



Ana Lúcia Carreira Marques

miRNAs como Biomarcadores e como Estratégias de Intervenção Terapêutica na Doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Fernando Morgado Pereira Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Lúcia Carreira Marques

miRNAs como Biomarcadores e como Estratégias de Intervenção Terapêutica na Doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Lúcia Carreira Marques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011158560, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

(Ana Lúcia Carreira Marques)

AGRADECIMENTOS

A concretização deste percurso só foi possível graças à colaboração de todos quantos de perto me acompanharam. Assim, desejo aqui expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Luís Almeida, o orientador da minha monografia, por todo o apoio e disponibilidade. Muito obrigado!

À Faculdade de Farmácia, por ter sido mais que uma instituição de ensino!
A todos os colaboradores Docentes e não Docentes!

Aos amigos de sempre e àqueles que Coimbra me proporcionou!

À minha família, pela presença constante, pelo apoio incondicional e por serem o meu alicerce.
Pela paciência e por nunca me terem deixado desistir.
Um sincero obrigada!

A todos vós, Obrigado *ab imo corde*.

Índice

Lista de Abreviaturas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
2. miRNAs	2
2.1. Expressão e Biogênese dos miRNAs	3
2.2. Mecanismo de Ação dos miRNAs.....	4
2.3. Regulação da Biogênese, da Expressão, da Função e da Degradação dos miRNAs.....	5
3. miRNAs e Neurodegenerescência	6
4. Doença de Alzheimer	7
4.1. Metabolismo do peptídeo A β	8
4.2. Metabolismo da proteína TAU	9
5. miRNAs e Doença de Alzheimer	10
5.1. miR-29	11
5.2. miR-15	12
5.3. miR-107	13
5.4. miR-146	13
5.5. miR-9	14
5.6. miR-101	14
5.7. miR-106	15
5.8. miR-144	15
5.9. miRNA let-7b	15
6. miRNAs como Biomarcadores da Doença de Alzheimer	16
6.1. Métodos de Diagnóstico recorrendo a miRNAs.....	16
6.2. Secreção dos miRNAs nos Biofluidos.....	18
6.3. Biofluidos como Fonte de miRNAs	18
7. Estratégias de Intervenção Terapêutica envolvendo miRNAs	20
7.1. miRNA <i>mimics</i>	20
7.2. anti-miRs.....	21
7.2.1. Antagomirs	21
7.2.2. “Esponjas” de miRNA	21
7.3. miRNA <i>masks</i>	22
8. Perspetivas Futuras	23
9. Bibliografia	25
10. Anexos	29

Lista de Abreviaturas

ADAM – *Metaloproteinase domain-containing protein*

AGO – Argonauta

APP – Proteína Precursora Amilóide

ASO – Oligonucleótido *antisense*

A β – β -amilóide

BACE1 – *β -site APP cleaving enzyme 1*

CFH – Complemento do Fator H

CNS – Sistema Nervoso Central

CSF – Líquido Céfalo-raquídeo

DA – Doença de Alzheimer

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FDA – Doença de Alzheimer Familiar

IRAK1 – *Interleukin-1 β -associated kinase-1*

miRNA – *microRNA*

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

Mv – Micro-vesícula

ncDNA – Ácido Desoxirribonucleico não Codificante

ncRNA – Ácido Ribonucleico não Codificante

NFT – Emaranhados Neurofilamentosos

PABP – Proteína de Ligação Poli-A

PHF – Filamento Helicoidal Emparelhado

Pol II – Polimerase II

Poli-A – Poliadenilada

pre-miRNA – miRNA precursor

pri-miRNA – miRNA primário

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SDA – Doença de Alzheimer Esporádica

UTR – Região não Traduzida

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa complexa constituindo a causa mais comum de demência na população idosa. Com o aumento da esperança média de vida e com a inexistência de uma cura, prevê-se que esta patologia se torne cada vez mais prevalente. A DA constitui um problema de saúde relevante, com pesados encargos sociais e económicos em todo o mundo. Têm por isso sido realizados grandes esforços de modo a desenvolver não só uma terapêutica efetiva, mas também um diagnóstico capaz de identificar a patologia antes do início dos danos neurológicos irreversíveis. Os tratamentos atualmente disponíveis apenas conseguem melhorar os sintomas, contudo não atrasando a progressão da DA. Os miRNAs são RNAs curtos (~22 nucleótidos), não codificantes, que medeiam a regulação pós-transcricional através do silenciamento génico. A investigação recente revelou que uma expressão anormal de miRNAs específicos pode ter um papel crucial no processo patológico da DA. Nesta monografia são analisados e discutidos os conhecimentos da expressão e da atividade desses miRNAs que podem ser potenciais biomarcadores e auxiliar no desenvolvimento de novas terapêuticas na DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, microRNAs, biomarcadores, alvos terapêuticos, estratégias terapêuticas envolvendo miRNAs.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia in the elderly. With the increase in longevity and the absence of a cure it is expected to become more prevalent. AD has become not only a major health problem but also a heavy social and economic burden worldwide. Consequently, efforts have been made to develop not only an effective therapeutic, but also a diagnostic approach capable of identifying AD before the onset of irreversible neurological damage. The available therapeutic treatments can only improve the symptoms but do not delay the progression of AD. MicroRNAs are non-coding short (~22 nucleotides) RNAs that mediate post-transcriptional regulation through sequence-specific gene silencing. Recent research revealed that abnormal expression of specific miRNAs could have a crucial role in the pathological process of AD. In this monograph, some of the knowledge over the expression and activity of such miRNAs that may be potential biomarkers and aid in the development of novel therapeutics is discussed and analysed.

Keywords: Alzheimer's Disease, microRNAs, biomarkers, therapeutic target, therapeutic strategies involving miRNAs.

I. Introdução

O dogma central da biologia molecular pressupõe a existência de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) que, posteriormente, são transcritas em moléculas de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) sendo estas traduzidas em proteínas (LODISH *et al.*, 2000). No entanto, a evolução respeitante à investigação científica nesta área colocou este dogma em questão pelo facto de alguns dos segmentos de DNA transcritos em mRNA precursor não serem necessariamente traduzidos em proteínas. Alternativamente, esses ácidos ribonucleicos (RNAs) apresentam funções atinentes ao processo de desenvolvimento, diferenciação, proliferação celular, morte celular, segregação dos cromossomas e metabolismo, procedendo igualmente a respostas em situações de *stress* e de estímulo ambiental a fim de conseguir manter a homeostase celular. Consequentemente, os segmentos de DNA que - ao invés de codificarem proteínas - exercem funções de regulação são designados de não-codificantes (APPASANI, *et al.*, 2007).

Apenas uma pequena porção do genoma humano transcrito, aproximadamente 1,5%, codifica proteínas. A restante porção é maioritariamente composta por DNA não-codificante (ncDNA), intrões e sequências com funções reguladoras que, posteriormente, serão transcritas em ácidos ribonucleicos não-codificantes (ncRNA) (AMARAL e MATTICK, 2008). Este último regula a maioria dos genes humanos e a sua descoberta suscitou uma melhor compreensão da expressão génica. O aparecimento de determinadas patologias encontra-se associado a irregularidades no funcionamento do ncRNA (APPASANI, *et al.*, 2007). Resultante de tal facto verifica-se, pois, um crescente interesse nestas moléculas de RNA visto serem elementos cruciais no que respeita à inovação/progresso científico decorrente do seu papel crucial na regulação do transcriptoma.

Assistimos assim ao aparecimento de um novo ramo da genómica cujos focos de estudo são a estrutura, função e processos do ncRNA da célula - RNomics. A maioria do genoma transcrito para ncRNA sofre *splicing* alternativo ou é processado em sequências mais pequenas. Até à data foram identificados dois tipos de ncRNA: os ncRNA longos e os ncRNA curtos. As técnicas de sequenciação de RNA mais avançadas revelaram inúmeros tipos de ncRNA curtos, sendo os três principais: *microRNAs* (miRNAs), *short interfering RNAs* (siRNAs) e *piwi-interacting RNAs* (piRNAs). Dentro do conjunto dos ncRNA curtos, os mais abundantes e mais estudados são os *microRNAs* (miRNAs) (KAIKKONEN *et al.*, 2011). Relacionando estes últimos com a Doença de Alzheimer (DA), são analisadas e discutidas, nesta monografia, as potencialidades destas moléculas no paradigma atual.

2. miRNAs

Os miRNAs, cujos precursores apresentam estrutura *stem-loop*, são moléculas de RNA de cadeia simples constituídos por 18-25 nucleótidos (nt), sendo previsível que estes regulem pelo menos metade do transcriptoma humano (HÜTTENHOFER *et al.*, 2005).

Surgiu deste modo um sub-ramo da RNomics, a microRNomics, que descreve a origem e o mecanismo de pequenos reguladores dos RNAs, bem como o seu envolvimento no desenvolvimento, na secreção de proteínas e na regulação génica. Este paradigma veicula que diferentes tipos de células desempenhem diferentes tipos de funções. O desenvolvimento e a rápida progressão da investigação na área dos miRNAs nos últimos anos permitiu uma compreensão da genómica a uma nova escala (APPASANI, *et al.*, 2007).

Em 1993, Victor Ambros descobriu o primeiro miRNA, o lin-4 que regula o lin-14 mRNA. Este miRNA não foi descoberto em humanos, mas sim no modelo animal *Caenorhabditis elegans*, um nemátoda que é usado na investigação do desenvolvimento animal (LEE, *et al.*, 1993). Entretanto, têm vindo a ser descobertos miRNAs no reino vegetal, em invertebrados, mamíferos e também humanos (BARTEL, 2009). Estas moléculas são conservadas pelos processos evolutivos, assim como os seus locais de ligação ao alvo, evidenciando assim a sua importância designadamente em termos de evolução das espécies (FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Estima-se que cada molécula de miRNA regule centenas de alvos diferentes, mRNAs, sendo que estes podem ser regulados por múltiplos miRNAs tendo em vista uma regulação diferencial pós-transcricional através do emparelhamento de bases, normalmente na região 3' não traduzida (UTR) (HOLMAN *et al.*, 2012). Tal implica que a ação de hibridização do miRNA seja específica da sequência nucleotídica e não específica do gene. Os miRNAs atuam através de mecanismos de silenciamento, através da clivagem das sequências de mRNAs ou através da repressão da tradução dessas moléculas de mRNA em proteínas (CARTHEW *et al.*, 2009). Desde então, as referidas moléculas têm sido intensamente estudadas, em particular como reguladores de doenças humanas. Uma expressão alterada de miRNAs pode estar associada ao desenvolvimento de doenças no ser humano. Por isso, o conhecimento dos mecanismos que regulam a expressão de cada miRNA individualmente é fundamental para se conhecer o mecanismo molecular da patologia (KAWAHARA e MIEDA-SATO, 2012).

