

**Felipe Delatorre Busser**

**Mirnômica e proteômica no líquido de doentes  
com esclerose lateral amiotrófica**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2024**

**Felipe Delatorre Busser**

**Mirnômica e proteômica no líquido de doentes  
com esclerose lateral amiotrófica**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Busser, Felipe Delatorre

Mirnômica e proteômica no líquido de doentes com esclerose lateral amiotrófica / Felipe Delatorre Busser; Gerson Chadi, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) - Programa de Neurologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.  
Versão corrigida.

1. Esclerose lateral amiotrófica 2. microRNA 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real 4. Líquido cérebro-espinal 5. Biomarcadores I. Chadi, Gerson, orient. II. Título

USP/FM/DBD-437/23

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

**D**edico este trabalho

a todos os pacientes com ELA. Espero que ele contribua no avanço do conhecimento acerca dessa doença tão complexa para que, no futuro, possa trazer benefícios para os pacientes,

e

à minha família, que sempre me apoiou.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Eduardo e Claudia, que sempre me incentivam e me apoiam em minhas empreitadas.

Agradeço ao Prof. Dr. Gerson Chadi, meu orientador, pela confiança depositada durante os projetos desenvolvidos ligados a este trabalho direta ou indiretamente, e pela aprendizagem que sua convivência me proporcionou.

Agradeço à Dra. Fátima Solange Pasini do ICESP, por ter auxiliado o LIM-45 no desenvolvimento da metodologia de pesquisas em microRNAs.

Agradeço à Dra. Joyce Meire Gilio, do LIM-45, pela inestimável ajuda como co-orientadora deste trabalho, supervisionando a análise de dados e discussões em geral.

Agradeço à Dra. Jessica Ruivo Maximino, Pesquisadora do LIM-45, pela especial atenção devotada aos procedimentos de modelagem molecular e descoberta de novos mecanismos moleculares envolvidos na proposta deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos e colaboradores do Laboratório de Investigação Médica em Neurologia Translacional (LIM-45) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde foi desenvolvido este trabalho.

Agradeço à Dra. Ida Fortini, do Ambulatório de Cefaleia do HCFMUSP, por disponibilizar os pacientes com cefaleia crônica sem doença neurológica de base.

Agradeço ao Dr. Hélio Rodrigues, do Setor de Líquor do Laboratório Central do HCFMUSP, pela coleta de líquido.

Agradeço ao Dr. Frederico M. H. Jorge, do Ambulatório de ELA do HCFMUSP, pela indicação dos doentes com ELA, alguns dos quais indicados como sujeito da pesquisa pelo Prof. Dr. Gerson Chadi.

Agradeço ao Prof. Dr. Giuseppe Palmisano, por todo o suporte dado durante a fase de desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao CNPq (processo 380920/2019-0) e à CAPES (processo 140491/2020-1) pelas bolsas concedidas, fundamentais para que eu pudesse realizar este trabalho. Agradeço ao CNPq pelo financiamento do projeto (processo 401922/2014-6) e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento dessa publicação:

Referências – adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO .....	1
1.1.	A Genética da ELA .....	4
1.2.	Principais eventos moleculares propostos na fisiopatologia da ELA .....	6
1.3.	MiRNAs e ELA.....	10
2.	OBJETIVOS .....	14
2.1.	Geral.....	14
2.2.	Específicos .....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1.	Sujeitos incluídos no estudo.....	15
3.2.	Investigação de miRNAs pela Plataforma de PCR Array .....	17
3.2.1.	Extração, transcrição reversa e pré amplificação de RNA total do LCE.....	17
3.2.2.	Transcrição reversa e PCR em tempo real do <i>spike in</i> para avaliação das amostras .....	18
3.2.3.	Amostra referência .....	19
3.2.4.	Reação múltipla e simultânea em cadeia de polimerase (PCR Array) .....	19
3.2.5.	Análise do perfil de expressão dos miRNAs .....	20
3.3.	Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) dos miRNAs identificados.....	21
3.3.1.	Análises estatísticas das qPCRs .....	22
3.4.	Identificação de proteínas relacionadas aos miRNAs .....	22
3.5.	Proteínas desreguladas no LCE identificadas pela proteômica.....	23
3.6.	Identificação de moléculas e mecanismos biológicos de destaques a partir das proteínas comuns nos estudos da proteômica e da miRNAs/MirWalk.....	24
3.6.1.	Identificação das proteínas comuns.....	24
3.6.2.	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> (DAVID) e Redes de Interação de proteínas .....	24
3.6.3.	Proteínas de destaque nas análises Intra-vertente e Inter-vertente .....	25



3.6.4. Contribuição da Rede de Interação de Proteínas nos destaques das vertentes	27
3.6.5. Criteorização final para a identificação das moléculas e mecanismos biológicos de destaque	27
3.7. Análise do perfil de moléculas selecionadas a partir das modulações, no LCE dos sujeitos através de Luminex	28
4. RESULTADOS	31
4.1. miRNAs identificados pela plataforma de PCR array	31
4.1.1. Identificação do normalizador	32
4.1.2. miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos ELA e não ELA	32
4.1.3. PCR quantitativo dos miRNAs diferencialmente expressos	33
4.2. Moléculas relacionadas a cada miRNA, identificadas pelo miRWalk	35
4.3. Proteínas desreguladas no LCE pela proteômica e a correlação delas com as moléculas validadas apontadas pelo miRWalk	35
4.4 Mecanismos de destaque das 57 proteínas identificadas na correlação dos miRNA com a Proteômica	37
4.4.1 Identificação de mecanismos moleculares pelo DAVID	37
4.4.2 Identificação de alvos moleculares de interesse a partir de redes de interações das proteínas pelo Cytoscape	43
4.4.3 Criteorização final para a identificação das moléculas e mecanismos ressaltados	45
4.5. Análise da regulação de proteínas pelo LUMINEX	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	58
7. ANEXO	59
8. REFERÊNCIAS	65

## RESUMO

Busser F D. *Mirnômica e proteômica no líquido de doentes com esclerose lateral amiotrófica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal de causa desconhecida. Considerando as evidências recentes da participação dos microRNAs (miRNAs) em eventos neurodegenerativos e de seus promissores papéis como biomarcadores, este estudo analisou por qPCR (TLDA) o perfil de miRNAs no líquido cérebro-espinal (LCE) de doentes ELA em relação a sujeitos não portadores de ELA. Os genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos nos doentes com ELA foram evidenciados através da plataforma miRWalk 3.0. Tais alvos foram correlacionados às proteínas desreguladas no LCE de doentes ELA por espectrometria de massa (LC-MS) em estudo anterior. Análises de bioinformática identificaram as vias moleculares relativas a estas proteínas. Verificou-se que os miRNAs 100-5p, 346, 338-5p, 520D-3p, 584, 638, 639, 875-5p, evidenciados na comparação entre os dois grupos do estudo, estão associados à regulação da expressão de 135 proteínas validadas apontadas pelo MiRWalk (7.810 preditas). A análise de correlação entre as proteínas reguladas pelos miRNAs desregulados e o estudo de proteômica dos grupos ELA e não ELA (LC-MS) evidenciou 57 proteínas. Os resultados das análises enriquecidas feitas a partir dessas proteínas realçaram as categorias *Prion diseases*, *Blood Coagulation*, *Extracellular Exosome*, *Plasma Membrane* e *Calcium Ion Binding*, além de destacaram as moléculas APP, CDH13, FGA, FGB, CD59, C6, C7, C9, NCAM, NCAM1, PLG, CNTN1 e SERPIND1 no LCE dos sujeitos ELA como relevantes a serem detalhados em estudos futuros da fisiopatologia e o desenvolvimento de biomarcadores para ELA.

Descritores: Esclerose Lateral Amiotrófica. microRNA. PCR array. PCR em tempo real. Líquido cérebro-espinal. Biomarcador

## ABSTRACT

Busser F D. *Myrnomics and proteomics in the cerebro spinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease of unknown cause. Considering the recent evidence of the participation of microRNAs (miRNAs) in neurodegenerative events and their promising roles as biomarkers, this study analyzed by qPCR (TLDA) the profile of miRNAs in the cerebrospinal fluid (CSF) of ALS patients in relation to subjects without ALS carriers. The target genes of differentially expressed miRNAs in ALS patients were highlighted using the miRWalk 3.0 platform. Such targets were correlated with proteins differentially expressed in the CSF of ALS patients by mass spectrometry (LC-MS) in a previous study. Bioinformatics analyzes identified the molecular pathways related to these proteins. It was found that the miRNAs 100-5p, 346, 338-5p, 520D-3p, 584, 638, 639, 875-5p, evidenced in the comparison between the two study groups, are associated with the regulation of the expression of 135 proteins validated points indicated by MirWalk (7,810 predicted). The correlation analysis between the proteins regulated by some of the miRNAs highlighted and the proteomics study of the ALS and non-ALS groups (LC-MS) revealed 57 proteins. The results of the enrichment analysis carried out using these proteins highlighted the categories Prion diseases; Blood Coagulation; Extracellular Exosome; Plasma Membrane and Calcium Ion Binding, and highlighted the molecules APP, CDH13, FGA, FGB, CD59, C6, C7, C9, NCAM, NCAM1, PLG, CNTN1 and SERPIND1 in the CSF of ALS subjects as relevant in future studies of pathophysiology and the development of biomarkers for ALS.

Descriptors: Amyotrophic Lateral Sclerosis. microRNA. PCR array. Real-time PCR. Cerebrospinal fluid. Biomarker

## 1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios motores no cérebro, tronco encefálico e medula espinal (Mulder, 1982). A doença foi inicialmente descrita pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot em 1869 (Charcot; Joffroy, 1869). Sua principal característica neuropatológica é a degeneração do trato corticoespinal e dos neurônios piramidais do córtex motor primário e a extensiva degeneração dos neurônios motores inferiores do corno anterior da medula espinal e do tronco encefálico (Redler; Dokholyan, 2012). A ELA é de evolução rápida e caracteriza-se como problema social importante, pois acomete indivíduos em idade produtiva e gera custos elevados com cuidados gerais pela incapacidade motora progressiva (Dietrich-Neto et al., 2000).

Os principais sinais e sintomas da ELA são fraqueza, espasticidade, reflexos patológicos, fasciculações, câibras e atrofia muscular (Mitsumoto et al., 2004). A perda da inervação dos músculos respiratórios e as complicações associadas são as causas mais frequentes da morte do paciente (Cleveland; Rothstein, 2001). Na maioria das vezes a ELA inicia-se nos membros, mas em cerca de um terço dos casos se manifesta inicialmente de forma bulbar, onde o paciente apresenta dificuldade na fala, deglutição e respiração (Brown; Al-Chalabi, 2017).

Dados epidemiológicos mostram que o início da doença predomina em média entre as idades de 51 e 66 anos, sendo que a maioria dos doentes sobrevive de 2 a 4 anos após o diagnóstico (Longinetti; Fang, 2019). A incidência anual difere nas diversas descrições e origens, mas o estudo de meta-análise que avaliou 44 trabalhos, apontou incidência de aproximadamente 1,75 casos para cada 100.000 pessoas em todo o mundo (Marin et al.,

2017). No Brasil, a idade de início da doença foi observada entre 45 e 80 anos, a taxa de mortalidade na população variou de 0,61 a 0,89 casos para cada 100.000 pessoas-ano e a taxa de incidência muito próxima do que é observado mundialmente, de acordo com estudo feito entre os anos de 2004 e 2013 (Moura et al., 2016). Assim, a doença não é tão rara, sendo a terceira neurodegenerativa do adulto mais prevalente, atrás do Mal de Alzheimer e da Doença de Parkinson.

Embora ainda não haja uma cura para a ELA, o manejo clínico tem se aperfeiçoado cada vez mais em centros especializados, sendo este mais multidisciplinar, possibilitando assim ao paciente melhor qualidade de vida desde os estágios mais iniciais da doença (Norris et al., 2020).

