diferente do observado no trabalho do grupo de Cao (72). Tal interpretação também concorda

com os achados do grupo do professor Doxakis, um dos pilares de sustentação para a escolha do miR-7 como alvo do estudo, onde, ao analisar 92 indivíduos saudáveis e 108 pacientes com DP idiopática, encontraram um *fold change* de 1,214 ($p=0,205$) ao comparar os dois grupos, o que sugere uma maior expressão de miR-7 nos pacientes em relação aos controles, apesar de o resultado não ter alcançado significância estatística (42). Esse resultado, entretanto, foi produzido utilizando o método de qPCR tradicional, o que pode ter comprometido o resultado, já que como demonstrado nessa tese o método tradicional pode ser ineficaz para a quantificação precisa de determinados miRNAs, sendo o método com pré-amplificação mais adequado, principalmente no caso do miR-7, alvo que foi usado nesse estudo e não produziu resultados confiáveis usando a metodologia tradicional.

Não obstante, a literatura não é homogênea em relação à relação entre miR-7 e a doença de Parkinson (DP). Outro estudo, de Wu e colaboradores, analisou o nível de expressão dos miRNAs miR-7, miR-153 e miR-223 em 75 pacientes com DP e 73 controles saudáveis, buscando diferenças estatísticas nos níveis de expressão e a distinção dos grupos experimentais usando a curva ROC. Esse grupo concluiu que os níveis plasmáticos de miR-153 e miR-223 estavam significativamente reduzidos ($p=0,006$ e $p<0,001$, respectivamente) em pacientes com DP em comparação aos controles, com relativa correlação utilizando a curva ROC (AUC de 63,1% e 86,2% para miR-153 e miR-223, respectivamente). No entanto, para os níveis de miR-7, esse grupo não encontrou nenhuma diferença estatística (92). Além disso, esse estudo discorda do observado neste trabalho e também com o grupo de Aaluri e colaboradores, ao investigar miRNAs associados com funções mitocondriais e DP, identificando um grupo de 17 miRNAs fundamentais para o funcionamento mitocondrial, promissores para o estudo da DP. Nesse estudo, o grupo concluiu que o miR-7 estava expresso de forma reduzida em pacientes com a patologia em relação a indivíduos saudáveis, ao contrário do observado nos trabalhos mencionados anteriormente. No entanto, vale ressaltar que esse estudo não analisou os níveis periféricos, ou seja, níveis de expressão no sangue periférico, o que pode ter contribuído para os resultados discordantes em relação ao miR-7 (93).

Essa divergência de opiniões justifica a importância de estudos sobre a associação do miR-7 e patologias neurodegenerativas, além de reforçar o que foi exposto anteriormente sobre as dificuldades na padronização dos resultados produzidos em estudos com material periférico (67).

Em relação ao outro alvo deste estudo, o miR-19b, a discussão dos dados em relação à literatura já foi iniciada durante a apresentação dos resultados. Conforme evidenciado, há discordância encontrada com os resultados publicados pelo grupo espanhol do professor Iranzo em sua primeira publicação (46), que também foi uma das bases utilizadas para a escolha dos alvos deste trabalho de doutorado, mas que utilizou a técnica de PCR convencional. Nesse trabalho, como meio para possibilitar o trabalho com os dados produzidos, todos os Cts acima de 33 foram tratados como 33, o que demonstra novamente a ineficiência do método tradicional de qPCR ao se trabalhar com amostras provenientes de sangue periférico, sendo necessário algum método alternativo, como o método com pré-amplificação usado nessa tese de doutorado. Quanto a estudo posterior do mesmo grupo (44), há concordância com nossos resultados. Os achados desse segundo estudo indicam que o miR-19b está expresso de forma elevada nos pacientes com TCSREMI em comparação aos controles saudáveis, 2,89 vezes maior, para ser exato. Assim, nossos resultados corroboram os achados de Soto e colaboradores, que analisaram amostras séricas de 17 pacientes com TCSREMI e DaT (Transportador de Dopamina) negativo, avaliado por tomografia computadorizada de emissão de fóton único, 21 pacientes com TCSREMI com DaT positivo, 13 pacientes com TCSREMI fenotipizados para DCL e 20 controles saudáveis. Nesse trabalho, o grupo determinou que o nível sérico de miR-19b estava aumentado em relação aos controles, refutando os achados do estudo anterior do mesmo grupo, em 2015, onde esse miRNA foi encontrado reduzido no soro dos pacientes (44,46). Como já foi reiterado nessa tese, devido à escassez de material no sangue periférico, é imperativo a utilização de técnicas com alta precisão. O trabalho mais recente do grupo do professor Iranzo utiliza, assim como o trabalho desenvolvido nessa tese, técnica com pré-amplificação do material inicial, o que influenciou o resultado de tal forma a gerar uma interpretação diametralmente oposta do que foi visto inicialmente.