Estudos recentes, neste campo do conhecimento, evidenciaram os miRNAs enquanto valiosas ferramentas para finalidades de diagnóstico, para uso como biomarcadores e como novas estratégias de intervenção, como potenciais alvos terapêuticos em diversas patologias (ALLEN e WEISS, 2010).

2.1. Expressão e Biogênese dos miRNAs

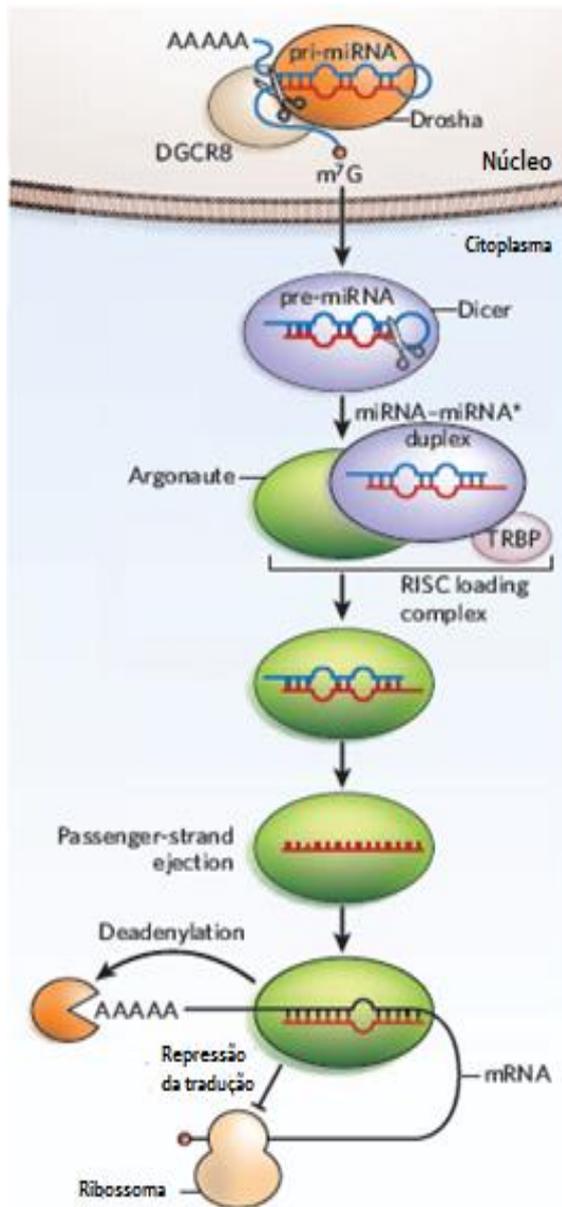


Figura 1 – Biogênese do miRNA.

Os miRNAs encontram-se codificados no genoma. Estes RNAs pequenos são transcritos de genes de miRNA endógenos como transcritos primários (pri-mRNAs), com estrutura de *stem-loop*. A estrutura de *hairpin* é removida no núcleo pelo complexo Droscha-DGCR8 e é gerado um precursor do miRNA (pre-miRNA). No citoplasma, a Dicer cliva o pre-miRNA, produzindo um miRNA-miRNA* duplex (onde miRNA identifica a *guide strand* e miRNA* a *passenger strand*). A *guide strand* é carregada na proteína Argonauta. Tipicamente, os miRNAs nos animais são apenas parcialmente complementares às sequências nas regiões 3' UTR do mRNA alvo e é esta falta de complementaridade que previne o alvo de ser clivado pela proteína Argonauta. Adicionalmente, algumas proteínas Argonauta envolvidas na via do miRNA não dispõem dos resíduos catalíticos necessários para a clivagem. O mecanismo do silenciamento mediado pelo miRNA ainda não se encontra completamente esclarecido, no entanto, pensa-se que ocorre pela repressão da tradução do mRNA alvo e remoção da cauda poliadenilada (*poli-A*) do mRNA, o que induz a degradação do mRNA. (JINEK e DOUDNA, 2009).

No núcleo (Figura 1), os ncRNAs - designados de miRNAs primários (pri-miRNA) - são transcritos de seqüências genômicas codificantes de miRNA pela RNA polimerase II (Pol II). De seguida, um complexo enzimático constituído por uma endonuclease do tipo RNase III (Droscha) e por um co-fator DGCR8, que reconhece o pri-miRNA, cliva as extremidades 5' e 3' da base da estrutura *stem-loop* dando origem ao miRNA precursor (pre-miRNA), com cerca de 70 nt (DENLI *et al.*, 2004).

A proteína Exportina-5 reconhece e transporta o pre-miRNA para o citoplasma. Aqui uma outra RNase III, designada Dicer, cliva o pre-miRNA e é criada uma dupla cadeia - miRNA duplex - com cerca de 22 nt cada.

O miRNA duplex é rapidamente separado quando associado à proteína Argonauta (AGO), sendo que uma cadeia é retida - “guide strand” (complementar ao alvo) - e forma-se assim o miRNA maduro. Apesar de ainda não ser bem conhecido o processo, pensa-se que a cadeia preferencialmente retida é aquela que tem o emparelhamento de bases mais fraco na extremidade 5'. Esta é posteriormente transferida para o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) em humanos para se conectar ao mRNA alvo (KIM, *et al.* 2009). O RISC é uma família de diversos complexos que contêm proteínas AGO envolvidas no silenciamento de genes (PRATT e MACRAE, 2009).

A cadeia complementar separada, “*passenger strand*”, por vezes designada como sequência miR*, é normalmente destruída (CZECH e HANNON, 2011).

A biogénese do miRNA é um processo complexo e é claro que este, apesar de mais usual, não é o único mecanismo de formação do miRNA originado, podendo também resultar de outras vias endógenas. Este é um processo complexo e, à medida que o conhecimento avança, estaremos aptos a compreender exatamente a biogénese do miRNA e quais as funções que desempenha.

2.2. Mecanismo de Ação dos miRNAs

O miRNA maduro vai então controlar a expressão génica a um nível pós-transcricional através de um emparelhamento imperfeito com sequências específicas localizadas maioritariamente na 3' UTR nos mRNAs (BARTEL, 2009). A maioria dos miRNAs não emparelham completamente com as sequências alvo. Contudo, existe uma zona demarcada como essencial para o reconhecimento do alvo apelidada de região “seed”, os nt 2-7 dos miRNAs, que é crítica para o reconhecimento do alvo (Figura 2). Os miRNAs são agrupados em famílias baseados nestes nucleótidos em que na maioria, mas

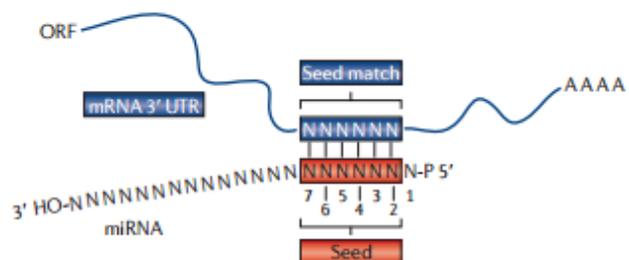


Figura 2 – Reconhecimento do RNA alvo.

Os miRNAs reconhecem os seus alvos pela complementaridade de bases. Nos animais, os miRNAs reconhecem os locais de complementaridade parcial, que estão geralmente localizados nas 3' UTRs. A complementaridade da extremidade 5' do miRNA – a sequência *seed*, constituída pelos nucleótidos 2-7 – é o principal determinante no reconhecimento do alvo e é suficiente para desencadear o silenciamento. Para a maioria dos locais de ligação dos miRNAs, a complementaridade é limitada à sequência *seed* ou à sequência *seed* e ao nucleótido 8. Contudo, em alguns casos raros, a complementaridade à região 3' do miRNA pode contribuir para a seleção do alvo, especialmente quando o mRNA tem um *seed* de ligação fraco. Mesmo para esses locais, os nucleótidos 9-12 do miRNA normalmente não são complementares o evita a clivagem pelas AGO (HUNTZINGER e IZAURRALDE, 2011).

não em todos os casos, podem ter o mesmo gene como alvo (LEWIS *et al.*, 2003).

A extensão da complementaridade entre o miRNA e as suas sequências alvo influencia os mecanismos reguladores posteriores. Quando a ligação é completa, há uma degradação da molécula de mRNA enquanto que uma maior divergência na complementaridade resulta na repressão da tradução. No homem, a proteína AGO2 catalisa a clivagem do mRNA (LIU, 2004).

Mesmo quando existe complementaridade para além da sequência “seed”, geralmente em animais os nt 9-12 não são complementares ao alvo, prevenindo desta forma uma clivagem pelas proteínas AGO (JINEK e DOUDNA, 2009). Isto é importante porque nestes casos, as proteínas AGO tornam-se insuficientes para mediar o silenciamento e requerem uma interação adicional com outras proteínas, incluindo membros da família GW182 (HUNTZINGER e IZAURRALDE, 2011).

O recrutamento da família GW182 a um alvo do miRNA desencadeia uma repressão da tradução, cujo mecanismo ainda não é claramente conhecido, a desadenilação no mRNA. As proteínas da família GW182 vão interagir com a proteína de ligação poli-A (PABP), que por sua vez está ligada à cauda poli-A do mRNA. Ao mesmo tempo, é recrutado um complexo de proteínas, designado por complexo de deadenilase - o complexo Ccr4-Not - que é constituído por enzimas que vão tornar a cauda poli-A mais curta. Quando essa cauda poli-A for suficientemente curta o mRNA é degradado a partir da extremidade 5'. Isto pode ser explicado pelo fato de mRNAs sem cauda de adeninas serem em geral menos estáveis e serem mais rapidamente degradados pelas exonucleases. Desta forma, o mRNA é destabilizado pelo miRNA por processos que ocorrem naturalmente. Apenas há uma aceleração pelo recrutamento do complexo de deadenilase (BRAUN, *et al.*, 2012).

2.3. Regulação da Biogénese, da Expressão, da Função e da Degradação dos miRNAs

Para além do conhecimento relativo à biogénese e às funções dos miRNAs, recentes avanços tecnológicos permitiram uma melhor compreensão relativamente à biologia associada à regulação e à expressão dos miRNAs. Foram identificadas diversas vias biológicas, envolvendo interações entre proteínas ou entre proteínas e RNAs que contribuem significativamente para as funções específicas dos miRNAs de acordo com o tipo de célula ou de tecido. Por exemplo, co-fatores, proteínas como DGCR8 e a Argonauta 2 que assistem a enzima Drosha ou o complexo RISC, que ao executarem as suas funções, controlam indiretamente a expressão dos miRNAs.