Em termos de terapia medicamentosa, o Riluzol é o que se apresenta com mais frequência no manejo da ELA, e embora se saiba que ele reduz as concentrações de glutamato na fenda sináptica, seu mecanismo de ação exato na ELA ainda é desconhecido; ele apresenta um aumento na sobrevida dos pacientes de 6 a 19 meses (Andrews et al., 2020). Mais recentemente, o Edaravone foi aprovado por algumas agências reguladoras (Japão, Coreia do Sul e EUA) para o tratamento da ELA (Takahashi et al., 2017). Trata-se de uma droga eliminadora de radicais livres que diminui o estresse oxidativo, porém ainda com seu uso controverso em relação a ELA pois não há estudos que comprovem sua eficácia em uma coorte significativa de pacientes (Takahashi et al., 2017).

O diagnóstico da ELA é difícil e muitas vezes feito por exclusão com suporte do histórico clínico-laboratorial do paciente (Rowland, 2001). Exames neurofisiológicos e de neuroimagens também podem contribuir para o diagnóstico (Kalra; Arnold, 2003; de Carvalho et al., 2008). Os critérios de *Awaji-Shima* incluíram variáveis eletrofisiológicas ao algoritmo anterior de *El Escorial* aumentando a sensibilidade diagnóstica (de Carvalho

et al., 2008). É necessária a indicação de que tanto os neurônios motores superiores quanto os inferiores estejam comprometidos.

A falta de testes diagnósticos efetivos dificulta o diagnóstico precoce da doença, visto que muitas vezes os sintomas iniciais se assemelham muito aos de outras doenças. Dessa forma, abordagens que levem à redução da latência do tempo do diagnóstico, a transferência mais rápida do paciente ao neurologista ou a não realização de intervenções cirúrgicas desnecessárias serão fundamentais para a melhora da qualidade de vida dos doentes (Bakola et al., 2014).

O maior obstáculo tanto para aperfeiçoar o diagnóstico quanto o tratamento para ELA é o desconhecimento dos mecanismos exatos responsáveis pela degeneração neuronal, assim como a relação heterogeneidade clínica dos pacientes/tamanho limitante dos ensaios terapêuticos. Marcadores biológicos são essenciais para a adequação dos protocolos e interpretação subsequente que contribua para o avanço no conhecimento de tais mecanismos e de alvos terapêuticos (Bradley, 1999).

Muitos candidatos a marcadores biológicos (biomarcadores) são sugeridos (Poser; Bunch, 1966; Turner et al., 2009) especificamente a partir: da análise de moléculas dos fluidos LCE, soro e urina (Bowser et al., 2011); dos exames de neuroimagem (tomografia por emissão de pósitrons, ressonância nuclear e magnética) (Turner et al., 2012); exames neurofisiológicos, incluindo a eletroneuromiografia (ENMG); estimulação magnética transcraniana (Vucic; Kiernan, 2013); miografia por impedância elétrica (Rutkove et al., 2012). No entanto, relativamente poucos desses estudos foram replicados e só a ENMG mostrou boa sensibilidade e especificidade (Makki; Benatar, 2007), por isso tornou-se parte da rotina clínica.

Collins et al. (2015) empregaram a espectrometria de massa para análise proteômica no LCE de pacientes com ELA com idade média de 45 anos, sendo que em sete deles o

início da doença ocorreu nos membros e em apenas dois o início foi bulbar. Os resultados demonstraram 20 proteínas com regulação positiva significativa, sendo o Neurofilamento com maior nível, e as 20 proteínas com regulação negativa, sendo que o Domínio 8 do fator de crescimento epidermal, a proteína com maior grau de regulação negativa (Collins et al., 2015).

### 1.1. A Genética da ELA

A ELA é classificada em duas formas, a esporádica, que ocorre na maioria dos casos e não há um componente genético aparente, e a familiar, que apresenta componente hereditário e está presente entre 5 e 10% dos casos (Taylor et al., 2016).

O primeiro evento genético observado que está relacionado à ELA foi a mutação no gene da enzima superóxido dismutase 1 (*SOD1*), reportado em 1993 (Rosen et al., 1993). Desde então, mais de 100 genes têm sido relacionados à doença, como *TARDBP* (Sreedharan et al., 2008), *ATXN2* (Elden et al., 2010) e *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez M et al., 2011), além de alguns descritos a partir de 2014 como *MATR3*, *CHCHD10*, *TBK1*, *TUBA4A*, *NEK1*, *C21ORF2* e *CCNF* (Chia et al., 2018).

De forma geral, mutações observadas na ELA levam a tradução de proteínas que se dobram de forma incorreta, formadas erroneamente ou ainda que se localizam em compartimentos celulares diferentes dos observados normalmente, tendo assim a suas respectivas funções alteradas.

Outros eventos genéticos já descritos como relacionados à ELA incluem: mutações em *SOD1* e a superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Baltazar et al.,

2014); defeitos estruturais em DNA mitocondrial e anormalidades no genoma mitocondrial, e mutações no RNA de transferência mitocondrial (mt-tRNA) e no complexo citocromo c (complexo IV); a regulação positiva da ciclooxigenase (COX: mutação no ponto tRNA<sup>Ile</sup>), visto que as fibras COX-negativas são relatadas como comum no músculo esquelético de pacientes (Dhillon et al., 2014).

Além disso, genes associados a ELA familiar codificam proteínas que podem promover a disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma, por exemplo: mutações em *SOD1* estão associadas à expressão reduzida de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, do retículo endoplasmático transicional ATPase (também conhecido como proteína contendo valosina, ou VCP) e da ubiquilina-2 (codificada por *UBQLN2*), o que interfere na entrega de substrato ao proteassoma que é conseqüentemente interrompido, impossibilitando assim que proteínas anômalas sejam degradadas. Aliás, o mesmo estudo mostrou a desregulação das proteínas chaperonas na ELA associada às mutações em *SOD1* e *TARDBP37* de camundongos (Bergemalm et al., 2010). Também foi descrita a perda da função de TDP43 (codificada pelo gene já descrito como relacionado à ELA, *TARDBP*) associada a uma alteração da função do tráfico endossomal em dendritos (Schwenk et al., 2016).

Outras variantes de genes associados a ELA, como mutações em *ALS2* e *UNC13A* (que codificam as proteínas Alsina e UNC-13 homóloga A – UNC-13A, respectivamente), também podem afetar o transporte endossomal e vesicular. De fato, a Alsina parece estar envolvida no tráfego e fusão de endossomos (Devon et al., 2006) e UNC-13A envolvida na preparação de vesículas sinápticas e na liberação de neurotransmissores (Böhme et al., 2016).



## **1.2. Principais eventos moleculares propostos na fisiopatologia da ELA**

Os mecanismos fisiopatológicos da ELA ainda não estão totalmente compreendidos. Vários foram propostos para explicar a degeneração dos neurônios motores, dentre eles o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade glutamatérgica, a agregação de proteínas e a participação das células gliais (Poser; Bunch, 1966; Turner et al., 2009), porém nenhum deles mostrou argumentos que explicassem completamente todos os eventos observados na doença.

Recentemente, outros mecanismos têm sido elencados como partícipes dentro do processo de neurodegeneração observado na ELA. Entre eles, a alteração no metabolismo de RNA, defeitos no transporte nucleocitoplasmático de RNAs, proteólise prejudicada, reparo de DNA prejudicado, defeitos no transporte axonal de vesículas, neuroinflamação e mal funcionamento dos oligodendrócitos (Mejzini et al., 2019).

Um mecanismo clássico é a excitotoxicidade glutamatérgica. Os neurônios motores são especialmente sensíveis ao excesso de cálcio que entra em seu citoplasma devido a uma hiperestimulação provocada pelo excesso de glutamato na fenda sináptica, pois têm uma capacidade de tamponamento de cálcio inferior e receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA) que são mais permeáveis ao cálcio (visto que contêm menos da subunidade GluR2) do que outros subtipos neuronais (Laslo et al., 2001). Esse excesso de glutamato na fenda sináptica é consequência de defeitos ou ausência de transportadores de glutamato, que retiram o glutamato da fenda. Em ELA a perda de transportadores EAAT2 em membranas de células gliais foi observada tanto em modelos de roedores como em pacientes (Hardiman et al., 2017).

Alterações no RNA mensageiro (mRNA) também foram relacionadas à ELA. Uma parte significativa do transcriptoma é alterado em modelos de ELA relacionados a *TARDBP*, e a desregulação da expressão gênica também foi observada em relação a mutações nos genes *C9ORF72*, *SOD1* e *FUS61*, incluindo alterações na transcrição, *splicing* alternativo de mRNA, transporte axonal de mRNAs e biogênese de microRNAs (Chen-Plotkin et al., 2010; Arnold et al., 2013; Ratti et al., 2016).

Muitas proteínas de ligação do mRNA também estão envolvidas em *splicing*, transcrição, transporte, tradução e armazenamento dessa molécula em grânulos de estresse. O número dessas proteínas de ligação, envolvidas na neurodegeneração, vem aumentando e inclui o EWS, TAF15 (envolvidos no FTD) (Neumann et al., 2011), hnRNPA1 (Kim et al., 2013) e MATR3 (Johnson et al., 2014). Diversos fatores de ligação ao RNA são encontrados sequestrados em associação com a repetição expansão hexanucleotídica no transcrito do gene *C9ORF72* (Lee et al., 2013; Cooper-Knock et al., 2014). Estas descobertas têm levado a um interesse crescente no papel do metabolismo do RNA em doenças neurodegenerativas (Mejzini et al., 2019).

Curiosamente, muitas das proteínas de ligação ao RNA relacionadas à ELA contêm domínios semelhantes a príons que estão envolvidos na formação ou na dinâmica dos grânulos de estresse, incluindo TDP-43, FUS, TAF15, ESWR1, hnRNPA1 e hnRNPA2B1. Os grânulos de estresse são complexos de RNA/proteína transitórios formados sob estresse celular, são capazes de sequestrar RNAs mensageiros específicos e impedir sua tradução. Esses grânulos facilitam a sobrevivência celular pela parada translacional de transcritos não essenciais e proteínas pró-apoptóticas quando sob estresse (Protter; Parker, 2016). Domínios proteicos semelhantes a príons são tidos como importantes para a montagem, reversível, desses grânulos de estresse devido a sua capacidade de formar múltiplas interações fracas e transitórias (Harrison; Shorter, 2017).

Nos últimos anos, inúmeros estudos apontam uma participação significativa do sistema imunológico na patogênese da ELA. Demestre e colaboradores (2005) demonstraram que imunoglobulinas de pacientes com ELA causavam apoptose em células de culturas primárias de neurônios motores da medula espinhal, assim como a transferência passiva dessas imunoglobulinas a camundongos gerava um processo de degeneração dos neurônios motores (Pullen et al., 2004; Demestre et al., 2005). Além disso, foi observado aumento da produção de moléculas do sistema complemento durante o processo de degeneração na ELA, tanto em tecido post mortem como em LCE de pacientes (Sta et al., 2011; Ganesalingam et al., 2011). A neuroinflamação, que envolve tanto a ativação da micróglia, o recrutamento de linfócitos e macrófagos, reativação de astrócitos, bem como o sistema complemento, parece ter um papel importante na patogênese da ELA (Liu; Wang, 2017).

A microglia corresponde às principais células do sistema imunológico que residem no sistema nervoso central (SNC) e estão envolvidas tanto na manutenção da homeostase como na defesa do organismo contra agentes agressores. Essas células são mesenquimais, mielóides e originárias do saco vitelino, capazes de autorrenovação independentemente das células tronco hematopoiéticas (Tay et al., 2017). Hickman e colaboradores (2018) propuseram, com base em trabalhos de expressão gênica e estudos funcionais, uma definição de microglia que correlaciona sua expressão gênica com suas funções. A análise de RNA-seq identificou um novo conjunto de marcadores específicos da microglia no cérebro saudável que incluem HexB, P2ry12, S100A8, S100A9, Tmem119, Gpr34, SiglecH, TREM2 e Olfml37. O grupo concluiu a partir da análise dos transcriptomas microgliais três funções essenciais desempenhadas pela microglia: sentir seu ambiente, conduzir a manutenção fisiológica e proteção contra agentes autolesivos modificados e não próprios. Essas funções normais são importantes em vários estágios de

desenvolvimento, desde os embrionários até a idade adulta e o envelhecimento. (Hickman et al., 2018).