Novamente, devido à escassez de publicações sobre a associação de miR-19b com o TCSREMI, utilizamos publicações sobre a associação desse miRNA com a DP como um parâmetro para discussão. Observa-se discordância entre os resultados na literatura, assim como foi visto com o miR-7. O trabalho do grupo de Wu e colaboradores analisou 50 pacientes com DP e 50 controles pareados por idade e gênero, com o objetivo de determinar o potencial do miR-19b como biomarcador para DP, utilizando RT-qPCR em amostras séricas e avaliando o potencial diagnóstico com a curva ROC. O resultado foi que o miR-19b estava expresso de forma reduzida ao comparar os pacientes com a patologia e os controles, com AUC de 77,9% na análise da curva ROC (94). Por outro lado, o grupo de Rai e colaboradores, ao analisar 48

amostras de indivíduos (16 de pacientes com DP e controles jovens pareados), não encontrou diferença estatística entre o material quantificado nas amostras extracelulares isoladas em relação ao miR-19b, identificando o miR-23b como um potencial biomarcador capaz de distinguir os grupos experimentais (95). Em relação a publicações utilizando miR-19b como marcador em modelos celulares, o grupo de Liu e colaboradores trabalhou com células SH-SY5Y, com base no papel do miR-19b em doenças no Sistema Nervoso. Ao expor as células à neurotoxina MPP⁺ como modelo celular de injúria para estudo de DP, observaram uma redução no nível de expressão de miR-19b. O grupo levantou a possibilidade de que o efeito neuroprotetor visto em células com maior expressão de miR-19b poderia estar envolvido com a via celular HAPLN4/MAPK em células SH-SY5Y (96).

Entretanto, existem trabalhos associando níveis periféricos elevados de miR-19b com a progressão da DP. Um estudo de Chis e colaboradores, ao analisar o nível de expressão de miR-19b no plasma de pacientes com DP, indica que existe uma correlação entre o aumento da expressão desse miRNA e o tratamento com levodopa (97).

Existe na literatura uma quantidade muito limitada de trabalhos relacionando miRNAs com o TCSREMi, praticamente nenhum se considerarmos a população brasileira. Portanto, o estudo apresentado neste trabalho tem grande relevância para expandir o conhecimento científico sobre o tema.

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado demonstrou que o kit de extração miRNeasy Serum/Plasma Advanced proporciona um rendimento superior na purificação de RNA de soro, embora o kit tradicional, miRNeasy Serum/Plasma, também forneça um rendimento adequado. Além disso, a análise dos resultados de Ct indicou que o método de qPCR com o sistema Advanced é mais indicado do que o método tradicional, que se mostrou inapropriado para lidar com amostras de sangue para o miR-7, devido aos valores de Ct acima ou próximos do limite aceitável de 35.

Os resultados do qPCR para miR-7 e miR-19 revelaram uma diferença estatisticamente significativa, com maior expressão em pacientes afetados por TCSREMi em comparação com os controles saudáveis, o que sugere a possibilidade de desenvolver um exame molecular para identificar expressão gênica diferenciada em pacientes com TCSREMi em relação a indivíduos controle. Além disso, a análise da Curva ROC mostrou que os alvos miR-7 e miR-19 têm acurácia significativa para identificar expressão gênica diferenciada em pacientes diagnosticados com TCSREMi, indicando um exame molecular potencial a ser testado em estudos multicêntricos com uma amostragem maior de indivíduos.