De forma semelhante ao que acontece com os genes codificadores de proteínas, a transcrição dos genes de miRNAs é também regulada por fatores de transcrição. Para além

do mais, vários miRNAs trabalham em conjunto com fatores de transcrição no ciclo de *feedback* da autorregulação do processamento dos miRNAs (KROL, *et al.*, 2010). Por outro lado, os mecanismos de *turnover* dos miRNAs são ainda pouco conhecidos. Estas moléculas são consideradas altamente estáveis com velocidades de *turnover* baixas, normalmente com um grande número de cópias por célula. Inicialmente a regulação do miRNA não era vista como sendo específica da célula, mas a regulação dos miRNAs neuronais demonstrou que o são (SIM, *et al.*, 2014).

Todas estas descobertas demonstram que os miRNAs têm papéis significativos durante o normal funcionamento dos neurónios, o que sugere que a sua desregulação pode ter um impacto importante na neurodegenerescência.

3. miRNAs e Neurodegenerescência

A neurodegenerescência é um processo complexo resultado de um conjunto de perturbações genéticas, moleculares e ambientais, caracterizada pela perda progressiva de neurónios no sistema nervoso. Perceber a principal causa da disfunção e morte celular neuronal é algo que nos pode auxiliar a compreender os mecanismos de neurodegenerescência. Estas doenças não têm cura porque a regeneração dos neurónios do sistema nervoso central é insuficiente após danos ou morte celular. Para além do mais, quando uma doença neurodegenerativa se manifesta, já existem danos no sistema nervoso central bem como perda de neurónios. Por isso, é crucial um diagnóstico o mais precoce possível para maximizar a possível terapêutica. Em anos recentes têm sido conduzidos grandes esforços no sentido de identificar biomarcadores genéticos para que o diagnóstico possa ser feito num estadio mais precoce.

Apesar da neurodegenerescência ser um processo ainda mal compreendido, sabe-se atualmente, que há envolvimento de miRNAs em processos fisiológicos importantes na morte neuronal que ocorre em doenças neurodegenerativas (HÉBERT e STROOPER, 2009). O estudo dos miRNAs é, por essa razão, visto como uma nova abordagem para melhor as compreender. Demonstrou-se nos últimos anos que numerosos miRNAs estão envolvidos na diferenciação neuronal e no desenvolvimento geral do cérebro. Tal foi tornado evidente em estudos que demonstraram que a inativação da formação dos miRNAs através da remoção da Dicer, resultou numa neuro regulação e diferenciação inapropriadas culminando numa morfogénese cerebral defeituosa (GIRALDEZ, 2005). Por outro lado, vários estudos demonstraram que os miRNAs não são apenas neuroreguladores, mas também neuroprotetores, visto que a sua diminuição provoca neurodegeneração (HEBERT *et al.*, 2008). A idade tem também um tremendo impacto na maioria das doenças

neurodegenerativas e o cérebro envelhecido apresenta alterações dramáticas no perfil de miRNAs (PERSENGIEV *et al.*, 2011).

4. Doença de Alzheimer

Em 1907, a DA foi descrita por um médico alemão, Alois Alzheimer, que muito contribuiu para o desenvolvimento da neurociência, tendo feito descobertas com as quais foi possível esclarecer diversas alterações cerebrais (HEINZ *et al.*, 2002). A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, irreversível e é a causa mais comum de demência na população idosa. É caracterizada pela perda das sinapses e dos neurónios sendo que os sintomas iniciais incluem dificuldade em recordar nomes bem como acontecimentos recentes, apatia e depressão. Mais tarde, os sintomas incluem um agravamento da memória, falta de discernimento, desorientação, confusão, alterações comportamentais, dificuldade em falar e em caminhar (THIES e BLEILER, 2012).

Esta patologia pode ser dividida em 3 fases. A primeira corresponde a um período assintomático, em que as pessoas se encontram cognitivamente normais, mas já existe evidência da deposição da proteína β -amilóide ($A\beta$) com ou sem outras alterações neuropatológicas. A segunda fase diz respeito a um período sintomático caracterizado por um comprometimento cognitivo ligeiro com deposição amilóide e com mais evidências da neurodegenerescência. A terceira fase ocorre quando o comprometimento cognitivo piora e interfere com atividades do dia-a-dia (DUBOIS *et al.*, 2010).

Histopatologicamente, a DA é caracterizada pela deposição da proteína $A\beta$ na forma de placas amilóides e de formas hiperfosforiladas dos microtúbulos associados à proteína Tau como emaranhados neurofilamentosos (NFT). Começa no hipocampo sendo que posteriormente se expande para todo o córtex.

4.1. Metabolismo do peptídeo A β

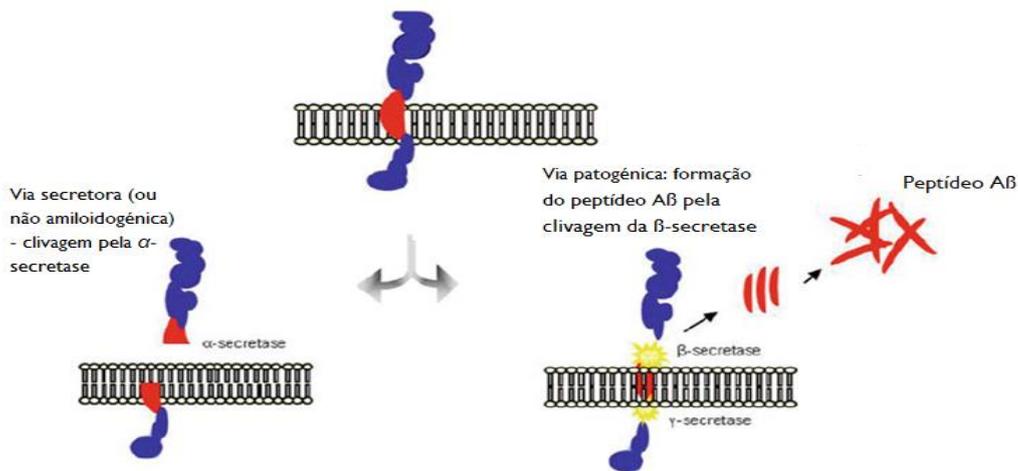


Figura 3 – A proteína precursora amiloide (APP) é uma proteína transmembranar clivada por enzimas secretase. Na via secretora (ou não amiloidogênica), a APP é inicialmente clivada pela α -secretase, que ocorre a meio do domínio amiloide (a vermelho) e, conseqüentemente, exclui a formação da proteína A β . Alternativamente, a APP é sequencialmente clivada pela β - e γ -secretase havendo a formação de monómeros da proteína A β neurotóxicos (via amiloidogênica), que polimerizam em oligómeros e agregam-se em fibrilas amiloides (MHYRE *et al.*, 2012).

Uma das alterações neuropáticas detetáveis nesta patologia são as placas β -amilóides que derivam da proteína precursora amiloide (APP). Trata-se de uma glicoproteína transmembranar, clivada por enzimas secretases, sendo uma das proteínas mais abundantes no sistema nervoso central (CNS). A APP pode ser metabolizada por dois processos diferentes: a via secretora (ou não amiloidogênica) ou a via amiloidogênica (Figura 3).

Na primeira, a APP é clivada pela α -secretase libertando o fragmento solúvel (sAPP α) e um fragmento C-terminal (C83), que é então clivado pela γ -secretase para originar um fragmento C-terminal mais pequeno (C3). Este tipo de clivagem ocorre dentro da sequência de aminoácidos que pertencem ao peptídeo amiloide- β (A β). Assim sendo, evita a formação destes peptídeos.

Pela via amiloidogênica, a APP é clivada pela β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1), também designada β -secretase, havendo libertação de um fragmento terminal pequeno (sAPP β) e de um fragmento C-terminal longo (C99). Este último contém toda a sequência de aminoácidos do peptídeo A β . Uma clivagem posterior pela γ -secretase produz o peptídeo A β que é libertado para o meio extracelular (O'BRIEN e WONG, 2011).

Os peptídeos A β são libertados como monómeros que se agregam progressivamente em dímeros, trímeros, oligómeros, protofibrilas e fibrilas até que se depositam e originam as placas amilóides. Existem várias espécies de proteínas A β que variam de acordo com o número e sequência de aminoácidos – os que têm 40 a 42 aminoácidos são os mais abundantes no cérebro. Apesar das suas semelhanças, o peptídeo A β_{42} é o mais propenso

para a agregação sendo o mais neurotóxico. Por isso, o peptídeo $A\beta_{42}$ tem um papel fundamental na patogénese da DA, uma vez que resulta na formação de agregados maiores e, conseqüentemente, na deposição de placas.

Os oligómeros do peptídeo $A\beta$ interagem com os neurónios e com as células da glia levando à ativação de cascatas pró-inflamatórias, disfunções mitocondriais, aumento do stress oxidativo, desregulação das vias de sinalização intracelulares, fosforilação da proteína Tau, desregulação do metabolismo do cálcio, indução da apoptose neuronal e morte celular. Estes mecanismos propiciam a perpetuação do ciclo de *feedback* positivo em que a produção do peptídeo $A\beta$ conduz a eventos prejudiciais para as células neuronais. Tudo isto faz com que haja uma disfunção do metabolismo e um aumento da produção dos peptídeos $A\beta$.

Em condições fisiológicas, a APP é preferencialmente metabolizada pela via secretora e existe um equilíbrio entre a produção do peptídeo $A\beta$ e a sua remoção no cérebro. Entre as proteínas envolvidas na eliminação do peptídeo $A\beta$ contam-se a apolipoproteína E (ApoE) que transporta o colesterol do líquido céfalo-raquídeo (CSF) e que tem funções na ligação e remoção da proteína $A\beta$. O seu polimorfismo genético, alelo $\epsilon 4$ da ApoE, pode favorecer a via amiloidogénica da APP e/ou diminuir a remoção do peptídeo $A\beta$ nos tecidos neuronais, sendo este o maior fator de risco genético conhecido (MHYRE *et al.*, 2012). Outras proteínas envolvidas na tarefa de remoção da proteína $A\beta$ são enzimas proteolíticas, como a *nepriylsina*, via lisossomal (autofagia) ou via não lisossomal (como por exemplo o proteossoma).