Nota-se, portanto, que a microglia tem um papel de alta relevância dentro do SNC, em geral, de neuroproteção e suporte aos neurônios. Na ELA, porém, não é o que se observa. Inúmeros trabalhos mostram que a microglia exibe um comportamento neurotóxico quando ativada, promovendo assim a morte neuronal. A questão, é se esta ativação é uma causa ou uma consequência da doença (Haukedal et al., 2019). De fato, foi demonstrado que diversos genes relacionados à microglia possuem mutações associadas com a ELA. Em um estudo que analisou o exoma de 252 indivíduos com ELA familiar e 827 indivíduos controles, foi mostrado que a haploinsuficiência do gene *TBK1* (codifica a proteína TANK-binding quinase 1) está relacionada com os casos de ELA familiar, enfatizando o papel das células gliais e neuroinflamação na patogênese da doença (Freischmidt et al., 2015), pois *TBK1* é um conhecido regulador do sistema imunológico inato e influencia a produção de interferon- $\alpha$  ( $IFN\alpha$ ) e interferon- $\beta$  ( $IFN\beta$ ), estando assim diretamente envolvido na neuroinflamação. Outros genes como *OPTN*, *SQST1* e *VCP* também foram associados à neuroinflamação e microglia, visto que eles, com *TBK1*, podem influenciar o fator nuclear-kappa B ( $NF-\kappa B$ ), um dos reguladores de ativação glial e neuroinflamação (Zhu et al., 2007; Cirulli et al., 2015).

O fato de haver tantos estudos que apresentam possíveis mecanismos e alterações gênicas relacionadas a eles e que culminam na degeneração dos neurônios motores na ELA, revela que a doença pode ter um caráter complexo e muito provavelmente multifatorial, no sentido de não ser apenas um único evento que leva à neurodegeneração, mas sim um conjunto de eventos interligados ou que ocorrem isoladamente. Isso também se reflete na questão da heterogeneidade da doença, visto que dependendo de quais eventos ocorrem, a manifestação clínica da doença pode mudar.

### 1.3. MiRNAs e ELA

Em uma outra linha, miRNAs também têm sido descritos como possuindo papéis importantes em doenças neurodegenerativas, inclusive como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico (Dangla-Valls et al., 2017; Lusardi et al., 2017).

MiRNAs consistem em sequências curtas de RNAs não codificantes (cerca de 22 nucleotídeos) que regulam a expressão gênica através de uma ligação específica a alvos no mRNA, promovendo sua degradação e/ou inibição da tradução, ou ainda, promovendo sua tradução.

Na maioria dos organismos existe um número limitado de miRNA em comparação a mRNAs e proteínas, porém um único miRNA pode regular centenas de mRNAs e conseqüentemente influenciar de forma significativa em centenas de redes de expressão gênica (Pritchard et al., 2012).

Cada vez mais, o papel dos miRNAs como potentes reguladores de diversos processos nos organismos vêm sendo mostrado. A análise de seu perfil de expressão tem ajudado na compreensão de uma série de eventos como, por exemplo, desenvolvimento e diferenciação tecidual (Wienholds et al., 2005; Alvarez-Garcia; Miska, 2005), o que possibilitou que os miRNAs fossem investigados como agentes de reprogramação de destino celular em aplicações de células tronco e como auxiliares na identificação do estado de diferenciação de células cancerígenas de origem desconhecida, além de também serem utilizados como marcadores moleculares no diagnóstico e prognóstico de diversas categorias de neoplasias (Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008).

No sistema nervoso, os miRNAs já foram associados ao processo de neurodegeneração. Ziu e colaboradores (2011) demonstraram que vários miRNAs

tiveram seus níveis alterados em diferentes períodos, numa cultura de astrócitos de rato, após a privação de oxigênio-glicose para simular lesão isquêmica, incluindo os miRNAs 21, 29b, 30b, 107, 137 e 210 (Ziu et al., 2011). Também já foram associados miRNAs de astrócitos com a neuroinflamação: o estudo examinou os níveis de miRNA de roedores e primatas após tratamento com lipopolissacádeo (LPS) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Os autores descobriram que miRNAs como o 146a, 146b e 155 apresentaram níveis aumentados em astrócitos corticais de camundongo após o tratamento com LPS e IFN- $\gamma$ , enquanto miRNA 351, 455 e 149 apresentaram níveis diminuídos (Mor et al., 2011). Também foi descrito um papel não convencional para o miRNA let-7, um regulador altamente abundante da expressão gênica no sistema nervoso central, onde de forma extracelular ele ativa o receptor do tipo *Toll 7* (*Toll-Like Receptor 7*; TLR7), sensível ao RNA, e induz a neurodegeneração através do receptor neuronal TLR7 (Lehmann et al., 2012). O LCE de indivíduos com doença de Alzheimer contém quantidades aumentadas de let-7b e a introdução extracelular de let-7b no LCE de camundongos por injeção intratecal resultou em neurodegeneração (Lehmann et al., 2012).

Haja visto que existem inúmeros genes já associados à ELA e que os miRNAs regulam muitos desses genes, é de grande importância a verificação de quais miRNAs estão regulando quais genes no complexo processo de neurodegeneração, de modo a se buscar melhor compreensão da doença como um todo. Para tal, diversos grupos vêm desenvolvendo trabalhos que procuram correlacionar os miRNAs a determinados genes que podem estar envolvidos na ELA.

Em pacientes, há estudos que analisaram o perfil de miRNAs tanto em tecido nervoso (medula e parte do encéfalo), como em plasma e LCE. Benigni e colaboradores (2016) estudando 3 *pools* de LCE de 24 pacientes ELA, sugeriu três miRNAs (miR181a-5p, miR15b-5p, miR21-5p) como possíveis marcadores para o diagnóstico da doença, a

partir da análise de PCR array de um painel de 372 miRNAs já pré-estabelecidos (Benigni et al., 2016).

Outro estudo relatou que a formação de vesículas extracelulares e os níveis de miRNA são desreguladas em astrócitos de pacientes ELA que carregam a mutação C9ORF72, e isso afeta a manutenção da rede de neuritos e a sobrevivência de neurônio motor *in vitro* (Varcianna et al., 2019). O estudo mostrou uma regulação negativa de miRNA 494-3p, um regulador negativo da semaforina 3A (SEMA3A) e outros alvos envolvidos na manutenção axonal, e que, ao restaurar os níveis de miR-494-3p por meio da expressão de um mimetizador de miRNA projetado, os níveis de SEMA3A diminuíram em neurônios motores e aumentaram sua sobrevivência *in vitro* (Varcianna et al., 2019).

Esses dados sugerem uma relação dos miRNAs com esses processos, de forma que investigações sobre como se dão essas relações são de extrema importância na compreensão deles, além de possibilitar que os miRNAs se tornem ferramentas tanto para o desenvolvimento de marcadores, como de alvos para a introdução de novas terapias.

Os miRNAs têm sido investigados no LCE em situações, tais como depressão (Wan et al., 2015), Alzheimer (Riancho et al., 2017), acidente vascular cerebral (Sorensen et al., 2014), linfoma primário de células B no sistema nervoso central (Baraniskin et al., 2011), entre outras. O LCE é, de fato, a via natural para o estudo de moléculas que possam ajudar a entender os mecanismos envolvidos na ELA, pois mantém um contato anatômico com a área lesada e pode refletir mais substancialmente as mudanças bioquímicas locais. Além disso, visto que a amostragem de tecido da medula espinhal e cérebro são impeditivos para o doente vivo, o LCE obtido por punção lombar é um material potencialmente valioso nas explorações em larga escala das mudanças dos conteúdos de moléculas durante a progressão da ELA (Chelstowska; Kuzma-Kozakiewicz, 2014).

As diferentes hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na ELA e tudo que foi mostrado experimentalmente acerca dos mesmos, assim como a dificuldade de se estabelecer um diagnóstico bem precoce e certo, geram grandes dúvidas acerca da doença e dificultam muito o estabelecimento de terapias efetivas, bem como refletem o caráter heterogêneo da doença. Dessa forma, a ELA se apresenta cada vez mais como uma doença complexa, e há grande necessidade de desenvolvimento de mais estudos a fim esclarecer, pelo menos em parte, os processos envolvidos e assim permitir a criação e a validação de condutas clínicas cada vez mais adequadas aos pacientes.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Identificar mecanismos e alvos moleculares envolvidos na doença pela análise da expressão de miRNAs no LCE de doentes com a ELA.

### 2.2. Específicos

- a) Identificar miRNAs diferencialmente expressos no LCE de doentes com ELA em relação aos sujeitos controles sem a ELA utilizando PCR array e verificar a regulação deles por qPCR;
- b) Identificar proteínas reguladas pelos miRNAs diferencialmente expressos por bioinformática (análise *in silico*);
- c) Identificar as proteínas reguladas pelos miRNAs que se apresentaram desreguladas no LCE de doentes ELA em um estudo prévio de proteômica realizado pelo nosso grupo;
- d) Identificar possíveis mecanismos e alvos moleculares relacionados à ELA a partir de análises enriquecidas das proteínas comuns entre os estudos de mirnômica e de proteômica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP; Número do processo: 2.825.756). Todos os participantes foram informados dos detalhes da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 3.1. Sujeitos incluídos no estudo

O estudo incluiu 19 doentes com diagnóstico de ELA esporádica (Tabela 1), de ambos os sexos (8 mulheres e 11 homens), com idades variando entre 42 e 67 anos (média 56 anos) acompanhados no Ambulatório de Pesquisa em ELA do HCFMUSP. Um doente foi incluído apenas no estudo de proteômica.

Dentre os doentes, 9 apresentaram o membro superior como local de início da manifestação dos sintomas, 5 apresentaram no membro inferior, 1 relatou ambos os membros e 4 a forma bulbar. O diagnóstico da doença foi realizado com base nos critérios de *El Escorial* Revisados que envolvem a presença de sinais evolutivos de comprometimento dos neurônios motores superiores e inferiores com ausência de fatores que possam justificar os sinais e sintomas apresentados por outra causa (Brooks et al., 2000). Doentes que apresentaram quaisquer comorbidades não foram incluídos do estudo.

Amostras de 8 sujeitos não ELA com história de cefaleia crônica e que apresentaram evento álgico agudo com quadro de irritação meníngea de instalação aguda e suspeita de hemorragia meníngea, o que justificou a avaliação do LCE, foram utilizadas como controle (Tabela 2). Os resultados laboratoriais da análise do LCE destes sujeitos foram normais (quimiocitológico e microbiológico).

O LCE dos sujeitos foi coletado através de punção lombar, procedimento esse realizado na Divisão de Coleta de Líquor do Laboratório Central do HCFMUSP por médico responsável, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras foram coletadas em tubos estéreis e livres de DNase e RNase, sendo que, 2 mL permaneceram no Laboratório Central do HCFMUSP para análises de rotina e aproximadamente 5 mL foram processados no LIM-45, centrifugados a 300 g por 10 minutos a 4°C, aliquotadas e armazenadas em freezer a -80°C até o momento do uso.

**Tabela 1** - Doentes do grupo ELA incluídos no estudo

Sujeitos	Idade (anos)	Etnia	Sexo <sup>1</sup>	Local início <sup>2</sup>	Idade início (anos)	Duração da doença na coleta (meses)
1●*	51	Branca	F	MS	51	9
2●*	51	Branca	F	B	50	15
3●*	44	Branca	M	MI	43	22
4●*	65	Branca	M	MS	65	11
5●	60	Branca	F	B	59	16
6●*	46	Branca	M	MI	45	19
7●*	56	Branca	F	B	52	56
8*	42	Branca	M	MI	40	16
9●	67	Branca	M	MS	65	24
10●	54	Branca	M	MI	53	23
11●*	61	Branca	F	MS	58	36
12●	50	Branca	M	MS	50	48
13●	58	Branca	F	B	56	24
14●	53	Branca	M	MS	52	19
15●	45	Branca	F	MS	44	19
16●	42	Branca	M	MI	42	6
17●	59	Branca	M	MS	59	5
18●	52	Branca	F	MS	52	12
19●	67	Branca	M	MI e MS	65	24

● Doentes com amostras utilizadas no PCR array; \* Doentes com amostras utilizadas na proteômica; <sup>1</sup>Sexo: F = feminino, M = masculino; <sup>2</sup>Local de Início: B = bulbar; MS = membro superior; MI = membro inferior.