Quanto às limitações do estudo, pode-se questionar se o biomarcador possui especificidade para discriminar a expressão gênica de pacientes com TCSREMi daqueles pacientes com outros distúrbios neurodegenerativos, bem como se os dados atuais seriam confirmados em novas coortes com maior número experimental, aspectos que suscitam a necessidade de estudos posteriores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature* [Internet]. 2018;561(7721):45–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>
2. Kemoun P, Ader I, Planat-Benard V, Dray C, Fazilleau N, Monsarrat P, et al. A gerophysiology perspective on healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 2022;73(November 2021).
3. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem DR. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018;8(s1):S3–8.
4. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord.* 2017;32(9):1264–310.
5. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2021;20(5):385–97.
6. Steiner JA, Quansah E, Brundin P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. *Cell Tissue Res.* 2018;373(1):161–73.
7. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2002/12/25. 2003;24(2):197–211.
8. Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull.* 2017;33(5):585–97.
9. Postuma RB, Berg D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2016/10/28. 2016;12(11):622–34.
10. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS, Ferreira GG, Brito Silva AP, de Paula Brandão PR, Oertel WH, et al. microRNA signatures in prodromal REM sleep behavior disorder and early Parkinson's disease as noninvasive biomarkers. *Sleep Med.* 2021;78:160–8.
11. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 2004 Oct;318(1):121–34.
12. Del Tredici K, Braak H. Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016 Feb;42(1):33–50.
13. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U.

- Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*. 2002 Oct;249 Suppl:III/1-5.
14. Schenck CH, Bundlie SR, Ettinger MG, Mahowald MW. Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep*. 1986/06/01. 1986;9(2):293–308.
 15. Postuma RB, Gagnon J-F, Bertrand J-A, Génier Marchand D, Montplaisir JY. Parkinson risk in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* [Internet]. 2015;84(11):1104 LP – 1113. Available from: <http://n.neurology.org/content/neurology/84/11/1104.full.pdf%0Ahttp://n.neurology.org/content/84/11/1104.abstract>
 16. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, During Sleep. *Science* (80-). 1953;118(3062):273–4.
 17. Le Bon O. Relationships between REM and NREM in the NREM-REM sleep cycle: a review on competing concepts. *Sleep Med* [Internet]. 2020;70:6–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2020.02.004>
 18. Olson EJ, Boeve BF, Silber MH. Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases. *Brain*. 2000;123 (Pt 2:331–9.
 19. Rolinski M, Szewczyk-Krolikowski K, Tomlinson PR, Nithi K, Talbot K, Ben-Shlomo Y, et al. REM sleep behaviour disorder is associated with worse quality of life and other non-motor features in early Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(5):560–6.
 20. Sobreira-Neto MA, Pena-Pereira MA, Sobreira EST, Chagas MHN, de Almeida CMO, Fernandes RMF, et al. REM sleep behavior disorder in patients with Parkinson's disease: clinical and polysomnographic characteristics. *Sleep Biol Rhythms*. 2019;17(1).
 21. Del Tredici K, Braak H. Dysfunction of the locus coeruleus-norepinephrine system and related circuitry in Parkinson's disease-related dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(7):774–83.
 22. Jouvet M. Paradoxical Sleep - A Study of its Nature and Mechanisms. *Prog Brain Res*. 1965;18(C):20–62.
 23. Tachibana N. Historical overview of REM sleep behavior disorder in relation to its pathophysiology. *Brain and Nerve*. 2009 May;61(5):558–68.
 24. Giannini G, Provini F, Cortelli P, Calandra-Buonaura G. REM Sleep Behaviour Disorder in Multiple System Atrophy: From Prodromal to Progression of Disease. *Front Neurol*.