4.2. Metabolismo da proteína TAU

A proteína Tau é uma proteína associada aos microtúbulos que, a nível neuronal, são uma componente com funções importantes respeitantes ao citoesqueleto. Interage assim com a tubulina α e β e o estado fosforilado da proteína Tau é essencial para estabilizar os polímeros da tubulina. Nos neurónios, os microtúbulos são essenciais na manutenção da estrutura neuronal, do transporte axonal e da plasticidade neuronal. Uma fosforilação anormal da proteína Tau afeta negativamente a sua capacidade de se ligar à tubulina, perturbando assim a estrutura dos microtúbulos. Para além disso, a Tau hiperfosforilada afeta o transporte axonal de organelos para a sinapse, como a mitocôndria, e, conseqüentemente, o metabolismo sináptico, causando disfunções levando à perda da viabilidade da célula e, em último caso, ao colapso do citoesqueleto microtubular e morte neuronal (neurodegenerescência). Assim, a proteína Tau na forma insolúvel agrega e forma filamentos helicoidais emparelhados (PHFs), que são os principais componentes dos emaranhados filamentosos (NFT) (ITTNER *et al.*, 2010). Sendo assim, a fosforilação e

desfosforilação são pontos críticos na homeostase neuronal. Consequentemente, o balanço entre as cinases e as fosfatases é vital para um ajuste adequado no estado de fosforilação da proteína Tau. A cinase da proteína Tau com um papel mais relevante nos neurónios é a glicogénio sintase cinase-3 β (GSK3 β) (IQBAL *et al.*, 2005).

Menos de 1% dos casos da DA são familiares (FDA), de início precoce, com mutações autossómicas dominantes descritas em 3 genes que levam a um aparecimento precoce da doença: APP, presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2), sendo estes dois últimos relacionados com a via da γ -secretase (BERTRAM e TANZI, 2008).

A maior parte dos casos da DA são esporádicos (SDA), sem causa genética identificada, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos. Estudos recentes demonstraram que uma desregulação dos miRNAs contribui para o processo de doença.

5. miRNAs e Doença de Alzheimer

Determinados processos patogénicos resultam de uma interação dinâmica entre fatores potenciadores e transcriptomas, que envolvem tanto os genes codificantes como os não codificantes. Têm sido feitos grandes esforços para definir os mecanismos moleculares envolvidos na DA. A caracterização do transcriptoma permitiu obter uma descrição da atividade génica em determinados tecidos e em momentos específicos, fornecendo pistas acerca dos mecanismos envolvidos em patologias complexas como a DA.

O estudo dos miRNAs é uma área de investigação cuja expansão tem sido muito significativa nos últimos anos. Pesquisas recentes evidenciaram que a regulação aberrante dependente dos genes de expressão de miRNAs está estritamente relacionada com eventos moleculares responsáveis pela produção da proteína A β , formação de NFT e, consequentemente, neurodegenerescência.

Tabela I – miRNAs desregulados associados à patogênese da AD (HU *et al.*, 2016).

Patologia DA	miRNA	Referência
APP	miR-101, miR-17-5p, miR-106b, miR-107, miR-20a, miR-30, miR-143, miR-153, miR-193, miR-9, miR-16	Satoh (2012), Schonrock <i>et al.</i> (2010), Delay <i>et al.</i> (2011), Wang <i>et al.</i> (2008), Liu <i>et al.</i> (2012), Hebert <i>et al.</i> (2009), Chang <i>et al.</i> (2014)
BACE1	miR-29a/b, miR-9, miR-5a, miR-19b, miR-298, miR-285-5p, miR-486, miR-107, miR-195	Hebert <i>et al.</i> (2008), Long <i>et al.</i> (2014), Schonrock <i>et al.</i> (2010), Satoh (2012)
Tau	miR-132, miR-125b, miR-26b, miR-128, miR-922, miR-34, miR-15, miR-512	Absalon <i>et al.</i> (2013), Dickson <i>et al.</i> (2013), Banzhaf-Strathmann <i>et al.</i> (2014), Zhao <i>et al.</i> (2014), Dickson <i>et al.</i> (2013), Mezache <i>et al.</i> (2015)
PSEN1	miR-214, miR-153, miR-516a, miR-511, miR-128, miR-340, miR-335	Delay <i>et al.</i> (2012), Satoh (2012), Mallick and Ghosh (2011), Kalani <i>et al.</i> (2013)
Apoptosis	let-7, miR-15a, miR-29, miR-17-5p, miR-26b, miR-21, miR-191, miR-590-3p, miR-132, miR-212	Absalon <i>et al.</i> (2013), Tan <i>et al.</i> (2013), Wong <i>et al.</i> (2013), Villa <i>et al.</i> (2011)

Em 2007, Walter J. Lukiw elaborou estudos em pequena escala que resultaram nas primeiras pistas acerca das alterações dos miRNAs na DA. A partir daí, outros grupos continuaram a pesquisa e demonstraram que os padrões de expressão de miRNAs se encontram alterados não só no cérebro de um doente com Alzheimer, mas também no sangue e no CSF. Contudo, continua a ser difícil ter noção de quando é que essas alterações são uma causa ou uma consequência do processo neurodegenerativo. Os resultados de vários estudos demonstraram que alguns miRNAs parecem ser especificamente alterados no cérebro da DA (Tabela I), incluindo o miR-29, o miR-15, o miR-107, o miR-146, o miR-9, o miR-101 e o miR-106. Todos eles foram validados independentemente em dois ou mais estudos. De seguida, é efetuada uma descrição mais detalhada acerca de alguns desses exemplos.

5.1. miR-29

A família de genes miR-29 é constituída por três membros: miR-29a, miR-29b e miR-29c. Foram verificadas várias alterações na presença da DA, sendo que uma diminuição destes foi aquela que se verificou na maioria dos estudos. Curiosamente, esta diminuição foi também verificada no córtex cerebral de murganhos transgênicos suportando desta forma o papel das mutações nos genes APP e PSI encontradas na DA familiar (WANG *et al.*, 2009).

Baseado na regulação da expressão do miR-29b, especula-se que este apresente um papel importante no cérebro adulto. Apesar da função na DA ainda não estar completamente elucidada, pensa-se que tem um papel crucial na homeostase neuronal, uma vez que foi demonstrado que funciona como um inibidor da apoptose neuronal. Apesar dos neurónios não sofrerem processos mitóticos e de terem capacidades de regeneração limitadas, é necessário que durem a vida do organismo. É, por isso, essencial inibir a apoptose no CNS. Aquando da presença de *stresses* citotóxicos, como o dano de DNA, a apoptose é acionada, o que acontece na DA. Tal ocorre através da iniciação de cascatas pró-apoptóticas que ativam as proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), causando a libertação do citocromo C no citoplasma. Este processo leva a uma rápida ativação das caspases, que são proteases celulares que executam a morte celular (DELAY, *et al.*, 2012).

A família do miRNA miR-29 regula a expressão da *serine palmitoyl transferase-1* (SPTLC1), a primeira enzima limitante na síntese “de novo” da ceramida e beta-secretase-1 (BACE1) (HEBERT *et al.*, 2008). Ambas as proteínas têm funções importantes na formação da proteína A β e perturbações nos seus níveis contribuem para a patologia de Alzheimer. Foi demonstrado que o esfingolípido ceramida está aumentado em pessoas com DA e pode contribuir para a patogénese. As ceramidas das membranas não são o maior componente dos *rafts* lipídicos, mas contribuem também para a DA pois facilitam a localização anormal da BACE1 e da γ -secretase para os *rafts* lipídicos e assim, promovem a formação do peptídeo A β . Na DA, o miR-29a-1 e o miR-29b-1 estão diminuídos, promovendo a progressão da doença por uma regulação inversa da BACE1, causando o aumento da formação de placas A β (GEEKIYANAGE e CHAN, 2011). O miR-29 demonstra assim um papel protetor na sobrevivência neuronal.

5.2. miR-15

A família do miR-15 é composta por vários membros, tais como miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-195, miR-497, miR-503 e miR-646.

O miR-15a encontra-se frequentemente sub-expressado na DA, enquanto que o miR-15b mostrou estar diminuído no CSF mas não no córtex cerebral. De forma semelhante ao miR-29, este miRNA poderá estar envolvido na regulação pro-apoptótica e ter como alvo a proteína Bcl-2, cujos níveis estão aumentados na DA. Foi também observado que membros da família do miR-15, tais como o miR-15a, poderiam ter como alvo a expressão da cinase I (ERK1). Esta última é uma cinase direta da proteína Tau e uma diminuição dos níveis do miR-15 podem estar relacionados com uma hiperfosforilação da proteína Tau. Como a fosforilação anormal da proteína Tau está associada com a DA, alterações nos níveis do miR-

15, como são observados na DA podem resultar numa hiperfosforilação da proteína Tau (HÉBERT *et al.*, 2010).

Todas estas considerações demonstram a importância da família miR-15 no desenvolvimento da DA através da regulação da resposta ao stress, sobrevivência celular e fosforilação da Tau.

5.3. miR-107

O miR-107 pertence à família dos miR-107/103 e a sua sub-expressão é frequentemente observada em DA. O alvo deste miRNA é a BACE1. Tendo em conta que este miRNA está diminuído na DA numa fase ainda precoce, faz dele um candidato interessante como biomarcador (WANG *et al.*, 2008).

5.4. miR-146

A família miR-146 é constituída por dois membros, miR-146a e miR-146b. Está descrito que o miR-146a se encontra sobre-expresso enquanto que o miR-146b está sub-expresso no cérebro da DA. Ambos os miRNAs são conhecidos por serem reguladores do sistema imunitário, o que poderá estar relacionado com a progressão da DA, visto que a expressão ou ativação de efetores inflamatórios tem sido verificado na DA. Um desses fatores, a interleucina (IL-1), é sobre-expressa em estadios precoces na DA e foi demonstrado que regula a expressão do miR-146a/b. A IL-1 induz a expressão do miR-146a, mas não a do miR-146b, através da via de transcrição NF-Kb. O seu alvo é o mRNA do complemento do fator H (CFH), um regulador negativo da resposta inflamatória no cérebro. Portanto, a ativação da via NF-Kb vai induzir o miR-146a, que por sua vez amplifica a via inflamatória neurodegenerativa através da redução do CFH no cérebro. Esta via encontra-se substancialmente ativa no cérebro dos doentes com DA, por isso a diferença de expressão destes dois miRNAs poder ser a consequência da resposta inflamatória.

Como resultado da sobre expressão do miR-146a, este pode exacerbar ainda mais a resposta inflamatória, uma vez que tem como alvo a RANTES e a *interleukin-1 β -associated kinase-1* (IRAK1), cuja expressão está alterada no cérebro DA, e que estão diretamente envolvidos na inflamação.

Estes dados sugerem que a resposta inflamatória é causa e consequência da regulação do miR-146 (DELAY *et al.*, 2012).

5.5. miR-9

Foi demonstrada uma expressão alterada do miR-9 no cérebro da DA. Contudo, este pode estar sub ou sobre regulado. Um estudo sistemático investigou as alterações exatas do miR-9 em regiões diferentes do cérebro durante fases distintas da doença, o que pode explicar as discrepâncias. Contudo, tanto a sub como a sobre expressão podem estar associadas com a DA.