**Tabela 2** - Sujeitos não ELA incluídos no estudo (grupo controle outras manifestações neurológicas)

Sujeitos	Idade (anos)	Etnia	Sexo <sup>1</sup>
1●*	48	Branca	F
2●*	27	Mulato	F
3●*	48	Branca	F
4●*	46	Branca	F
5●*	30	Branca	F
6●*	72	Branca	M
7●*	82	Branca	M
8●*	38	Branca	F

● Sujeitos com amostras utilizadas no PCR array; \* Sujeitos com amostras utilizadas na proteômica; <sup>1</sup>Sexo: F = feminino; M = masculino.

### 3.2. Investigação de miRNAs pela Plataforma de PCR Array

#### 3.2.1. Extração, transcrição reversa e pré amplificação de RNA total do LCE

A extração de RNA total do LCE de 18 doentes ELA (Tabela 1) e 8 sujeitos não ELA (Tabela 2) foi realizada utilizando-se o kit comercial *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante. Todas as amostras tiveram seus RNAs extraídos a partir de 200 µL de LCE, sendo adicionado a cada amostra  $1,6 \times 10^8$  cópias/µL do miRNA 39 sintético, proveniente do *C. elegans* (*spike in*) para verificar a eficiência da extração. O teste de eficiência foi realizado através da comparação dos valores do ciclo limite (*Cycle threshold*; Ct) do *spike in* de cada amostra aos da curva padrão.

Após a extração as amostras foram alíquotadas em dois tubos e armazenadas a - 80°C. A qualidade da extração foi avaliada pelo *spike in* em uma das alíquotas e a outra foi para a análise do perfil de miRNAs.

A transcrição reversa do RNA total em cDNA foi realizada através do kit comercial *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) com iniciadores ou *primers* específicos para todos os miRNAs presentes nas placas de PCR array e a pré amplificação com o kit comercial *TaqMan PreAmp* (Thermo Fisher), de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.2.2. Transcrição reversa e PCR em tempo real do *spike in* para avaliação das amostras**

A transcrição reversa do *spike in* foi realizada utilizando-se o kit comercial *miScript II RT Kit* (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. O cDNA resultante dessa transcrição reversa foi diluído em série com a finalidade de se construir a curva padrão com 4 pontos ( $5 \times 10^5$  até  $5 \times 10^2$  cópias/ $\mu$ L). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata com os pontos da curva padrão e as amostras de RNA extraídas do LCE, onde o *spike in* (*miScript SYBR Green PCR Kit*, Qiagen) foi adicionado.

As amostras provenientes dos doentes ELA e não ELA foram comparadas com a curva padrão e aquelas cujo *spike in* foi amplificado e tiveram o seu Ct no intervalo pré-determinado da curva padrão foram utilizadas na PCR array.

### 3.2.3. Amostra referência

As células de Glioblastoma Multiforme (T98G - ATCC®CRL-1690™) foram utilizadas como amostra referência. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit *mirVana PARIS* (Thermo Fisher Scientific) segundo as recomendações do fabricante. O produto extraído foi quantificado no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific), teve sua concentração ajustada para a transcrição reversa e posterior pré amplificação.

### 3.2.4. Reação múltipla e simultânea em cadeia de polimerase (PCR Array)

O sistema *TaqMan MicroRNA Array V3.0* – placas A e B (Thermo Fisher Scientific – Cat. 4449144) foi utilizado na análise do perfil de miRNAs. Essa plataforma consiste no ensaio de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real com sondas de hidrólise pelo sistema TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*), onde placas de microfluidos apresentam oligonucleotídeos específicos e sondas TaqMan que hibridizam com seus respectivos cDNAs, quando esses estão presentes na amostra e emitem fluorescência. A plataforma apresenta 754 oligonucleotídeos possibilitando a análise de 754 miRNAs (alvos), em sua maioria miRNAs relatados em humanos e alguns controles endógenos (padrão do fabricante). 100 µL de cDNA pré amplificado foram utilizados no equipamento SDS 7900HT (Applied Biosystems) com a ciclagem recomendada pelo fabricante.

### 3.2.5. Análise do perfil de expressão dos miRNAs

A análise da expressão dos miRNAs foi realizada com os valores do Cts nas amostras das PCRs. Os *thresholds* dos alvos de miRNAs foram ajustados individualmente na fase exponencial da emissão de fluorescência e o baseline ajustado automaticamente no programa *Sinphony Cloud* (Thermo Fisher Scientific). Os miRNAs que amplificaram até o Ct 38 e em pelo menos 70% das amostras foram considerados.

O programa *Normfinder* adaptado para Excel (Andersen et al., 2004) foi utilizado na determinação do miRNA normalizador. Os  $\Delta$ Cts (Ct amostra – Ct normalizador) foram calculados a partir do normalizador definido e, então, os  $\Delta\Delta$ Cts de cada amostra obtidos, utilizando-se o Glioblastoma Multiforme como amostra de referência [( $\Delta$ Ct amostra –  $\Delta$ Ct glioblastoma)] (Schmittgen; Livak, 2008).

A análise estatística na identificação dos miRNAs diferencialmente expressos no grupo ELA em relação ao não ELA foi realizada com os valores dos  $-\Delta\Delta$ Cts, empregou o teste estatístico *Significance Analyses of Microarray* (SAM), *two class unpaired*, com 1000 permutações por miRNA. Os miRNAs que apresentaram um FDR < 2,5 (*False Discovery Rate*) com intervalo de confiança de 95% (*Multi Experiment Viewer* versão 4.5) foram considerados significantes. O *fold change* de cada alvo foi calculado dividindo-se a média aritmética dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de todos os sujeitos do grupo ELA e não ELA (Cirnigliaro et al., 2017).

### 3.3. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) dos miRNAs identificados

Dentre os 8 miRNAs diferencialmente expressos identificados na análise do PCR Array, 7 foram avaliados individualmente pelo qPCR, posto que, os demais não apresentaram ensaios comerciais disponíveis ou não amplificaram. A transcrição reversa e a pré amplificação das amostras empregaram respectivamente os kits *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific – Cat A280007) e *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific – Cat 4444557) que foram utilizados conforme recomendações do fabricante.

As qPCRs foram realizadas em triplicata na plataforma *Quantstudio 3 Real Time PCR system* (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante. Os resultados foram analisados no programa *Symphony Cloud* (Thermo Fisher Scientific). O *threshold* foi ajustado independentemente, na fase exponencial da emissão de fluorescência, e foi utilizado o baseline automático. As médias das curvas de amplificação com o Ct de até 38 foram consideradas, desde que o desvio padrão entre as réplicas fosse menor que 0,5 Ct.

O programa *NormFinder* (Andersen et al., 2004) foi utilizado para a escolha do normalizador, levando em consideração os alvos que não se mostraram diferencialmente expressos na análise anterior (PCR array – TLDA) e que amplificaram no maior número de amostras simultaneamente.

A quantificação relativa de cada miRNA foi realizada através dos  $\Delta$ Cts (Ct amostra – Ct normalizador) e  $\Delta\Delta$ Cts ( $\Delta$ Ct amostra ELA –  $\Delta$ Ct média do grupo não ELA). *Fold change* de cada alvo foi calculado pela razão da média aritmética dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de



todos os sujeitos do grupo ELA e dos valores dos sujeitos do grupo não ELA (Pfaffl, 2001).

### 3.3.1. Análises estatísticas das qPCRs

As análises estatísticas das qPCRs foram realizadas utilizando-se os valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , empregando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov, para a análise da distribuição normal dos dados, e de Welck, para análise entre os dois grupos, pelo programa *GraphPad Prism* 8.0 (GraphPad Software Inc). Os resultados foram apresentados como média aritmética e erro padrão da média, sendo aceitas como variações significativas aquelas em que o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

### 3.4. Identificação de proteínas relacionadas aos miRNAs

Genes alvos regulados pelos 8 miRNAs diferencialmente expressos foram identificados pela plataforma *miRWalk* v 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>). O *miRWalk* utiliza o algoritmo *TarPmiR* e 3 bibliotecas de miRNAs (*TargetScan*, *miRDB* e *mirTarBase*) na identificação dos genes alvos para cada miRNAs, a partir das interações nas regiões 3'-UTR e codificadora em mRNA (Sticht et al., 2018). Utilizou-se o intervalo de confiança de 95%.

### 3.5. Proteínas desreguladas no LCE identificadas pela proteômica

A análise proteômica foi realizada em 8 pacientes ELA e 8 sujeitos não ELA (Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente) e os resultados apresentados na literatura (Maximino et al., 2023, submetido). Em resumo, amostras de 1 mL de LCE foram submetidas à centrifugação com filtro de corte molecular de 10 kDa. As proteínas retidas foram reduzidas por adição de ditioneitol (DTT) à concentração final de 10 mM. As proteínas foram alquiladas antes da digestão pela adição de iodoacetamida (IAA) à concentração final de 40 mM e digeridas com tripsina (razão 1:50 enzima para proteína total). A reação foi parada com a adição de ácido trifluoroacético a 1% (TFA) e os peptídeos resultantes foram purificados usando micro-coluna de sepharose de fase reversa Oligo R3 (Palmisano et al., 2010). As amostras foram submetidas à análise nLC-MS/MS em duas plataformas analíticas combinando cromatografia líquida de nanofluxo com espectrômetros de massa *LTQ-Orbitrap Velos* (Velos) e *Orbitrap Fusion Tribrid* (Fusion)(Thermo Fisher Scientific, EUA).

Os peptídeos foram separados por espectrometria de massa em cromatografia líquida de nano-ultra-alto desempenho (nUHPLC LC-MS/MS) de acordo com a descrição de Kawahara et al. (2018).

As proteínas identificadas como desreguladas entre os grupos, foram selecionadas e seus peptídeos mapeados no banco de dados PeptideAtlas. Os valores de m/z selecionados foram monitorados em todo o gradiente e seus espectros de MS/MS registrados para realizar a pesquisa no banco de dados usando o programa *MaxQuant* versão *Matrix Science*, versão 2.6.0 (Cox et al., 2011). Detalhes da identificação de proteínas está descrita na publicação prévia (Maximino et al., 2023, submetido).

### **3.6. Identificação de moléculas e mecanismos biológicos de destaques a partir das proteínas comuns nos estudos da proteômica e da miRNAs/MirWalk**

#### **3.6.1. Identificação das proteínas comuns**

A ferramenta Diagrama de Venn (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>) foi utilizada na identificação das proteínas comuns descritas nos estudos da proteômica e da miRNAs/MirWalk.

#### **3.6.2. *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)* e Redes de Interação de proteínas**

A análise enriquecida das proteínas encontradas na intersecção entre o estudo de proteômica e o estudo de regulação dos miRNAs foi realizada utilizando a plataforma *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 6.8)*. As moléculas foram organizadas de acordo com os bancos de dados disponibilizados pela ferramenta e usados para identificação de vertentes relevantes. Entre os principais bancos de dados em que o DAVID se baseia estão o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* e o *Gene Ontology Consortium Annotation (GO)*, o qual permitiu organizar as moléculas por processos biológicos, componentes celulares e função molecular. Os dados apontados para estas bases de dados foram filtrados (EASE) para visualização dos

resultados mais significativos (Huang et al., 2009). As categorias de cada vertente (KEEG, Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular) foram numeradas de forma decrescente, considerando o número de moléculas apontadas em cada uma delas. A representatividade das proteínas nas categorias de cada vertente (INTRA-VERTENTE) e em múltiplas vertentes (INTER-VERTENTE) foram anotadas e empregadas nas análises posteriores de identificação de proteínas e mecanismos moleculares mais relevantes do estudo.