- 2021 Jun;12.
25. Sobreira-Neto MA, Stelzer FG, Gitaí LLG, Alves RC, Eckeli AL, Schenck CH. REM sleep behavior disorder: update on diagnosis and management. *Arq Neuropsiquiatr.* 2023;81(12):1179–94.
 26. Sobreira-Neto MA, Pena-Pereira MA, Sobreira EST, Chagas MHN, Fernandes RMF, Tumas V, et al. High Frequency of Sleep Disorders in Parkinson's Disease and Its Relationship with Quality of Life. *Eur Neurol.* 2017;78(5–6).
 27. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Charland K, Montplaisir J. Manifestations of Parkinson disease differ in association with REM sleep behavior disorder. *Mov Disord.* 2008;23(12):1665–72.
 28. Kulcsarova K, Skorvanek M, Postuma RB, Berg D. Defining Parkinson's Disease: Past and Future. *J Parkinsons Dis.* 2024;14:1–15.
 29. Postuma RB, Berg D. Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come. *Mov Disord.* 2019;34(5):665–75.
 30. Valera E, Masliah E. Therapeutic approaches in Parkinson's disease and related disorders. *J Neurochem.* 2016/01/11. 2016;139 Suppl:346–52.
 31. Olanow CW, Kieburtz K, Katz R. Clinical approaches to the development of a neuroprotective therapy for PD. *Exp Neurol.* 2017/06/18. 2017;298(Pt B):246–51.
 32. Grazina R, Massano J. Physical exercise and Parkinson's disease: Influence on symptoms, disease course and prevention. *Rev Neurosci.* 2013;24(2).
 33. Mak MKY, Wong-Yu ISK. Exercise for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2019/10/15. 2019;147:1–44.
 34. Ellis TD, Colon-Semenza C, DeAngelis TR, Thomas CA, Hilaire MS, Earhart GM, et al. Evidence for Early and Regular Physical Therapy and Exercise in Parkinson's Disease. *Semin Neurol.* 2021/03/21. 2021;41(2):189–205.
 35. Ardekani AM, Naeini MM. The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2010;2(4):161–79.
 36. Iftikhar H, Carney GE. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *BioEssays.* 2016;38(4):367–78.
 37. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;116(116):843–54.
 38. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

- 2014;15(8):509–24.
39. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *MicroRNA Profiling Methods Protoc Methods Mol Biol.* 2017;1509:37–46.
 40. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018/08/16. 2019;20(1):21–37.
 41. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Gene Ther.* 2018;18(3):143–53.
 42. Ravanidis S, Bougea A, Papagiannakis N, Maniati M, Koros C, Simitsi AM, et al. Circulating Brain-enriched MicroRNAs for detection and discrimination of idiopathic and genetic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2019/12/05. 2020;35(3):457–67.
 43. Ravanidis S, Bougea A, Karampatsi D, Papagiannakis N, Maniati M, Stefanis L, et al. Differentially Expressed Circular RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021/01/13. 2021;36(5):1170–9.
 44. Soto M, Iranzo A, Lahoz S, Fernandez M, Serradell M, Gaig C, et al. Serum MicroRNAs Predict Isolated Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Lewy Body Diseases. *Mov Disord.* 2022/08/14. 2022;37(10):2086–98.
 45. Botta-orfila T, Morat X, Compta Y, Jos J, Valldeoriola F, Pont-sunyer C, et al. Identification of Blood Serum Micro-RNAs Associated With Idiopathic and LRRK2 Parkinson ' s Disease. 2014;00(February).
 46. Fernandez-Santiago R, Iranzo A, Gaig C, Serradell M, Manel F, Tolosa E, et al. MicroRNA Association with Synucleinopathy Conversion in Rapid Eye Movement Behavior Disorder. 2015;895–901.
 47. Junn E, Lee KW, Byeong SJ, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):13052–7.
 48. Morales-Martínez M, Vega MI. Role of MicroRNA-7 (MiR-7) in Cancer Physiopathology. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16).
 49. Han S, Zhang T, Kusumanchi P, Huda N, Jiang Y, Liangpunsakul S, et al. Role of microRNA-7 in liver diseases: A comprehensive review of the mechanisms and therapeutic applications. *J Investig Med.* 2020;68(7):1208–16.
 50. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol.* 2017;219(2):346–61.
 51. Li X, Teng C, Ma J, Fu N, Wang L, Wen J, et al. miR-19 family: A promising biomarker and therapeutic target in heart, vessels and neurons. *Life Sci.* 2019;232(July).