O alvo do miR-9 potencialmente envolvido na DA é o neurofilamento H. Esta proteína demonstrou estar sobre-expressa em situação de doença e pode ser isolada dos NFTs juntamente com a proteína Tau. Estas observações podem estar relacionadas com a diminuição dos níveis do miR-9. De fato, o miR-9 tem demonstrado estar sub-expresso em resposta a tratamentos com a proteína A β , sugerindo que uma sub-expressão pode ser a consequência da doença que resulta num aumento dos neurofilamentos-H (SCHONROCK *et al.*, 2010).

Contudo, o miR-9 também tem como alvo a Sirtuina I (SIRT1), uma desacetilase, que tem uma expressão reduzida em cérebros DA e está relacionada com a promoção de patologias Tau (acumulação anormal de proteínas Tau hiperfosforiladas). Contrariamente ao que acontece com o neurofilamento H, níveis reduzidos de SIRT1 indicam um aumento na expressão do miR-9, sugerindo que o miR-9 pode ter função protetora em relação à progressão da DA, através da inibição da SIRT1 (JULIEN *et al.*, 2009). É de salientar que a patologia Tau pode existir sem placas amiloides, mas o oposto não é verdade. Tal sugere que a patologia Tau pode surgir primeiro do que a patologia amiloide. A progressão da patologia Tau é impulsionada pela disfunção da APP (DELACOURTE *et al.*, 2002).

Globalmente podemos inferir acerca da sobre-expressão em estádios precoces da DA que vão retardar a patologia Tau pela inibição da SIRT1. Quando a patologia amiloide se verifica, a expressão do miR-9 é diminuída, resultando num aumento da incorporação da proteína Tau e neurofilamentos H nos NFTs.

5.6. miR-101

Há evidências que o miR-101 se encontra sub-expresso no córtex de humanos com DA (NUNEZ-IGLESIAS *et al.*, 2010). Na DA, os alvos preferenciais do miR-101 são a APP e a cicloxigenase-2 (COX-2). Esta última está envolvida na resposta inflamatória que se encontra aumentada no cérebro da DA, estando também associado com perda neuronal. Uma sub-expressão do miR-101 leva a um aumento da COX2, e por isso, contribui para a resposta inflamatória da doença (VILARDO *et al.*, 2010). A desregulação do miR-101 pode também contribuir indiretamente para a fosforilação anormal da proteína Tau.

Tendo em conta estas informações, a sub-expressão contribui significativamente para a DA por aumentar a expressão da APP, promover a formação dos NFTs por aumento da fosforilação da proteína Tau e por contribuir para a inflamação através de um aumento da COX-2 (DELAY *et al.*, 2012).

5.7. miR-106

O miR-106 pertence à família do miR-17, que também é constituído pelo miR-17, pelo miR-18, miR-19 e miR-93. A sub-família do miR-106 é composta por dois membros – o miR-106a e o miR-106b. O miR-106b encontra-se sub-expresso no córtex temporal anterior em doentes com DA. No que diz respeito à DA, este miRNA está relacionado com a regulação da APP. Baixos níveis de miR-106b levam ao aumento da APP e assim, a uma aceleração da acumulação da proteína A β . Para além do mais, tanto o miR-106a como o miR-106b estão envolvidos na DA através da regulação da autofagia, um processo envolvido na acumulação da proteína A β , na DA. Estes miRNAs têm como alvo a SQSTM1/p62, uma proteína envolvida na autofagia. Assim sendo estes miRNAs têm um papel importante na autofagia da proteína A β (DELAY, *et al.*, 2012).

5.8. miR-144

Os miRNAs estão também associados com a clivagem da APP. Como já foi descrito, três secretases diferentes contribuem para a clivagem da APP. A clivagem pela alfa-secretase exclui a formação da proteína A β . Tem sido sugerido que a *metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM) serve como uma alfa-secretase. A ADAM 10 é um membro da família ADAM e o processamento proteolítico da APP pela ADAM10 protege o cérebro da formação da proteína A β . Foi demonstrado que o miR-144 atua como um regulador negativo da ADAM10, sugerindo que uma sobre regulação do miR-144 pode contribuir para a DA por reduzir a atividade da ADAM10, o que resulta num aumento de produção da proteína A β (PAN *et al.*, 2015).

5.9. miRNA let-7b

O miRNA let-7b está aumentado no CSF dos doentes com DA. Este miRNA está envolvido na resposta imunitária na DA. Os níveis aumentados do let-7b no CSF dos doentes com DA podem contribuir para a neurodegenerescência pela sua ligação ao *RNA-sensing toll-like receptor* (TLR) 7, que é um recetor da imunidade inata. A via mediada pelo TLR7 que leva à morte celular envolve a caspase-3 (LEHMANN *et al.*, 2012).

6. miRNAs como Biomarcadores da Doença de Alzheimer

Atualmente são conhecidos diversos miRNAs que estão envolvidos na DA e novos miRNAs são continuamente descobertos (Tabela 2 – em anexo). Devido ao fato da DA ter um longo período de incubação antes do aparecimento dos sintomas clínicos, os tratamentos terapêuticos disponíveis apenas melhoram os sintomas, mas não atrasam a progressão da DA. Por isso, existe a necessidade premente de explorar abordagens de diagnósticos efetivas para sinalizar e melhor tratar a doença antes que os sintomas clínicos apareçam, antes que os danos neuronais já tenham ocorrido e que as disfunções já sejam irreversíveis. O tratamento antes que os danos irreversíveis tenham ocorrido é potencialmente mais eficaz na prevenção do desenvolvimento da doença. Desta maneira, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais precoces, com alta especificidade e seletividade para a DA é extremamente necessária (PAN *et al.*, 2015).

Apesar das técnicas de imagem a que hoje em dia podemos recorrer para o diagnóstico, esses métodos detetam a doença numa fase mais tardia em que já não é possível aplicar medidas preventivas. Por isso o uso de biomarcadores é necessário para prevenir e para melhor tratar a doença. Tecnologias recentes aplicadas a biomarcadores focam-se na genómica, na transcriptómica e nos miRNAs. Comparando com as proteínas como biomarcadores, os miRNAs conseguem atravessar a BBB. Apesar dos miRNAs terem um tempo de meia-vida curto, estes podem existir por longos períodos uma vez que são protegidos pelas membranas dos exossomas e por outras partículas que existem nos fluidos corporais (SHEINERMAN, 2013). Ao contrário do que acontece com muitos dos biomarcadores no CSF, a expressão anormal dos miRNAs ocorre antes da passagem para o CSF e, por isso, serão um indicador de diagnóstico efetivo.

Considerando todas estas vantagens, os miRNAs têm um grande potencial como candidatos a biomarcadores no diagnóstico da DA (PAN *et al.*, 2015).

6.1. Métodos de Diagnóstico recorrendo a miRNAs

O mecanismo patológico da DA está associado a alteração dos níveis de miRNAs em fluidos corporais, incluindo no CSF e no sangue. Tal permite a monitorização da progressão da doença mediante análise dos miRNAs relacionados com a patologia.

São geralmente utilizadas três abordagens para analisar os miRNAs como potenciais biomarcadores.

(I) Análise dos miRNAs através de *arrays* ou sequenciação da próxima geração

É possível encontrar potenciais biomarcadores através da análise de vários miRNAs e da detecção da variação dos níveis dos miRNA. Contudo, existem três desvantagens óbvias. Primeiro, não é possível detetar miRNAs em concentrações baixas em fluidos corporais. Segundo, a fonte de miRNAs identificada por este método é ubíqua, o que significa que não pode ser determinado quando os miRNAs vêm de outros tecidos ou células sanguíneas. Terceiro, miRNAs alterados têm baixa especificidade em relação à DA, uma vez que as alterações podem também ser observadas e serem indicadores de outras doenças, tais como o cancro (QIN *et al.*, 2013).

(II) Identificação de miRNAs específicos da doença

Os miRNAs isolados de tecidos com a doença se contrapostos aos miRNAs em tecidos normais podem ajudar a determinar os miRNAs específicos da doença. Os *arrays* ou RT-PCR podem ajudar a identificar esses miRNAs nos fluidos corporais. Este método reduz o número de miRNAs testados, aumenta a sensibilidade e reprodutibilidade e permite detetar miRNAs provenientes do CSF pois este está conectado ao cérebro. (COGSWELL *et al.*, 2008).

(III) Análise dos miRNAs circulantes do cérebro nos biofluidos

Esta abordagem foi proposta para procurar biomarcadores para a DA e para outras doenças neurodegenerativas. A RT-PCR é usada para quantificar os miRNAs que estão enriquecidos na área do cérebro relacionada com a doença, como o hipocampo para a DA. Por simplesmente medir os miRNAs enriquecidos no cérebro, detetando alterações causadas pela doença, torna-se muito mais fácil. Para além do mais, os miRNAs enriquecidos no cérebro encontram-se em níveis muito baixos para serem detetados por *arrays* e podem ser detetados por RT-PCR (SHEINERMAN *et al.*, 2012).

Encontrar uma normalização efetiva é muito importante na determinação da alteração de miRNAs relacionados com a doença em fluidos corporais uma vez que os níveis de miRNAs são influenciados por fatores biológicos e tecnológicos. Esses fatores biológicos incluem a concentração dos miRNAs no plasma que contém miRNAs de diversos órgãos, tecidos e células; a permeabilidade da BBB para miRNAs enriquecidos no cérebro; a estabilidade dos miRNAs no plasma e as diversas formas em que aparece tais como os exossomas e outras micro-vesículas; complexos com proteínas, lípidos e outras moléculas. Fatores técnicos incluem ainda os métodos para a recolha e armazenamento dos fluidos

corporais, a extração dos miRNAs e outras condições que afetam a purificação dos miRNAs e a RT-PCR (MEYER *et al.*, 2010).

6.2. Secreção dos miRNAs nos Biofluidos

Há evidências que os miRNAs são segregados no espaço extracelular na forma de microvesículas encapsuladas ou são libertados de forma livre das vesículas; os miRNAs são posteriormente ligados a proteínas ou outros compostos, que transportam os miRNAs para os biofluidos extracelulares de cinco modos diferentes. Estando livres de vesículas, os miRNAs são ligados a partículas lipoproteínas de alta densidade (HDL) ou formam complexos com proteínas AGO2. Por outro lado, podem ser segregados em exossomas, encapsulados em micro-vesículas (MVs) e acumulados nos corpos apoptóticos. A função principal dos exossomas e das MVs é de facilitar a comunicação intracelular e o transporte de várias moléculas bioativas - como o DNA, o RNA, os miRNAs, as proteínas. Arroyo *et al.* relataram que a maioria dos miRNAs circulantes (90%) são encontrados em MVs onde se encontram ligados com proteínas AGO 2. Desta forma tornam-se mais resistentes ao ambiente rico em nucleases devido à elevada estabilidade da proteína AGO nos biofluidos (TURCHINOVICH *et al.*, 2013).