As redes de interação proteína-proteína foram construídas através do programa *Cytoscape 3.5.7* ([https://cytoscape.org/what\\_is\\_cytoscape.html](https://cytoscape.org/what_is_cytoscape.html)). Para se estabelecer suas relações e identificar possíveis moléculas com maior grau de relevância foram utilizados parâmetros de centralidade, indicando seus respectivos *betweenness* e *degree* (Scardoni et al., 2009). As proteínas que atingiram as 20 maiores pontuações foram consideradas como relevantes nas redes de interação e empregadas nas análises posteriores de identificação de proteínas e mecanismos moleculares mais relevantes do estudo.

### **3.6.3. Proteínas de destaque nas análises Intra-vertente e Inter-vertente**

Para estabelecer as moléculas presentes no maior número de categorias, foi realizado o diagrama de Venn das moléculas apontadas em cada categoria dentro de cada vertente (KEEG, Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular), utilizando-se a ferramenta online Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>).

As intersecções intra-vertentes e inter-vertentes foram analisadas. A análise intra-vertente, identificou as três categorias de cada uma das vertentes com o maior número de intersecções (categorias de 1ª grandeza). As moléculas pertencentes a essas três categorias foram destacadas como moléculas de 1ª grandeza. As moléculas comuns entre as categorias eleitas de cada vertente, foram indicadas como moléculas de 1ª grandeza depuradas. Esse procedimento foi realizado com as três próximas categorias com maior número de intersecções, e denominadas como moléculas de 2ª grandeza e conseqüentemente foram indicadas as moléculas de 2ª grandeza depuradas. Foi então criada uma lista contendo todas as moléculas, subdivididas em moléculas de primeira grandeza, primeira grandeza depuradas, segunda grandeza e segunda grandeza depuradas.

A análise inter-vertente utilizou o diagrama de Venn levando-se em consideração todas as moléculas de cada vertente (KEEG, Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular). Aquelas moléculas que se apresentaram em todas as 4 vertentes foram identificadas como moléculas de 1ª grandeza, as que se apresentaram em 3 vertentes, foram anotadas como de 2ª grandeza, e as que se apresentaram em 2 vertentes como de 3ª grandeza.

#### **3.6.4. Contribuição da Rede de Interação de Proteínas nos destaques das vertentes**

As proteínas de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> grandezas intra-vertentes, de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> grandezas inter-vertentes e as proteínas que atingiram as 20 maiores pontuações foram submetidas a análise de intersecção de conjuntos pelo Diagrama de Venn que identificou as proteínas comuns aos três conjuntos. As proteínas comuns seguiram para a análise de criteriorização final, descrita a seguir.

#### **3.6.5. Criteriorização final para a identificação das moléculas e mecanismos biológicos de destaque**

A criteriorização final considerou a representação de moléculas apontadas na análise enriquecida pela modulação intra-vertente, inter-vertente e grau de força de ligação apontadas pelas redes de interações de proteínas, destacando as moléculas e categorias despontadas.

As moléculas depuradas resultantes das análises intra e inter-vertente de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> grandezas e as 20 moléculas com maiores *betweenness* e *degrees* das redes de interação foram listadas e retiradas as repetições. A intersecção dos três conjuntos de moléculas obtido pela ferramenta online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) indicou o grupo de moléculas ressaltadas.

As moléculas ressaltadas foram confrontadas com as categorias das quatro vertentes (KEGG, PB, FM e CC), indicando as moléculas presentes ou ausentes (0- ausente; 1- presente) em cada uma delas. A categoria de cada vertente com maior número de moléculas foi identificada como ressaltada. Em seguida, as moléculas com maior quantificação nas categorias de todas as vertentes e nas categorias ressaltadas foram identificadas e as suas respectivas porcentagens calculadas.

As moléculas que apareceram com alta representatividade (nas três maiores porcentagens) dentre todas as categorias apresentadas nas 4 vertentes indicarão a primeira fase das moléculas refinadas. As moléculas que apareceram com alta representatividade (nas 2 maiores porcentagens) dentre as categorias ressaltadas nas 4 vertentes serão indicadas como as moléculas refinadas da pós-modelagem.

### **3.7. Análise do perfil de moléculas selecionadas a partir das modulações, no LCE dos sujeitos através de Luminex**

Moléculas candidatas a partir das modulações realizadas, foram eleitas para serem quantificadas pelo Luminex®. Resumidamente, o LCE de 17 sujeitos ELA e 7 não ELA, foram avaliados pelo ensaio xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex®. Essa tecnologia xMAP da Luminex® possui o princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra a molécula desejada. Após lavagens seriadas para remoção de proteínas não ligadas,

anticorpos de detecção foram adicionados para criar o complexo sanduíche, e posteriormente adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina.

Microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra as moléculas de interesse foram adicionadas em placa própria.

A seguir, foram pipetadas as amostras dos dois grupos, o branco e os pontos de uma curva padrão (constituída por oito pontos), e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station) e as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emitiu sinal fluorescente quando excitado pelos LEDs do equipamento de leitura, e incubada por um breve período.

Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão para serem analisadas no equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, TX), onde 2 LEDs, um verde com comprimento de onda de 525 nm fez a identificação, e um LED vermelho (635 nm) fez a quantificação dessas moléculas. Uma câmera com dispositivo de carga acoplado (CCD, do inglês *charge-coupled device*) fez a captura dessas imagens e enviou ao programa *Xponent 4.2* (Luminex Corp, Austin, TX) para a análise dos dados que foi realizada pelo programa *Milliplex Analyst 5.1* (EMD Millipore).

As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão conforme as recomendações do fabricante. Os níveis das moléculas foram expressos em pg/mL ou ng/mL.



Para os ensaios realizados, a curva foi ajustada para o método cúbico que mostrou melhores resultados, possibilitando ampliar a detecção de valores tanto abaixo quanto acima da curva padrão.

Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e de Welch para análise de cada molécula entre os dois grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* 8.0 (*GraphPad Software*). Os resultados estão apresentados como média aritmética e erro padrão da média. Somente foram aceitas como variações significativas aquelas em que o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. miRNAs identificados pela plataforma de PCR array

A plataforma de PCR array identificou 100 miRNAs com o  $Ct \leq 38$  e que mostraram curva de amplificação satisfatória em pelo menos 70% das amostras analisadas, considerando os 18 doentes ELA e os 8 sujeitos não ELA (Tabela 3). Dezesesseis miRNAs dos 100 identificados amplificaram em 100% das amostras.

**Tabela 3** - MicroRNAs identificados pela PCR array - Identificação dos 100 miRNAs que amplificaram em pelo menos 70% das amostras dos grupos ELA e não ELA, analisadas na Plataforma Estendida de PCR Array

U6 snRNA-001973	hsa-miR-21-000397	hsa-miR-708-002341	hsa-miR-338-5P-002658
hsa-let-7b-002619	hsa-miR-218-000521	hsa-miR-885-5p-002296	hsa-miR-33a-002135
hsa-let-7c-000379	hsa-miR-222-002276	hsa-miR-886-3p-002194	hsa-miR-34b-002102*
hsa-let-7d-002283	hsa-miR-223-002295*	hsa-miR-92a-000431	hsa-miR-378-002243
hsa-let-7e-002406	hsa-miR-24-000402	hsa-miR-99a-000435	hsa-miR-516-3p-001149
hsa-miR-100-000437*	hsa-miR-26a-000405	hsa-miR-99b-000436	hsa-miR-520D-3P-002743*
hsa-miR-106a-002169	hsa-miR-29a-002112	hsa-miR-1183-002841	hsa-miR-520c-3p-002400
hsa-miR-106b-000442	hsa-miR-29c-000587	hsa-miR-1208-002880*	hsa-miR-571-001613*
hsa-miR-125b-000449	hsa-miR-30b-000602	hsa-miR-1233-002768	hsa-miR-572-001614
hsa-miR-126-002228	hsa-miR-30c-000419	hsa-miR-1260-002896	hsa-miR-573-001615
hsa-miR-133a-002246	hsa-miR-320-002277	hsa-miR-1262-002852	hsa-miR-584-001624
hsa-miR-145-002278	hsa-miR-323-3p-002227	hsa-miR-1274A-002883*	hsa-miR-601-001558
hsa-miR-146a-000468	hsa-miR-328-000543	hsa-miR-1274B-002884*	hsa-miR-623-001555
hsa-miR-150-000473*	hsa-miR-342-3p-002260*	hsa-miR-1276-002843	hsa-miR-625#-002432
hsa-miR-155-002623	hsa-miR-345-002186	hsa-miR-1290-002863	hsa-miR-628-3p-002434
hsa-miR-16-000391	hsa-miR-346-000553	hsa-miR-1298-002861	hsa-miR-638-001582
hsa-miR-186-002285	hsa-miR-365-001020	hsa-miR-1305-002867*	hsa-miR-639-001583
hsa-miR-191-002299	hsa-miR-483-5p-002338*	hsa-miR-144-002676*	hsa-miR-645-001597
hsa-miR-195-000494	hsa-miR-484-001821*	hsa-miR-151-3p-002254	hsa-miR-661-001606
hsa-miR-197-000497*	hsa-miR-485-3p-001277	hsa-miR-1825-002907	hsa-miR-663B-002857
hsa-miR-199a-3p-002304	hsa-miR-518d-001159	hsa-miR-19b-1#-002425	hsa-miR-720-002895
hsa-miR-19b-000396	hsa-miR-574-3p-002349	hsa-miR-206-000510	hsa-miR-875-5p-002203
hsa-miR-202-002363	hsa-miR-597-001551	hsa-miR-30a-3p-000416	hsa-miR-892b-002214
hsa-miR-204-000508*	hsa-miR-628-5p-002433	hsa-miR-30a-5p-000417	hsa-miR-9#-002231
hsa-miR-20a-000580	hsa-miR-636-002088	hsa-miR-30e-3p-000422	hsa-miR-99b#-002196

\* miRNAs que amplificaram em 100% das amostras.

#### 4.1.1. Identificação do normalizador

Os 16 miRNAs que amplificaram em 100% das amostras foram utilizados na identificação do(s) melhor(es) normalizador(es) pelo software NormFinder. O programa identificou, através dos escores atribuídos a cada miRNA (Tabela 4), a combinação de dois deles como mais estáveis entre as amostras, que foi a dos miRNAs 1274B e 34b, selecionada para a normalização dos dados (escore 0,358).

**Tabela 4** - Valores de Escores da estabilidade dos 16 miRNAs amplificados em 100% das amostras de acordo com o NormFinder

<b>miRNA</b>	<b>Escore</b>	<b>miRNA</b>	<b>Escore</b>
hsa-miR-1208-002880	0,525	hsa-miR-204-000508	1,087
hsa-miR-571-001613	0,633	hsa-miR-1305-002867	1,159
hsa-miR-483-5p-002338	0,639	hsa-miR-100-000437	1,180
hsa-miR-1274B-002884	0,707	hsa-miR-197-000497	1,230
hsa-miR-1274A-002883	0,722	hsa-miR-150-000473	1,277
hsa-miR-34b-002102	0,738	hsa-miR-484-001821	1,295
hsa-miR-223-002295	0,982	hsa-miR-520D-3P-002743	1,301
hsa-miR-144-002676	1,052	hsa-miR-342-3p-002260	1,407

#### 4.1.2. miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos ELA e não ELA

A análise estatística a partir dos 100 miRNAs identificados em pelo menos 70% das amostras revelou expressão diferencial de oito miRNAs no LCE dos sujeitos ELA comparados aos sujeitos não ELA (Tabela 5). Notavelmente, todos os miRNAs

diferencialmente expressos apresentaram *folds* com valores superiores 1,0, indicando que esses miRNAs estão regulados positivamente (Tabela 5).