52. Fang LL, Wang XH, Sun BF, Zhang XD, Zhu XH, Yu ZJ, et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40(6):1624–30.
53. Mayo S, Benito-León J, Peña-Bautista C, Baquero M, Cháfer-Pericás C. Recent Evidence in Epigenomics and Proteomics Biomarkers for Early and Minimally Invasive Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2020;19(8):1273–303.
54. Schenck CH. REM sleep behaviour disorder (IRBD): Personal perspectives and research priorities. *J Sleep Res*. 2024;(February):1–16.
55. Scalón MC, Martins CS, Ferreira GG, Schlemmer F, de Almeida RT, Paludo GR. miR-20a is upregulated in serum from domestic feline with PKD1 mutation. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(12 December):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0279337>
56. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. 2001;408:402–8.
58. Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting. *Life*. 2021;11(6):1–22.
59. Chiam K, Mayne GC, Wang T, Watson DI, Irvine TS, Bright T, et al. Serum outperforms plasma in small extracellular vesicle microRNA biomarker studies of adenocarcinoma of the esophagus. *World J Gastroenterol*. 2020;26(20):2570–83.
60. Dufourd T, Robil N, Mallet D, Carcenac C, Boulet S, Brishoual S, et al. Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biol Methods Protoc*. 2019;4(1):1–10.
61. Timmerman DM, Gillis AJM, Mego M, Looijenga LHJ. Comparative analyses of liquid-biopsy microrna371a-3p isolation protocols for serum and plasma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17):1–15.
62. Sriram H, Khanka T, Kedia S, Tyagi P, Ghogale S, Deshpande N, et al. Improved protocol for plasma microrna extraction and comparison of commercial kits. *Biochem Medica*. 2021;31(3):1–9.
63. Kurvits L, Lättekivi F, Reimann E, Kadastik-Eerme L, Kasterpalu KM, Kõks S, et al.