Os exossomas são vesículas encontradas em muitos fluidos biológicos, incluindo o sangue. São partículas que têm aproximadamente 50 – 100 nm de diâmetro. São nano vesículas naturais que são formadas a partir dos endossomas e são segregadas das células através da sua fusão com a membrana plasmática (KELLER *et al.*, 2006).

Recentemente, os estudos de miRNAs têm-se focado nos exossomas como moléculas de diagnóstico por várias razões. Em situação patológica, os exossomas contêm principalmente miRNAs específicos da doença ou que se encontram desregulados. Adicionalmente, os exossomas têm o potencial de passar a barreira sanguínea e conseguem facilmente passar as camadas endoteliais celulares e circular nos biofluidos, o que é importante na neurodegenerescência. Para além do mais, em situações de neurodegenerescência, os miRNAs estão presentes no sistema circulatório na sua forma protegida da RNase (CHENG *et al.*, 2014). Cheng *et al.* demonstrou que os exossomas nos biofluidos são uma fonte enriquecida e de proteção de miRNAs que podem ser utilizados em estudos de biomarcadores (KUMAR e REDDY, 2016).

6.3. Biofluidos como Fonte de miRNAs

Os miRNAs têm sido detetados em biofluidos clinicamente relevantes como o CSF, o soro/plasma, saliva e urina. Destes, o CSF representa claramente o biofluido mais relevante

devido à proximidade com o cérebro. No entanto, a utilização do CSF tem algumas desvantagens relacionadas com os riscos associados à colheita. O soro e o plasma representam fontes mais convenientes para a descoberta de biomarcadores pois são procedimentos minimamente invasivos que são simples (ETHERIDGE *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstram que os miRNAs extracelulares do soro e do plasma são excepcionalmente estáveis (CHEN *et al.*, 2008).

Considerando a perspectiva de uso dos miRNAs como biomarcadores, vários estudos têm-se concentrado na descoberta de miRNAs que sirvam como biomarcadores no CSF e no sangue para o diagnóstico da DA (Tabela 3 – ver em anexo) (KIM *et al.*, 2014). Em 2007, Schipper e os seus colegas demonstraram que a expressão de nove miRNAs se encontrava aumentada nas células mononucleares do sangue periférico em doentes com DA. Subsequentemente, Geekivanage *et al.* (2012) descobriram que o miR-137, miR-181c, miR-9 e miR-29 se encontram diminuídos no soro de doentes com DA assim como em modelos de roedores com DA. Em doentes com comprometimento cognitivo ligeiro, há um aumento do nível de miRNAs enriquecidos no cérebro da família dos miR-132 e miR-134 comparando com controlos da mesma idade (SHEINERMAN e UMANSKY, 2013). Adicionalmente, um estudo recente examinou a concentração de seis miRNAs candidatos, incluindo miR-9, miR29a, miR-29b, miR-34a, miR-125, e miR-146a, no CSF e no plasma de doentes com DA e com controlos da mesma idade. Todos estes miRNAs demonstraram, ter funções importantes no CNS e na DA. Os doentes com DA demonstraram valores aumentados do miR-34a no cérebro e diminuídos no CSF e no plasma (LI *et al.*, 2011).

Todas estas descobertas sugerem indicações promissoras para miRNAs do soro que possam servir como marcadores de diagnóstico para a DA, apesar de mais análises e validação dos resultados serem necessárias.

7. Estratégias de Intervenção Terapêutica envolvendo miRNAs

A descoberta de miRNAs com potencial para representar biomarcadores robustos não só abriu novos horizontes em termos de diagnóstico da doença, mas também despertou o interesse em explorar os alvos dos miRNAs como potenciais intervenções terapêuticas. A substituição ou a inibição de miRNAs sub ou sobre expressos pode ser clinicamente favorável em potenciais tratamentos.

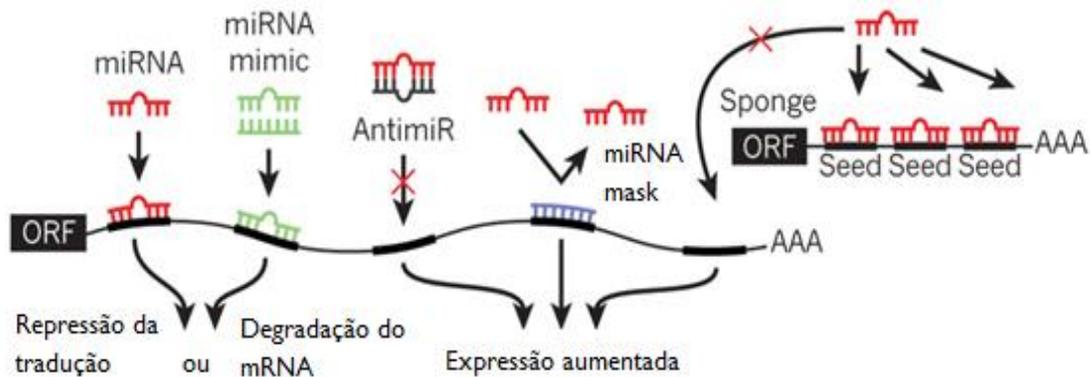


Figura 4 – Manipulação da função dos miRNAs através de oligonucleotídeos.

Representam-se os vários métodos de modular artificialmente a expressão ou atividade de miRNAs. miRNAs endógenos (a vermelho) ligam-se às sequências complementares na 3' UTR do mRNA alvo, resultando na repressão da tradução ou na degradação do mRNA. Um miRNA *mimic* (a verde) consiste num oligonucleotídeo duplex do miRNA e a *passenger strand*. O miRNA *mimic* inclui a mesma sequência nucleotídica que o miRNA endógeno e é concebido para ter como alvos os mesmos mRNAs que o miRNA. O anti-miR (a cinzento) é um oligonucleotídeo que é complementar a um miRNA endógeno e, deste modo, concebido para se ligar e inibir a sua função. Um miRNA mask (a azul) é um oligonucleotídeo concebido para se ligar a uma porção de um alvo endógeno do miRNA sem induzir a degradação do mRNA ou a inibição da tradução. Esta estratégia salva um mRNA em particular da repressão mediada pelo miRNA. miRNA sponges são compostos por ORFs (*open reading frame*) ligados à 3' UTR que contém diversos locais de ligação para um miRNA em particular, atuando como inibidores competitivos para a ligação do miRNA (SMALL e OLSON, 2011).

Apesar de estarmos longe de perceber completamente os mecanismos de morte neuronal, estudos em modelos animais, em modelos celulares, biofluidos e tecido de cérebro *post-mortem* têm facilitado uma melhor compreensão das perturbações na expressão dos miRNAs. Têm sido feitos progressos no desenvolvimento de estratégias de intervenção terapêutica baseada em miRNAs (Figura 4) (BASAK *et al.*, 2016).

Existem duas estratégias principais de terapêutica envolvendo os miRNAs: miRNAs mimics e os anti-miRNAs (SANTULLI, 2015).

7.1. miRNA mimics

Em 2007, Wang e os seus colegas desenvolveram pequenas moléculas de RNA de dupla cadeia que mimetizam os precursores de miRNAs e que vão diminuir a expressão de

proteínas alvo específicas. Estes têm como alvos específicos mRNAs e vão comportar-se como miRNAs em células animais. As suas extremidades 5' tem uma sequência que é parcialmente complementar à 3' UTR de um alvo específico. Uma vez dentro das células, estas cadeias duplas *miRNA-like* vão inibir a tradução de genes específicos, produzindo assim um efeito específico para um gene. Diminuindo a quantidade de uma proteína, temos uma aproximação de uma terapêutica protetora (WANG, 2009).

7.2. anti-miRs

Semelhantemente aos miRNA *mimics*, um anti-miR também demonstra um potencial em termos de intervenção da doença. Esta é a estratégia mais amplamente estudada. Estudos iniciais focaram-se nos anti-miRs ou oligonucleotidos *antisense* (ASOs) que bloqueiam os miRNA endógenos, perdendo estes assim a sua função. Os oligonucleótidos *antisense* ligam-se à “guide strand” do miRNA no RISC e induzem degradação ou a formação de um duplex estequiométrico, prevenindo a sua ligação ao mRNA, sem assim degradar o alvo. Em certas condições, quando os miRNAs são sobre-expressos, vão ser bloqueados e ficam assim inativos (BOUTLA *et al.*, 2003).

7.2.1. Antagomirs

Foi posteriormente demonstrado que uma modificação no oligonucleotido *antisense* contribuiu para a resistência às nucleases e aumentou as afinidades de ligação aos alvos do miRNA, tendo sido criados os o antagomiRs (HUTVÁGNER *et al.*, 2004). Os antagomiRs são geralmente ASOs conjugados com colesterol que auxiliam na entrada das células. O silenciamento dos miRNAs endógenos por este método é específico, eficiente e de longa duração. Contudo, o antagomirs não conseguem ultrapassar a barreira hemato-encefálica (BBB), mas conseguem penetrar em células do cérebro, se aí injetadas diretamente.

7.2.2. “Esponjas” de miRNA

Os miRNAs *sponges*, concebidos por Ebert e pelos colegas, são mRNAs que contêm múltiplos locais de ligação artificiais de miRNAs ao mesmo tempo (EBERT *et al.*, 2007). Estes podem ser especificamente sobre-expressos no tecido alvo de forma a neutralizar miRNAs específicos e assim restaurar a expressão dos mRNAs. Quando o miRNA *sponge* é expresso de transgenes, é capaz de ter como alvo uma família inteira de miRNAs que partilham a mesma sequência guia (“seed”), inibindo assim a repressão dos miRNAs (MECO, DI e PRATICÒ, 2016). De forma semelhante aos anti-miRs ou antagomirs, estas *sponges* podem também ser usadas para silenciar vários miRNAs.

As construções típicas de miRNAs *sponges* são constituídas por quatro a dez locais de ligação separados por alguns nucleótidos. A eficiência de um miRNA *sponge* depende não só da sua afinidade aos locais de ligação, mas também necessita de um número elevado de *sponges* relativamente à quantidade de miRNA, o que pode ser conseguido pela expressão da *sponge* através de um promotor (EBERT *et al.*, 2007).