**Tabela 5** - miRNAs diferencialmente expressos entre o grupo ELA e o grupo não ELA a partir da análise SAM

<b>miRNA</b>	<b>Fold<sup>1</sup></b>	<b>FDR<sup>2</sup></b>
hsa-miR-100-5p	3,48	0
hsa-miR-346	5,31	0
hsa-miR-338-5p	3,74	0,23
hsa-miR-520D-3p	7,7	0,23
hsa-miR-584	6,53	0,23
hsa-miR-638	5,2	0,23
hsa-miR-875-5p	7,91	0,23
hsa-miR-639	3,2	0,23

<sup>1</sup>*Fold*: valores positivos dos *folds* indicam que esses miRNAs apresentaram regulação positiva (*up regulation*); <sup>2</sup>False Discovery Rate (FDR): valor de *p* corrigido através do método de Benjamin Hockberg.

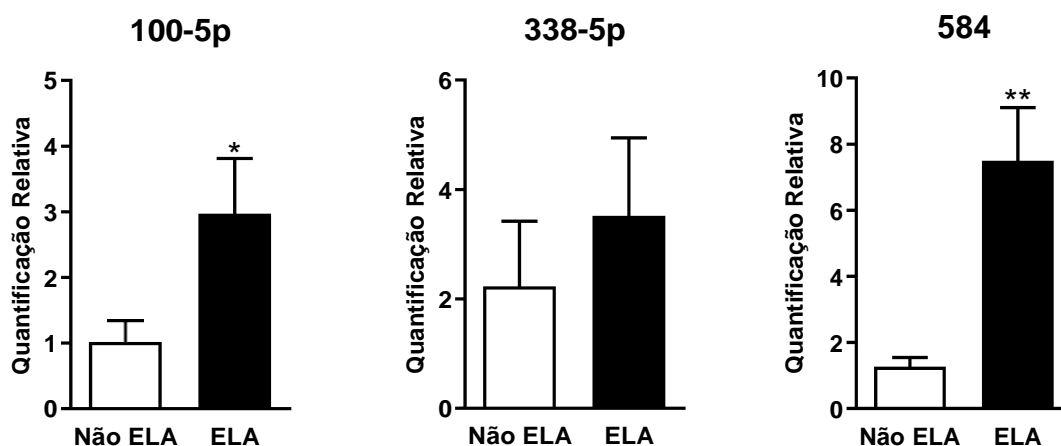
#### 4.1.3. PCR quantitativo dos miRNAs diferencialmente expressos

A análise do normalizador a ser utilizado no qPCR através do NormFinder identificou o miRNA 21-5p como melhor normalizador a ser utilizado (Tabela 6).

**Tabela 6** - Escores dos miRNAs expressos sem diferença estatística no PCR array (TLDA), utilizados como candidatos a normalizadores das qPCRs

<b>miRNA</b>	<b>Escore</b>
miR 21-5p	0,605
miR 146a-5p	0,707
miR 132-3p	1,239
miR 16-5p	1,542
miR 365a-3p	1,632

A análise da qPCR mostrou expressão diferencial dos miRNAs 100-5p e 584 na comparação entre os grupos ELA e não ELA com *fold* de 1,82 e 12,24, respectivamente (Figura 1). O miRNA 338-5p se mostrou regulado positivamente, entretanto diferença estatística entre os grupos não foi alcançada por conta da alta variabilidade dos valores em ambos os grupos de sujeitos estudados ( $p = 0,5$ ). Nos ensaios dos miRNAs 346, 520D-3p, 639 e 875-5p não houve amplificação dos sujeitos do grupo não ELA. No ensaio do miRNA 346, somente dois sujeitos do grupo ELA amplificaram. Esses fatores impediram a análise da expressão relativa pelo qPCR nesses miRNAs. O ensaio do miRNA 638 não pode ser realizado pela indisponibilidade de kit comercial no momento da realização do trabalho.



**Figura 1.** Quantificação relativa dos miRNAs 100-5p, 338-5p e 584 pelo qPCR. A coorte analisada do miRNA 100-5p foi de 7 e 13, a do miRNA 338-5p foi 4 e 8 e a do miRNA 584 foi de 8 e 13 sujeitos não ELA e ELA respectivamente, pois não houve amplificação em todas as amostras. Os demais miRNAs diferencialmente expressos apontados pelo TLDA não foram apresentados pela análise da qPCR por limitações técnicas relativas a não amplificação das amostras experimentais. Os 3 miRNAs apresentaram distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov, \* $p = 0,047$  e \*\* $p = 0,002$  de acordo com teste de Welch. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## **4.2. Moléculas relacionadas a cada miRNA, identificadas pelo miRWalk**

Os 8 miRNAs identificados foram analisados na plataforma miRWalk versão 3 para estabelecer suas correlações com seus respectivos RNAm. A análise do miRWalk identificou 7.945 moléculas relacionadas aos 8 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos ELA e não ELA, sendo destas 135 validadas e 7.810 preditas. As proteínas relativas aos respectivos RNAm foram apresentadas pela base de dados UniProt. Este estudo considerou apenas as moléculas validadas nas análises seguintes.

## **4.3. Proteínas desreguladas no LCE pela proteômica e a correlação delas com as moléculas validadas apontadas pelo miRWalk**

Análise proteômica do LCE de 8 sujeitos ELA e 8 não ELA identificou 135 proteínas desreguladas ( $p < 0,05$ ). Com o intuito de identificar moléculas que podem estar relacionadas à doença, procedeu-se a análise da intersecção das proteínas identificadas no estudo de proteômica do LCE com aquelas identificadas como sendo reguladas pelos miRNAs na análise de bioinformática (MirWalk v3). Das 135 proteínas identificadas na proteômica do LCE, 57 delas estavam presentes dentro do grupo de moléculas validadas (testadas experimentalmente) listadas pelo miRWalk, ou seja, possuem relação com os miRNAs identificados no PCR array (Tabela 7).

**Tabela 7 - Moléculas relacionadas aos miRNAs diferencialmente expressos.**  
 Correlação entre os 8 miRNAs diferencialmente expressos na plataforma de PCR array com as 57 proteínas identificadas no LCE por espectrometria de massa (MirWalk v3)

miRNA	Proteínas*
346	APOC3, APP, BTD, CALR, CHI3L1, CNTN1, C6, C7, ECM2, NBL1, LSAMP, NEO1, OPCML, PLG, SDF4, SEMA6D
520D-3p	AFM, CD59, C9, EFNB2, SPOCK1, KLK6, MEGF10, NCAM1, NCAN, RNASE4
338-5p	ADAMTS1, BASP1, DKK3, FGA, FRZB, IL6ST, RGMA, SEZ6
584	CD99L2, CGREF1, DAG1, NFASC, PAM, RGMB
638	CDH13, CTSB, C2, FGB, SERPIND1
639	CDH2, DCN, LDHB, PIK3IP1, VSTM2A
100-5p	CHL1, DOCK1, PSAP, THY1
875-5p	AGRN, GRIA4, NEGR1

\*Proteínas: em amarelo, as moléculas de primeira grandeza, e em verde, as de primeira grandeza depuradas.

## 4.4 Mecanismos de destaque das 57 proteínas identificadas na correlação dos miRNA com a Proteômica

### 4.4.1 Identificação de mecanismos moleculares pelo DAVID

A análise do KEEG, Processos Biológicos, Componentes Celulares e Função Molecular (DAVID) das 57 proteínas estão descritas nas Tabelas 8 a 11, respectivamente.

**Tabela 8** - Vias de sinalização do KEEG

ID	Vias de Sinalização (Categorias)		N	p
1	hsa04610	Complement and coagulation cascades	9	$4,4 \times 10^{-10}$
2	hsa04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	6	$4,4 \times 10^{-10}$
3	hsa05020	Prion diseases	4	$4,4 \times 10^{-10}$
Moléculas das Vias de Sinalização				
	C2 <sup>(1)</sup>	CD59 <sup>(1)</sup>	FGB <sup>(1)</sup>	NFASC <sup>(2)</sup>
	C6 <sup>(1,3)</sup>	CDH2 <sup>(2)</sup>	NCAM1 <sup>(2,3)</sup>	PLG <sup>(1)</sup>
	C7 <sup>(1,3)</sup>	CNTN1 <sup>(2)</sup>	NEGR1 <sup>(2)</sup>	SERPIND1 <sup>(1)</sup>
	C9 <sup>(1,3)</sup>	FGA <sup>(1)</sup>	NEO1 <sup>(2)</sup>	

Vias de sinalização apontadas pelo KEEG a partir das 57 moléculas (estrangência de 0,001). O KEEG apontou as vias de sinalização (categorias) mais importantes, a identidade (ID), valores de p (p) e o número de genes (N) de cada uma dessas vias. As moléculas apontadas pelo KEEG estão apresentadas na parte inferior da tabela e as vias nas quais esses genes apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses. As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente (ver análise adiante).



**Tabela 9 - Processos Biológicos**

	GO	Categoria	N	p	
1	GO:0007155	cell adhesion	16	$1,2 \times 10^{-11}$	
2	GO:0030198	extracellular matrix organization	8	$3,3 \times 10^{-6}$	
3	GO:0007596	blood coagulation	6	$3,3 \times 10^{-4}$	
4	GO:0030449	regulation of complement activation	5	$2,6 \times 10^{-6}$	
5	GO:0002576	platelet degranulation	5	$3,6 \times 10^{-4}$	
6	GO:1900026	positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	4	$1,5 \times 10^{-4}$	
<b>Moléculas dos Processos Biológicos*</b>					
	AGRN <sup>(2)</sup>	CD59 <sup>(3,4)</sup>	DAG1 <sup>(2)</sup>	LSAMP <sup>(1)</sup>	RGMB <sup>(1)</sup>
	APP <sup>(1,2,5)</sup>	CD99L2 <sup>(1)</sup>	DCN <sup>(2)</sup>	NCAM1 <sup>(1)</sup>	SERPIND1 <sup>(3)</sup>
	C2 <sup>(4)</sup>	CDH13 <sup>(1)</sup>	DOCK1 <sup>(3,6)</sup>	NCAN <sup>(1,2)</sup>	SPOCK1 <sup>(1)</sup>
	C6 <sup>(4)</sup>	CDH2 <sup>(1)</sup>	ECM2 <sup>(2)</sup>	NEO1 <sup>(1)</sup>	THY1 <sup>(1)</sup>
	C7 <sup>(4)</sup>	CGREF1 <sup>(1)</sup>	EFNB2 <sup>(1)</sup>	OPCML <sup>(1)</sup>	
	C9 <sup>(4)</sup>	CHL1 <sup>(1)</sup>	FGA <sup>(2,3,5,6)</sup>	PLG <sup>(3,5)</sup>	
	CALR <sup>(6)</sup>	CNTN1 <sup>(1)</sup>	FGB <sup>(2,3,5,6)</sup>	PSAP <sup>(5)</sup>	

Processos Biológicos que envolvem as 57 moléculas (estrangência de 0,001). O DAVID apontou os processos biológicos mais importantes, os valores de p e o número de genes (N) de cada uma desses processos. As moléculas apontadas em processos biológicos pelo DAVID estão apresentadas na parte inferior da tabela e os processos nos quais essas moléculas apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses. \*As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente (ver análise adiante).