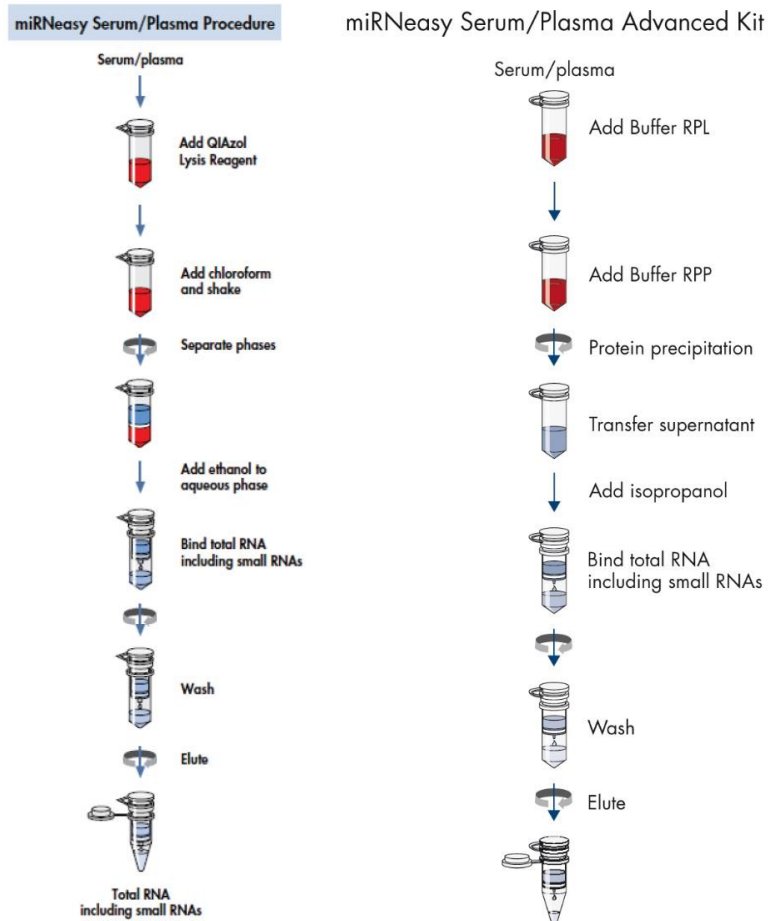
- Transcriptomic profiles in Parkinson's disease. *Exp Biol Med*. 2021;246(5):584–95.
64. Calligaris R, Banica M, Roncaglia P, Robotti E, Finaurini S, Vlachouli C, et al. Blood transcriptomics of drug-naïve sporadic Parkinson's disease patients. *BMC Genomics* [Internet]. 2015;16(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2058-3>
 65. Acharya S, Lumley AI, Zhang L, Vausort M, Devaux Y. GATA3 as a Blood-Based RNA Biomarker for Idiopathic Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12).
 66. Zhao Z, Li F, Ning J, Peng R, Shang J, Liu H, et al. Novel compound FLZ alleviates rotenone-induced PD mouse model by suppressing TLR4/MyD88/NF- κ B pathway through microbiota–gut–brain axis. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021;11(9):2859–79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.020>
 67. Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, et al. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front Genet*. 2019;10(July).
 68. Pont-Sunyer C, Iranzo A, Gaig C, Fernández-Arcos A, Vilas D, Valldeoriola F, et al. Sleep disorders in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 mutation carriers. *PLoS One*. 2015;10(7):1–20.
 69. Botta-Orfila T, Morató X, Compta Y, Lozano JJ, Falgàs N, Valldeoriola F, et al. Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and *LRRK2* Parkinson's disease. *J Neurosci Res*. 2014 Aug;92(8):1071–7.
 70. Dauvilliers Y, Schenck CH, Postuma RB, Iranzo A, Luppi P-H, Plazzi G, et al. REM sleep behaviour disorder. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Dec;4(1):19.
 71. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of α -synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem*. 2010;285(17):12726–34.
 72. Horst CH, Schlemmer F, de Aguiar Montenegro N, Domingues ACM, Ferreira GG, da Silva Ribeiro CY, et al. Signature of Aberrantly Expressed microRNAs in the Striatum of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats. *Neurochem Res* [Internet]. 2018;43(11):2132–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-018-2638-0>
 73. Starhof C, Hejl AM, Heegaard NHH, Carlsen AL, Burton M, Lilje B, et al. The biomarker potential of cell-free microRNA from cerebrospinal fluid in Parkinsonian Syndromes. *Mov Disord*. 2019 Feb;34(2):246–54.
 74. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Gene Ther*. 2018/05/02. 2018;18(3):143–53.
 75. Soto M, Iranzo A, Lahoz S, Fernández M, Serradell M, Gaig C, et al. Serum MicroRNAs Predict Isolated Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Lewy Body

- Diseases. *Mov Disord*. 2022;37(10):2086–98.
76. Junge MRJ, Dettori JR. ROC Solid: Receiver Operator Characteristic (ROC) Curves as a Foundation for Better Diagnostic Tests. *Glob Spine J*. 2018;8(4):424–9.
 77. Li Y, Cao Y, Liu W, Chen F, Zhang H, Zhou H, et al. Candidate biomarkers of EV-microRNA in detecting REM sleep behavior disorder and Parkinson's disease. *npj Park Dis*. 2024;10(1):1–11.
 78. Yu Z, Zheng Y, Cai H, Li S, Liu G, Kou W, et al. Molecular beacon–based detection of circulating microRNA-containing extracellular vesicle as an α -synucleinopathy biomarker. *Sci Adv*. 2024;10(20):1–11.
 79. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Division of Behavioral and Social Sciences and Education; Health and Medicine Division; Committee on Population; Board on Health Sciences Policy; Committee on the Use of Race, Ethnicity, and Ancestry and AI as PD in GR. Using Population Descriptors in Genetics and Genomics Research: A New Framework for an Evolving Field. *Natl Acad Collect Reports* funded by Natl Institutes Heal. 2023;
 80. Ishigaki K, Akiyama M, Kanai M, Takahashi A, Kawakami E, Sugishita H, et al. Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. *Nat Genet*. 2020;52(7):669–79.
 81. Almeida FC, Gandolfi L, Costa KN, Picanço MRA, Almeida LM, Nóbrega YKM, et al. Frequency of HLA-DQ, susceptibility genotypes for celiac disease, in Brazilian newborns. *Mol Genet Genomic Med*. 2018;6(5):779–84.
 82. Zingone F, Bai JC, Cellier C, Ludvigsson JF. Celiac Disease–Related Conditions: Who to Test? *Gastroenterology* [Internet]. 2024;167(1):64–78. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2024.02.044>
 83. Shi H, Mancuso N, Spendlove S, Pasaniuc B. Local Genetic Correlation Gives Insights into the Shared Genetic Architecture of Complex Traits. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2017;101(5):737–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.09.022>
 84. Hutchinson A, Asimit J, Wallace C. Fine-mapping genetic associations. *Hum Mol Genet*. 2020;29(R1):R81–8.
 85. Leung YY, Naj AC, Chou YF, Valladares O, Schmidt M, Hamilton-Nelson K, et al. Human whole-exome genotype data for Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2024;15(1):1–15.
 86. Podlesniy P, Puiggròs M, Serra N, Fernández-Santiago R, Ezquerra M, Tolosa E, et al. Accumulation of mitochondrial 7S DNA in idiopathic and LRRK2 associated