7.3. miRNA *masks*

Outro mecanismo que permite o controlo da regulação do miRNA são os miRNAs *masks*, uma abordagem diferente dos ASO. Estes têm uma cadeia simples modificada 2'-O-metil (2'-O-methyl-modified) de oligoribonucleotidos *antisense* de 22 nt. Em vez de se ligarem ao miRNA, estes vão-se ligar por complementaridade à 3' UTR do mRNA codificante de uma proteína, o qual é alvo de um miRNA de interesse endógeno, mascarando assim o local de ligação. Desta forma, o miR-*mask* impede o acesso do miRNA ao seu alvo bloqueando a ligação e permitindo que o mRNA seja traduzido. A ação anti-miRNA de um miRNA *mask* é específica de um gene uma vez que é desenhada para ser totalmente complementar à sequência de mRNA alvo. Para além disso, é também específico do miRNA pois é desenhado para se ligar ao local exato de ligação do miRNA.

Enquanto que o ASO é indispensável para o estudo das funções do miRNA, o miRNA *mask* é mais apropriado para o estudo de resultados específicos da regulação do alvo pelo miRNA. Este método até à data não tem sido usado na área de investigação de processos neurodegenerativos. Contudo, mascarar a região 3' UTR dos mRNAs que previnem a neurodegenerescência representa uma perspetiva bastante interessante (WANG, 2011).

Os anti-miRNA e os miRNA-*mimics* podem ser entregues recorrendo a várias estratégias de forma a evitar a degradação e efeitos em moléculas que não são o alvo. As formas mais comuns de entrega de maneira a auxiliar a captação pela célula é serem entregues em lipossomas ou nanopartículas e anticorpos conjugados para uma especificidade celular (LI e RANA, 2014).

A maioria dos miRNAs que têm sido reportados como desregulados na DA estão maioritariamente sub-expressos e os seus alvos mais comuns são a APP e/ou a BACE1. Tal pode estar relacionado com a justificação de que os cérebros com a DA são caracterizados por um aumento da proteína APP e BACE1 e, conseqüentemente, se traduz numa deposição amilóide. Impedindo esse efeito, os miRNA *mimics* podem auxiliar no restauro dos níveis dos

miRNAs sub-expressos conduzindo naturalmente a uma diminuição aos níveis da proteína APP e da BACE1.

Outros miRNAs como o miRNA-15a ou o miRNA-181c estão sub-expressos na DA e têm como alvos mRNAs importantes para a fosforilação da proteína Tau e reparação do DNA. Restaurar os seus níveis poderá ser uma estratégia viável de forma a diminuir a fosforilação da proteína Tau e de restabelecer os mecanismos de reparação do DNA. A sobre expressão do miRNA-146a que tem como alvo mRNAs importantes na regulação da inflamação podem ser contrariados pela entrega de anti-miRNA146a com o objetivo de reduzir a neuroinflamação (MECO, DI e PRATICÒ, 2016).

8. Perspetivas Futuras

A DA é uma doença neurodegenerativa irreversível associada ao envelhecimento caracterizada pela progressiva falha de memória e declínio cognitivo. Sendo a SDA a sua forma mais comum, julga-se que resulta de interações entre múltiplos fatores de risco ambientais e diferentes vulnerabilidades genéticas, tornando a sua investigação desafiante.

O desenvolvimento de biomarcadores sensíveis e específicos para o diagnóstico da DA permanece ainda um grande desafio, especialmente devido facto dos doentes não apresentarem sintomas em fases precoces (IACONO *et al.*, 2008). Visto que os miRNAs têm um papel crucial no desenvolvimento neuronal e nas doenças neurológicas, é aceitável presumir que podem servir como biomarcadores para a DA.

Até agora, a relação da desregulação dos miRNAs com a DA foi imensamente estudada. Contudo, os resultados desses estudos não têm sido sempre consistentes e ainda nenhum consenso foi atingido. Indubitavelmente, estamos apenas no começo da exploração desta área e há ainda muitas descobertas por fazer de forma a definir completamente as relações entre os miRNAs e a DA.

Evidentemente que a pesquisa efetuada acerca dos miRNAs demonstra o seu papel promissor na deteção da DA e comparando com outros marcadores existentes, os miRNAs têm a vantagem do seu fácil acesso, de serem rapidamente analisados e de poderem oferecer uma perceção numa fase mais inicial da DA. Contudo, atualmente falta ainda uma classificação clara e específica para os miRNAs baseados no sangue ou noutros tecidos. Futuramente, estudos prospetivos, multi-cêntricos, de larga-escala irão ajudar a aprofundar e a elucidar as interações patofisiológicas entre os miRNAs e as proteínas relacionadas com a DA (HU *et al.*, 2016).

A pesquisa mais recente relativa a esta temática tem mudado na direção da prevenção em vez do tratamento dos sintomas. Tendo em conta que atualmente os únicos

tratamentos farmacológicos aprovados para a DA são limitados ao tratamento dos sintomas (como os inibidores da acetilcolinesterase e os antagonistas dos recetores NMDA), a descoberta de novas vias moleculares como novos alvos terapêuticos na DA revela-se uma opção extremamente atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos.

Na DA, a desregulação dos miRNAs ocorre naqueles que têm como alvos mRNAs e vias com importância funcional relevante no desenvolvimento da patologia. Estes miRNAs são potenciais alvos constituindo uma nova e atrativa área de investigação com enorme potencial. A este facto aliam-se novas descobertas e avanços tecnológicos que preparam o futuro para este novo conceito de restabelecimento dos níveis de miRNAs que se encontram sub-expressos ou inibição daqueles que estão sobre-expressos. Espera-se que estas estratégias venham a representar terapias eficazes para interromper ou atrasar a progressão da DA (MECO, DI e PRATICÒ, 2016).

9. Bibliografia

- AGNES HEINZ, By *et al.* - Alzheimer's Disease: A Status Report For 2002. 2002).
- ALLEN, Kristi E.; WEISS, Glen J. - Resistance May Not Be Futile: microRNA Biomarkers for Chemoresistance and Potential Therapeutics. **Mol Cancer Ther.** 9:12 (2010) 3126–36.
- AMARAL, Paulo P.; MATTICK, John S. - Noncoding RNA in development. **Mammalian Genome.** 19:7-8 (2008) 454–492.
- APPASANI, Krishnarao; AMBROS, Victor R.; ALTMAN, Sidney - **Micro RNAs From Basic Science to Disease Biology.** 1st. ed. New York : Cambridge University Press, 2007
- BARTEL, David P. - MicroRNAs: Targeting Recognition and Regulatory Functions. **Cell.** 136:2009) 215–233.
- BASAK, Indranil *et al.* - MicroRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 73:4 (2016) 811–827.
- BERTRAM, Lars; TANZI, Rudolph E. - Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. **Nature Reviews Neuroscience.** 9:10 (2008) 768–778.
- BOUTLA, Alexandra; DELIDAKIS, Christos; TABLER, Martin - Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. **Nucleic acids research.** 31:17 (2003) 4973–80.
- BRAUN, Joerg E.; HUNTZINGER, Eric; IZAURRALDE, Elisa - A molecular link between miRISCs and deadenylases provides new insight into the mechanism of gene silencing by microRNAs. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** 4:12 (2012).
- CARTHEW, Richard W. *et al.* - Leading Edge Review Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell.** 136:2009) 642–655.
- CHEN, Xi *et al.* - Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Research.** 18:282:18 (2008) 997–1006.
- CHENG, L. *et al.* - Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. **Molecular psychiatry.** 10 (2014) 1–9.
- COGSWELL, John P. *et al.* - Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **Journal of Alzheimer's disease** : **JAD.** 14:1 (2008) 27–41.
- CZECH, Benjamin; HANNON, Gregory J. - Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. **Nature Reviews Genetics.** 12:1 (2011) 19–31.
- DELACOURTE, André *et al.* - Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? **Experimental Gerontology.** 37:10-11 (2002) 1291–1296.
- DELAY, Charlotte; MANDEMAKERS, Wim; H??BERT, S??bastien S. - MicroRNAs in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease.** 46:2 (2012) 285–290.
- DENLI, Ahmet M. *et al.* - Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature.** 432:7014 (2004) 231–235.
- DUBOIS, Bruno *et al.* - Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. **The Lancet Neurology.** 9:11 (2010) 1118–1127.
- EBERT, Margaret S.; NEILSON, Joel R.; SHARP, Phillip A. - MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nature methods.** 4:9 (2007).

- EBERT, Margaret S.; NEILSON, Joel R.; SHARP, Phillip A. - MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nature methods**. 4:9 (2007) 721–6.
- ETHERIDGE, Alton *et al.* - Extracellular microRNA: a new source of biomarkers miRNA biogenesis and function. **Mutation Research**. 717:1-2 (2011) 85–90.
- FRIEDMAN, Robin C. *et al.* - Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**. 19 (2009) 92–105.
- GEEKIYANAGE, Hirosha; CHAN, Christina - MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid beta, novel targets in sporadic Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience**. 31:41 (2011) 14820–14830.
- GIAU, Vo Van; SOO, Seong; AN, A. - Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. 2015).
- GIRALDEZ, A. J. - MicroRNAs Regulate Brain Morphogenesis in Zebrafish. **Science**. 308:5723 (2005) 833–838.
- HEBERT, S. S. *et al.* - Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ -secretase expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105:17 (2008) 6415–6420.
- HÉBERT, Sébastien S. *et al.* - Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. **Human molecular genetics**. 19:20 (2010) 3959–69.
- HÉBERT, Sébastien S.; STROOPER, Bart DE - Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. **Trends in Neurosciences**. 32:4 (2009) 199–206.
- HOLMAN, Edna C. *et al.* - Microarray Analysis of microRNA Expression during Axolotl Limb Regeneration. **PLoS ONE**. 7:9 (2012).
- HU, Yong-Bo *et al.* - Diagnostic Value of microRNA for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in aging neuroscience**. 8:February (2016) 13.
- HUNTZINGER, Eric; IZAURRALDE, Elisa - Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**. 12:2 (2011) 99–110.
- HÜTTENHOFER, Alexander *et al.* - Non-coding RNAs: hope or hype? **Trends in Genetics**. 21:5 (2005) 289–297.
- HUTVÁGNER, György *et al.* - Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function. **PLoS Biology**. 2:4 (2004) e98.
- IACONO, Diego *et al.* - Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**. 67:6 (2008) 578–89.
- IQBAL, Khalid *et al.* - Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica et biophysica acta**. 1739:2-3 (2005) 198–210.
- ITTNER, Lars M. *et al.* - Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. **Cell**. 142:2010) 387–397.
- JINEK, Martin; DOUDNA, Jennifer A. - A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**. 457:7228 (2009) 405–412.
- JULIEN, Carl *et al.* - SIRT1 Decrease Parallels the Accumulation of tau in Alzheimer Disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**. 68:1 (2009).
- KAIKKONEN, Minna U.; LAM, Michael T. Y.; GLASS, Christopher K. - Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. **Cardiovascular Research**. 90:2011) 430–440.
- KAWAHARA, Yukio; MIEDA-SATO, Ai - TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a