**Tabela 10 - Componentes Celulares**

	<b>GO</b>	<b>Categoria</b>	<b>N</b>	<b>p</b>
1	GO:0070062	extracellular exosome	36	$1,5 \times 10^{-15}$
2	GO:0005886	plasma membrane	32	$1,1 \times 10^{-7}$
3	GO:0005615	extracellular space	26	$2,5 \times 10^{-14}$
4	GO:0005576	extracellular region	26	$1,4 \times 10^{-12}$
5	GO:0031225	anchored component of membrane	7	$1,3 \times 10^{-6}$

**Genes dos Componentes Celulares**

AFM <sup>(1,3,4)</sup>	CDH2 <sup>(1,2)</sup>	GRIA4 <sup>(2)</sup>	PLG <sup>(1,2,3,4)</sup>
AGRN <sup>(1,4)</sup>	CGREF1 <sup>(4)</sup>	IL6ST <sup>(1,2,3,4)</sup>	PSAP <sup>(1,3,4)</sup>
APOC3 <sup>(1,3,4)</sup>	CHI3L1 <sup>(1,3)</sup>	KLK6 <sup>(3,4)</sup>	RGMA <sup>(1,2,5)</sup>
APP <sup>(1,2,3,4)</sup>	CHL1 <sup>(1,2)</sup>	LDHB <sup>(1)</sup>	RGMB <sup>(2)</sup>
BASPI <sup>(1,2)</sup>	CNTN1 <sup>(1,2,5)</sup>	LSAMP <sup>(2,5)</sup>	RNASE4 <sup>(1,4)</sup>
BTD <sup>(1,3,4)</sup>	CTSB <sup>(1,3,4)</sup>	NBL1 <sup>(3)</sup>	SDF4 <sup>(1,2)</sup>
C2 <sup>(1,3,4)</sup>	DAG1 <sup>(1,2,3,4)</sup>	NCAM1 <sup>(1,2)</sup>	SEMA6D <sup>(2)</sup>
C6 <sup>(1,4)</sup>	DCN <sup>(3,4)</sup>	NCAN <sup>(4)</sup>	SERPIND1 <sup>(1,3,4)</sup>
C7 <sup>(1,4)</sup>	DKK3 <sup>(3,4)</sup>	NEGR1 <sup>(1,2,5)</sup>	SEZ6 <sup>(2,3)</sup>
C9 <sup>(1,2,4)</sup>	ECM2 <sup>(3)</sup>	NEO1 <sup>(2)</sup>	SPOCK1 <sup>(3)</sup>
CALR <sup>(1,3,4)</sup>	EFNB2 <sup>(2)</sup>	NFASC <sup>(1,2)</sup>	THY1 <sup>(1,2)</sup>
CD59 <sup>(1,2,3)</sup>	FGA <sup>(1,2,3,4)</sup>	OPCML <sup>(1,2,5)</sup>	VSTM2A <sup>(2,4)</sup>
CD99L2 <sup>(2)</sup>	FGB <sup>(1,2,3,4)</sup>	PAM <sup>(1)</sup>	
CDH13 <sup>(1,2,3,5)</sup>	FRZB <sup>(3,4)</sup>	PIK3IP1 <sup>(1,2)</sup>	

Componentes celulares apontados pelo DAVID a partir das 57 moléculas (estringência de 0,00001). O DAVID apontou os componentes celulares mais importantes, os valores de p e o número de moléculas (N) de cada um desses componentes. As moléculas apontadas estão apresentadas na parte inferior da tabela e as componentes nos quais elas apareceram estão mencionados nos números sobrescritos entre parênteses. As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente (ver análise adiante).

**Tabela 11 - Funções Moleculares**

	<b>GO</b>	<b>Categoria</b>	<b>N</b>	<b>p</b>
1	GO:0005509	calcium ion binding	10	$2,2 \times 10^{-4}$
2	GO:0008201	heparin binding	4	$1,2 \times 10^{-2}$
3	GO:0001948	glycoprotein binding	3	$1,6 \times 10^{-2}$
4	GO:0001618	virus receptor activity	3	$1,8 \times 10^{-2}$
<b>Genes das Funções Moleculares</b>				
	ADAMTS1 <sup>(2)</sup>	CDH2 <sup>(1)</sup>	EFNB2 <sup>(4)</sup>	SDF4 <sup>(1)</sup>
	AGRN <sup>(1)</sup>	CGREF1 <sup>(1)</sup>	NCAM1 <sup>(4)</sup>	SERPIND1 <sup>(2)</sup>
	APP <sup>(2)</sup>	CNTN1 <sup>(3)</sup>	NCAN <sup>(1)</sup>	SPOCK1 <sup>(1)</sup>
	CALR <sup>(1,3)</sup>	DAG1 <sup>(1,4)</sup>	PAM <sup>(1)</sup>	
	CDH13 <sup>(1)</sup>	ECM2 <sup>(2)</sup>	RGMA <sup>(3)</sup>	

Funções Moleculares apontadas pelo DAVID a partir das 57 moléculas (estringência de 0,02). O DAVID apontou as funções moleculares mais importantes, os valores de p e o número de moléculas (N) relacionadas a cada uma dessas funções. As moléculas apontadas estão apresentadas na parte inferior da tabela e as funções a elas relacionadas estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses. As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente (ver análise adiante).

A análise do diagrama de Venn entre as categorias de cada grupo (KEEG, Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular), que levou em consideração o número de moléculas que se repetiram nessas categorias apenas dentro de seu respectivo grupo, apresentou dois conjuntos que se sobressaíram em relação aos outros (devido a sua presença nas categorias elencadas como as mais importantes): um conjunto de moléculas de primeira grandeza e um conjunto de moléculas de segunda grandeza descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** - Categorias classificadas em primeira e segunda grandeza. Moléculas classificadas em primeira e segunda grandezas e primeira e segunda grandezas depuradas. K: vias do KEEG. PB: Categorias dos processos biológicos. FM: categorias das funções moleculares. CC: Categorias do componente celular. (%): porcentagem que representa o número de intersecções da categoria (via) no total de intersecções existentes

Vertentes	CATEGORIAS de 1ª Grandeza	Moléculas de 1ª Grandeza	Moléculas de 1ª Grandeza depuradas	CATEGORIAS de 2ª Grandeza	Moléculas de 2ª Grandeza	Moléculas de 2ª Grandeza depuradas
KEGG	K3 (100%)	C6, C7, C9, NCAM1	C6, C7, C9, NCAM1	K1 (50%)	C6, C7, C9	C6, C7, C9
				K2 (50%)	NCAM1	NCAM1
PB	PB2 (50%)	APP, FGA, FGB, NCAN	FGA, FGB	PB1 (33,3%)	APP, NCAN	APP, FGA, FGB
	PB3 (66,6%)	CD59, DOCK1, FGA, FGB, PLG		PB6 (33,3%)	DOCK1, FGA, FGB	
	PB5 (50%)	APP, FGA, FGB, PLG				
FM	FM1 (100%)	CALR, DAG1	CALR, DAG1			
	FM3 (50%)	CALR				
	FM4 (50%)	DAG1				
CC	CC1 (69,2%)	AFM, AGRN, APOC3, APP, BASP1, BTD, C2, C6, C7, C9, CALR, CD59, CDH13, CDH2, CHI3L1, CHL1, CNTN1, CTSB, DAG1, FGA, FGB, IL6ST, NCAM1, NEGR1, NFASC, OPCML, PAM, PIK3P1, PLG, PSAP, RGMA, RNASE4, SDF4, SERPIND1, THY1	APP, CD59, CDH13, DAG1, FGA, FGB, IL6ST, PAM, PLG	CC4 (46,1%)	AFM, AGRN, APOC3, APP, BTD, C2, C6, C7, C9, CALR, CTSB, DAG1, DCN, DKK3, FGA, FGB, FRZB, IL6ST, KLK6, PSAP, RNASE4, SERPIND1, VSTM2A	AFM, AGRN, APOC3, BTD, C2, C9, CALR, CNTN1, CTSB, NCAM1, OPCML, PSAP, RGMA, SERPIND1
	CC3 (53,8%)	AFM, APOC3, APP, BTD, C2, CALR, CD59, CDH13, CHI3L1, CTSB, DAG1, DCN, DKK3, FGA, FGB, FRZB, IL6ST, KLK6, PAM, PLG, PSAP, SERPIND1, SEZ6		CC5 (23,1%)	CDH13, CNTN1, LSAMP, NCAM1, NEGR1, OPCML, RGMA	
	CC2 (69,2%)	AGRN, APP, BASP1, C9, CD59, CDH13, CDH2, CHL1, CNTN1, DAG1, FGA, FGB, IL6ST, LSAMP, NCAM1, NEGR1, NFASC, OPCML, PAM, PIK3P1, PLG, RGMA, SDF4, SEZ6, THY1, VSTM2A				
<b>Resultados Globais das Vertentes</b>		<b>Moléculas 1ª Grandeza</b>	<b>Moléculas de 1ª grandeza depuradas</b>		<b>Moléculas 2ª Grandeza</b>	<b>Moléculas de 2ª grandeza depuradas</b>
<b>Moléculas identificadas em cada uma das grandezas, excluindo as moléculas das listas de 1ª e 2ª grandezas depuradas</b>		AFM, AGRN, APOC3, BASP1, BTD, C2, CDH2, CHI3L1, CHL1, CNTN1, CTSB, DCN, DKK3, DOCK1, FRZB, KLK6, LSAMP, NCAN, NEGR1, NFASC, OPCML, PIK3P1, PSAP, RGMA, RNASE4, SDF4, SERPIND1, SEZ6, THY1, VSTM2A	APP, C6, C7, C9, CALR, CD59, CDH13, DAG1, FGA, FGB, IL6ST, NCAM1, PAM, PLG		APP, C6, C7, C9, CALR, CDH13, DAG1, DCN, DKK3, FGA, FGB, FRZB, IL6ST, KLK, LSAMP, NCAM1, NEGR1, RNASE4, VSTM2A	AFM, AGRN, APOC3, BTD, C2, CNTN1, CTSB, DOCK1, NCAN, OPCML, PSAP, RGMA, SERPIND1
<b>Moléculas finais identificadas em cada grandeza, excluindo todas as repetições da 2ª grandeza que apareceram na 1ª grandeza</b>		AFM, AGRN, APOC3, BASP1, BTD, C2, CDH2, CHI3L1, CHL1, CNTN1, CTSB, DCN, DKK3, DOCK1, FRZB, KLK6, LSAMP, NCAN, NEGR1, NFASC, OPCML, PIK3P1, PSAP, RGMA, RNASE4, SDF4, SERPIND1, SEZ6, THY1, VSTM2A	APP, C6, C7, C9, CALR, CD59, CDH13, DAG1, FGA, FGB, IL6ST, NCAM1, PAM, PLG			

Em relação à análise do diagrama de Venn que comparou todas as moléculas dos 4 grupos (independentemente da categoria em que apareceram), nota-se que CNTN1, CDH2, NCAM1 E SERPIND1 constituem um elo molecular entre eles (Tabela 12). A análise demonstrou também duas possibilidades de associações entre três vertentes e 5 possibilidades de associações entre 2 vertentes, e as moléculas que fazem parte dessas associações (Tabela 12).