- Parkinson's disease. *EBioMedicine*. 2019;48:554–67.
87. Doxakis E. Cell-free microRNAs in Parkinson's disease: potential biomarkers that provide new insights into disease pathogenesis. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2020;58(January):101023. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101023>
 88. de Souza AM, Resende SS, de Sousa TN, de Brito CFA. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the brazilian population. *Genet Mol Biol*. 2019;42(3):495–508.
 89. Boquett JA, Bisso-Machado R, Zagonel-Oliveira M, Schüler-Faccini L, Fagundes NJR. HLA diversity in Brazil. *Hla*. 2020;95(1):3–14.
 90. Citterio LA, Mancuso R, Agostini S, Meloni M, Clerici M. Serum and Exosomal miR-7-1-5p and miR-223-3p as Possible Biomarkers for Parkinson's Disease. *Biomolecules*. 2023;13(5):1–10.
 91. Cao B, Wang T, Qu Q, Kang T, Yang Q. Long Noncoding RNA SNHG1 Promotes Neuroinflammation in Parkinson's Disease via Regulating miR-7/NLRP3 Pathway. *Neuroscience* [Internet]. 2018;388:118–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.019>
 92. Wu L, Xu Q, Zhou M, Chen Y, Jiang C, Jiang Y, et al. Plasma miR-153 and miR-223 Levels as Potential Biomarkers in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2022;16(May):1–8.
 93. Aaluri GR, Choudhary Y, Kumar S. Mitochondria-Associated MicroRNAs and Parkinson's Disease. *Neurosci Insights*. 2024;19.
 94. Jing Wu, Wei Cao, Wei Wei, Dandan Zhang, Xuezhong Li, Yi Wang XC. MiR-19b-3p Serves as a Potential Diagnostic Biomarker for Parkinson's Disease. *Clin Lab*. 2024;70(12).
 95. Rai S, Bharti PS, Singh R, Rastogi S, Rani K, Sharma V, et al. Circulating plasma miR-23b-3p as a biomarker target for idiopathic Parkinson's disease: comparison with small extracellular vesicle miRNA. *Front Neurosci*. 2023;17.
 96. Liu W, Geng L, Chen Y. MiR-19b alleviates MPP⁺-induced neuronal cytotoxicity: Via targeting the HAPLN4/MAPK pathway in SH-SY5Y cells. *RSC Adv*. 2018;8(19):10706–14.
 97. Chis AR, Moatar AI, Dijmarescu C, Rosca C, Vorovenci RJ, Krabbendam I, et al. Plasma hsa-mir-19b is a potential LevoDopa therapy marker. *J Cell Mol Med*. 2021;25(18):8715–24.

8. APÊNDICE

Figura 1. Procedimentos de uso dos kits miRNeasy Serum/Plasma e miRNeasy Serum/Plasma Advanced



Fonte: miRNeasy Serum/ Plasma Handbook, Qiagen e miRNeasy Serum/ Plasma Advanced Handbook, Qiagen.