- component of the Drosha and Dicer complexes. **Pnas.** 109:9 (2012) 3347–3352.
- KELLER, Sascha *et al.* - Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunology letters.** 107:2 (2006) 102–8.
- KIM, Dong Hee *et al.* - Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. **Gene.** 545:2 (2014) 185–93.
- KIM, V. Narry; HAN, Jinju; SIOMI, Mikiko C. - Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 10:2 (2009) 126–139.
- KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold - The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics.** 11:2010) 597–610.
- KUMAR, Subodh; REDDY, P. Hemachandra - Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.** 1862:9 (2016) 1617–1627.
- LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor - The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell.** 75:5 (1993) 843–854.
- LEHMANN, Sabrina M. *et al.* - An unconventional role for miRNA: *let-7* activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. **Nature Neuroscience.** 15:6 (2012) 827–835.
- LEWIS, Benjamin P. *et al.* - 33-Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell.** 115:7 (2003) 787–798.
- LI, Xiaoli *et al.* - Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. **Aging.** 3:10 (2011) 985–1002.
- LI, Zhonghan; RANA, Tariq M. - Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature Reviews Drug Discovery.** 13:8 (2014) 622–638.
- LIU, J. - Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. **Science.** 305:5689 (2004) 1437–1441.
- LODISH, Harvey *et al.* - **Molecular Cell Biology** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/?term=genome>>.
- MECO, Antonio DI; PRATICÒ, Domenico - MicroRNAs as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD.** 53:2016) 367–372.
- MEYER, Swanhild U.; PFAFFL, Michael W.; ULBRICH, Susanne E. - Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a «normal» way to a hidden layer of complexity? **Biotechnology letters.** 32:12 (2010) 1777–88.
- MHYRE, Timothy R. *et al.* - Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. **Sub-cellular biochemistry.** 65:2012) 389–455.
- NUNEZ-IGLESIAS, Juan *et al.* - Joint Genome-Wide Profiling of miRNA and mRNA Expression in Alzheimer's Disease Cortex Reveals Altered miRNA Regulation. **PLoS ONE.** 5:2 (2010) e8898.
- O'BRIEN, Richard J.; WONG, Philip C. - Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annual review of neuroscience.** 34:2011) 185–204.
- PAN, Yaoqian *et al.* - Dysregulation and Diagnostic Potential of microRNA in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease.** 49:1 (2015) 1–12.
- PERSENGIEV, Stephan *et al.* - Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis. **Neurobiology of Aging.** 32:12 (2011) 2316.e17–2316.e27.
- PRATT, Ashley J.; MACRAE, Ian J. - The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine *. **The Journal of biological chemistry.** 284:27 (2009) 17897–17901.

- QIN, Li-Xuan; TUSCHL, Tom; SINGER, Samuel - An Empirical Evaluation of Normalization Methods for MicroRNA Arrays in a Liposarcoma Study. **Cancer informatics**. 12:2013) 83–101.
- SANTULLI, Gaetano - **microRNA: Medical Evidence From Molecular Biology to Clinical Practice** 85-106
- SCHONROCK, Nicole *et al.* - Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-?? **PLoS ONE**. 5:6 (2010).
- SHEINERMAN, KIRA S, Umansky S. - Circulating miRNAs as Potencial Biomarkers in Alzheimer's Disease. **Cell Cycle**. 12:1 (2013).
- SHEINERMAN, Kira S. *et al.* - Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. **Aging**. 4:9 (2012) 590–605.
- SHEINERMAN, Kira S.; UMANSKY, Samuil R. - Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 7:2013) 150.
- SIM, Su-Eon; BAKES, Joseph; KAANG, Bong-Kiun - Neuronal Activity-Dependent Regulation of MicroRNAs. **Molecules and Cells**. 37:7 (2014) 511–517.
- SMALL, Eric M.; OLSON, Eric N. - Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. **Nature**. 469:7330 (2011) 336–342.
- THIES, William; BLEILER, Laura - 2012 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**. 8:2012) 131–168.
- TURCHINOVICH, A. *et al.* - Circulating miRNAs: cell-cell communication function? **Frontiers in genetics**. 4:2013) 119.
- VILARDO, Elisa *et al.* - MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. **The Journal of biological chemistry**. 285:24 (2010) 18344–51.
- WANG, Wang-Xia *et al.* - The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. 28:5 (2008) 1213–23.
- WANG, Xiaoying *et al.* - miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. **Brain research bulletin**. 80:4-5 (2009) 268–73.
- WANG, Zhiguo - miRNA Mimic Technology. Em **MicroRNA Interference Technologies** [Em linha]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009 [Consult. 11 set. 2016]. Disponível em:http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-00489-6_4>. p. 93–100.
- WANG, Zhiguo - The Principles of MiRNA-Masking Antisense Oligonucleotides Technology. Em [Em linha] [Consult. 28 ago. 2016]. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-863-8_3>. p. 43–49.

10. Anexos

Tabela 2 – Desregulação dos miRNAs (HU *et al.*, 2016).

miRNAs no cérebro		miRNAs no CSF	miRNAs no sangue		
Cortex	Hipocampo		Plasma	Soro	PBMC
miR-129-5p	miR-132-3p	miR-34a, miR-125b	miR-34a/c	miR-137	miR-34a
miR-27a-3p	miR-128	miR-146a, miR-29a	miR-146a	miR-18c	miR-181b
miR-92b-3p	miR-136-5p	miR-27a-3p	miR-128	miR-9	miR-200a
miR-200a	miR-138-5p	miR-24, miR-126	miR-132	miR-29a	let-7f
miR-148	miR-145	miR-10a/b, miR-16	miR-29a/b	let-7f	
miR-370	miR-124-3p	miR-138, miR-141	miR-874	miR-29b	
miR-409-5p	miR-129-5p	miR-143, miR-151	miR-134	miR-126	
miR-127-5p	miR-129-2-3p	miR-181a/c	miR-323-3p	miR-34a	
miR-496	miR-487	miR-191, miR-194	miR-382	miR-181b	
miR-633	miR-370	miR-195, miR-204	miR-137		
miR-874	miR-409-5p	miR-205, miR-214	miR-181c		
	miR-487	miR-221, miR-338			
Lau <i>et al.</i> (2013), Delay <i>et al.</i> (2012), Bekris <i>et al.</i> (2013)	Lau <i>et al.</i> (2013), Delay <i>et al.</i> (2012)	Bekris <i>et al.</i> (2013), Cogswell <i>et al.</i> (2008), Kiko <i>et al.</i> (2014), Muller <i>et al.</i> (2014), Sala Frigerio <i>et al.</i> (2013), Burgos <i>et al.</i> (2014)	Kumar <i>et al.</i> (2013), Bekris <i>et al.</i> (2013), Bhatnagar <i>et al.</i> (2014), Kiko <i>et al.</i> (2014)	Leidinger <i>et al.</i> (2013), Cheng <i>et al.</i> (2014), Tan <i>et al.</i> (2014b), Tan <i>et al.</i> (2014a), Geekyanage <i>et al.</i> (2012)	Schipper <i>et al.</i> (2007)

Tabela 3 – Atualização de potenciais biomarcadores para o diagnóstico da DA (GIAU *et al.*, 2015).

miRNA	Fonte	Método de descoberta	Significado	Resultado
Grupo sobre-expresso: miR-26b-3p, miR-28-3p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-148b-5p, miR-151a-3p, miR-186-5p, miR-425-5p, miR-550q-5p, miR-1468, miR-4781-3p, miR-5001-3p e miR-6513-3p	Sangue	Colhidos de RNA-Seq dataset; miRNA-Seq data analysis por omiRas e DIANA miR-Path	Regulação de vias potencialmente sub-expressas na DA	miRNAs podem ser usados como potenciais biomarcador para a DA
Grupo sub-expresso: let-7a-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let7g-5p, miR-15a-5p, miR-17-3p, miR-29b-3p, miR-98-5p, miR-144-5p, miR-148a-3p, miR-502-3p, miR-660-5p, miR-1294 e miR-3200-3p	Plasma	Sequenciação Solexa: RT-qPCR	Na DA, estão relacionados com a sobre-regulação da comunicação celular miR-93 e miR-146a estavam significativamente elevados em MCI; miR-31, miR-93 e miR-146a podem ser usados para discriminar a DA da VD	miRNAs podem ser usados como potenciais biomarcadores para a DA
miRNA-34c	Plasma	Análise Taqman microRNA RT-qPCR e Western Blot	Os níveis do miR-34c podem refletir tanto nas células mononucleares do sangue como no plasma podem refletir alterações na circulação do sangue das amostras dos doentes com DA	Como um biomarcador associado ao envelhecimento sistêmico
Assinatura 7-miRNA	Plasma	Caraterização da expressão high-throughput dos miRNAs; TaqMan qPCR	Sugere a perturbação de múltiplas vias enzimáticas que podem ter um papel na etiologia da DA	Fornecer novos alvos para fármacos e clarifica a etiologia da DA
9 miRNAs informativos: miR-505-5p, miR-4467, miR-766, miR-708, miR-3622b-3p, miR-296, miR-219 e miR-103	CSF	RT-qPCR e quantificação miRNA; <i>In silico Pathway Analysis</i> (IPA)	Bases de dados podem identificar um conjunto de genes associados à DA (MAPT, BACE1 e mTOR) que são alvo destes miRNAs	Biomarcadores promissores e robustos para o diagnóstico da DA
Assinatura 12-miRNA: miR-112, miR-161, let-7d-3p, miR-5010-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1285-5p e hsa-miR-151a-3p sobre-regulados; miR-103a-3p, miR-107, miR-532-5p, miR-26b-5p, let-7f-5p sub-regulados	Sangue periférico	Sequenciação da próxima geração	Usando a assinatura dos 12 miRNAs pode ser possível distinguir com um diagnóstico de alta precisão entre doentes com DA e controlos saudáveis	Como biomarcadores no diagnóstico da DA bem como outras doenças neurológicas
Aumento significativo no miR-9, miR-125b, miR-146a, miR-155	CSF e ECF	Microarray	Os miRNAs mais abundantes no CSF e ECF encontram-se aumentados no cérebro com DA	Proliferação do

DA – Doença de Alzheimer, **CSF** – líquido céfalo-raquídeo; **BACE** – β -secretase; **MCI** – Comprometimento Cognitivo; **VD** – demência vascular; **CNS** – Sistema Nervoso Central; **MAPT** – Microtúbulo associado à proteína Tau; **mTOR** – Alvo dos mamíferos da rapamicina; **RT-qPCR** – Análise por PCR quantitativa em tempo real