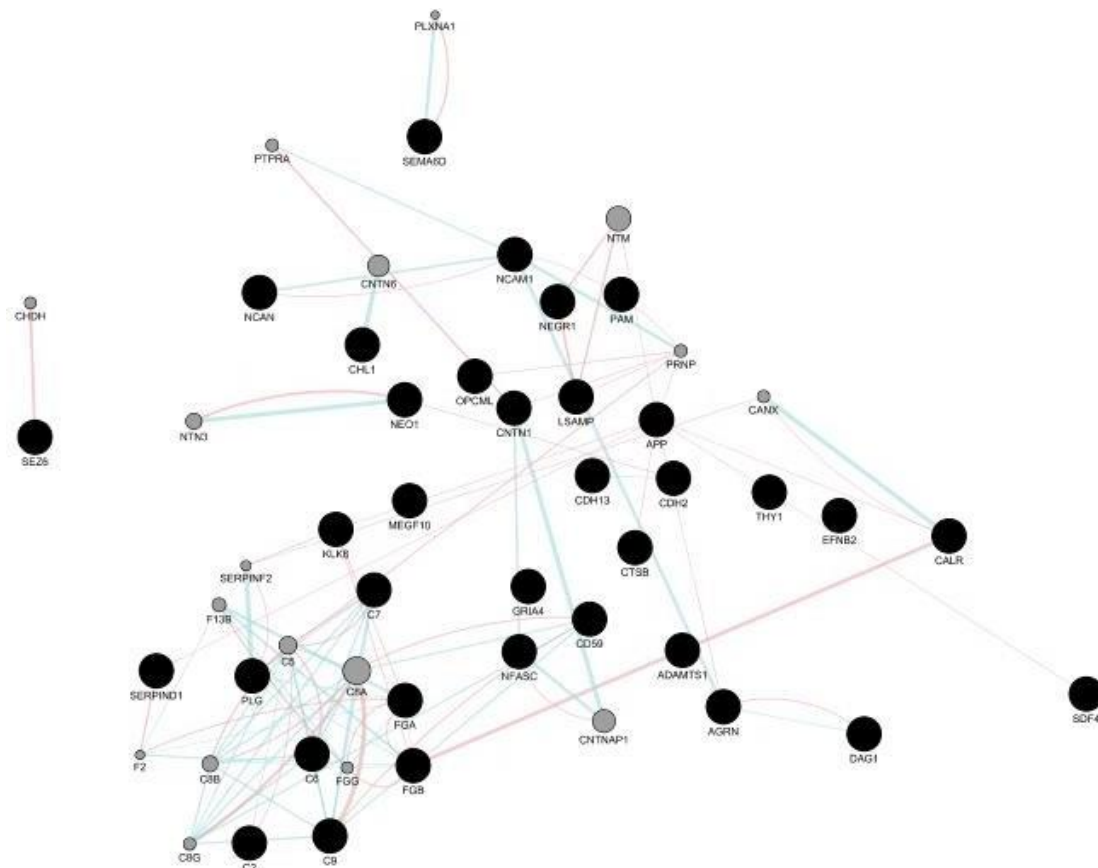
**Tabela 12 - Modulação Inter-Vertentes**

<b>1ª GRANDEZA</b>	<b>Moléculas das Interações</b>
K + PB + FM + CC	CNTN1, CDH2, NCAM1, SERPIND1
<b>2ª GRANDEZA</b>	
K + PB + CC	CDH2, CD59, CNTN1, C2, C6, C7, C9, FGA, FGB, NEO1, NCAM1, PLG, SERPIND1
PB + FM + CC	AGRN, APP, CALR, CDH13, CDH2, CGREF1, CNTN1, DAG1, ECM2, EFNB2, NCAM1, NCAN, SERPIND1, SPOCK1
<b>3ª GRANDEZA</b>	
K + PB	CDH2, CD59, CNTN1, C2, C6, C7, C9, FGA, FGB, NEO1, NCAM1, PLG, SERPIND1
K + FM	CDH2, CNTN1, NCAM1, SERPIND1
K + CC	C2, C6, C7, C9, CD59, CDH2, CNTN1, FGA, FGB, NCAM1, NEGR1, NEO1, NFASC, PLG, SERPIND1
PB + CC	AGRN, APP, C2, C6, C7, C9, CALR, CD59, CD99L2, CDH13, CDH2, CGREF1, CHL1, CNTN1, DAG1, DCN, ECM2, EFNB2, FGA, FGB, LSAMP, NCAM1, NCAN, NEO1, OPCML, PLG, PSAP, RGMB, SERPIND1, SPOCK1, THY1
CC + FM	AGRN, APP, CALR, CDH13, CDH2, CGREF1, CNTN1, DAG1, ECM2, EFNB2, NCAM1, NCAN, PAM, RGMA, SDF4, SERPIND1, SPOCK1

Moléculas que se apresentaram com intersecções nos quatro grupos (K: KEEG; PB: Processos Biológicos; CC: Componente Celular; FM: Função Molecular). As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente.

#### 4.4.2 Identificação de alvos moleculares de interesse a partir de redes de interações das proteínas pelo Cytoscape

As 57 proteínas também foram inseridas no Cytoscape para uma análise de redes e de interações físicas (Figura 2). Os valores de Betweenness e Degree das moléculas 20 moléculas com maiores notas estão representadas na tabela 13. Essa análise evidenciou as seguintes moléculas com alto nível Betweenness e Degree: APP, CDH13, CNTN1, FGA, LSAMP (primeira grandeza).



**Figura 2.** Rede de interação ente as 57 moléculas identificadas na correlação com os miRNAs. Linhas de interações físicas (vermelho) e de vias (azul). A rede foi criada a partir do programa Cytoscape 3.5.7. Os círculos em preto representam as 57 moléculas incluídas na análise e os círculos cinza foram incluídos durante a construção da rede para estabelecer as conexões

**Tabela 13** - Moléculas da rede de interações ranqueadas pelos seus *betweenness* e *degree*

	Molécula	<i>Betweenness</i>		Molécula	<i>Degree</i>
1	APP @	246,98	1	APP @	47,00
2	CDH13 @	212,33	2	CNTN1 *#@	47,00
3	SPOCK1 @	165,83	3	PLG #	47,00
4	KLK6	148,23	4	FGA #	43,00
5	RNASE4	134,91	5	C6 #	43,00
6	FGA #	125,26	6	CDH13 @	40,00
7	LSAMP	117,90	7	LSAMP	40,00
8	CNTN1 *#@	116,59	8	C9 #	37,00
9	NEO1 #	112,41	9	NEO1 #	35,00
10	FRZB	106,05	10	FGB #	35,00
11	CDH2 *#@	102,50	11	SPOCK1 @	33,00
12	GRIA4	100,12	12	CHL1	32,00
13	NFASC	98,33	13	KLK6	31,00
14	CD59 #	96,42	14	CDH2 *#@	31,00
15	OPCML	90,74	15	NCAM1 *#@	31,00
16	FGB #	84,79	16	SERPIND1 *#@	31,00
17	NCAN @	83,66	17	APOC3	31,00
18	C7 #	81,68	18	RNASE4	30,00
19	NCAM1 *#@	80,93	19	OPCML	30,00
20	THY1	78,95	20	C7 #	30,00

Moléculas evidenciadas nas redes de interações físicas e de vias de sinalização. Lista das vinte moléculas com os valores mais elevados de *betweenness* e *degree*. As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente. \*: moléculas presentes em todos os 4 grupos; #: moléculas presentes nos grupos KEEG, Processos Biológicos e Componente Celular; @: moléculas presentes nos grupos Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular.

### **4.4.3 Criteriorização final para a identificação das moléculas e mecanismos ressaltados**

A análise conjunta da criteriorização apresentada, levando-se em consideração a representação de moléculas apontadas na análise enriquecida pela modulação intra-vertente e inter-vertente e grau de força de ligação apontadas pelas redes de interações moleculares e vias de sinalização destacaram as moléculas APP, C6, C7, C9, CD59, CDH13, CNTN1, FGA, FGB, NCAM1, NCAM, PLG e SERPIND1. A metodologia apontou o conjunto de moléculas ressaltadas e refinadas além de categorias e mecanismos celulares/moleculares possivelmente envolvidos na ELA (Quadro 2).

As categorias ressaltadas em cada vertente são aquelas que mostraram as maiores representatividades das moléculas evidenciadas.



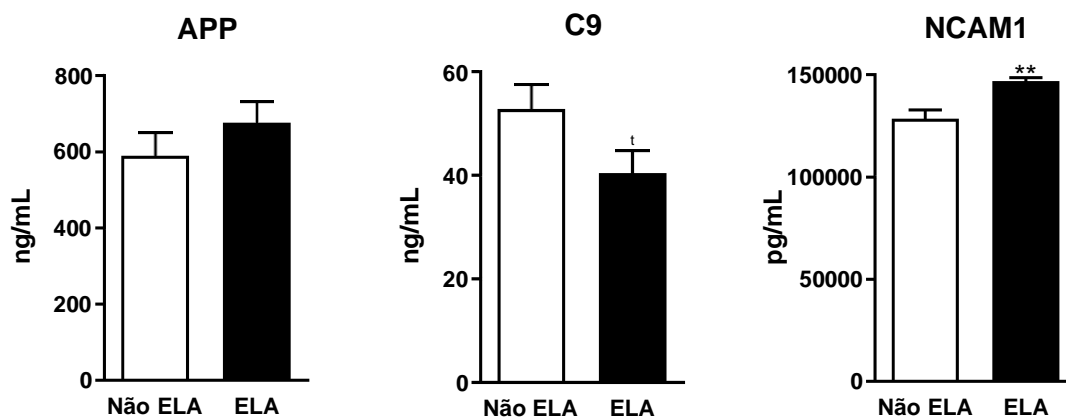
**Quadro 2** - Lista das moléculas ressaltadas identificadas antes da criteriorização final. As moléculas refinadas com alta representatividade nas categorias das vertentes (duas maiores porcentagens) são demonstradas. As categorias e mecanismos celulares/moleculares ressaltados estão apresentados

<b>Representação das Moléculas Ressaltadas</b>													
<b>Moléculas Ressaltadas</b>	<b>APP</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>CD59</b>	<b>CDH13</b>	<b>CNTN1</b>	<b>FGA</b>	<b>FGB</b>	<b>NCAM1</b>	<b>NCAM</b>	<b>PLG</b>	<b>SERPIND1</b>
<b>Refinadas (%)</b>	50*	33.3	33.3	33.3	50*	50*	33.3	50*	50*	33.3	33.3	50*	66.7*
<b>Categorias e mecanismos celulares/moleculares ressaltados</b>													
<b>KEGG Pathway</b>				<b>Processos Biológicos</b>				<b>Componentes Celulares</b>				<b>Funções Moleculares</b>	
Complement and coagulation cascades				Blood coagulation				Extracellular exosome				Calcium ion binding	
				Cell adhesion								Heparin binding	

#### 4.5. Análise da regulação de proteínas pelo LUMINEX

A partir da evidenciação do conjunto de moléculas ressaltadas descritas acima, a regulação das proteínas APP, C9 e NCAM1 foi avaliada pela metodologia do LUMINEX.

As análises mostraram aumento ( $p < 0,01$ ) nos níveis de NCAM1, no grupo ELA quando comparado ao não ELA. Em relação a C9, a análise mostrou tendência de diminuição nos sujeitos ELA (Figura 3).



**Figura 3.** Análise de Luminex das moléculas selecionadas a partir das modulações. Quantificação do APP, C9 e NCAM1 no LCE de sujeitos não ELA e de sujeitos ELA. A coorte analisada foi de 7 e 15 sujeitos não ELA e ELA respectivamente. As 3 moléculas apresentaram distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov; <sup>†</sup>p = 0,067 e \*\*p = 0,004 de acordo com teste de Welch. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. DISCUSSÃO

A ELA é uma doença grave caracterizada pela degeneração dos neurônios motores superior e inferior (Mulder, 1982). Cada vez mais busca-se entender os mecanismos relacionados a esse processo de degeneração. Muitos eventos são estudados e muito se descobre a respeito dos fenômenos biológicos que ocorrem na doença. Estudos mostram a diversidade de mecanismos possivelmente relacionados a ELA, o que reflete a heterogeneidade clínica observada na doença (Taylor et al., 2016). Esses diversos mecanismos propostos para explicar a fisiopatologia da ELA levam a falta de biomarcadores realmente efetivos, o que dificulta o diagnóstico precoce, acompanhamento e desenvolvimento de estudos clínicos relacionados (Sturmeijer; Malaspina, 2022).

O presente trabalho contribuiu com conhecimentos acerca dos eventos moleculares que possam estar envolvidos na ELA. A plataforma de PCR array TLDA, identificou 8 miRNAs que se apresentaram com maiores níveis de expressão no grupo ELA em relação ao não ELA. Esses miRNAs são: 100-5p, 346, 338-5p, 520D-3p, 584, 638, 639, 875-5p. Os miRNAs diferencialmente expressos foram analisados também por qPCR. Estudos recentes indicaram que a metodologia que apresenta resultados em larga escala, apresenta, em geral, os mesmos miRNAs confirmados pela análise individual de cada alvo na qPCR (de Ronde et al., 2018; Darvasi et al., 2019). O nosso trabalho está em concordância com a literatura acerca da adequação de ambas as metodologias na análise da expressão de miRNAs, mostrando que a maior sensibilidade do TLDA, aliada à necessidade de avaliação de múltiplos alvos simultaneamente nos estudos clínicos, evidencia a alta relevância dessa técnica na análise simultânea de

vários alvos agrupados em largos painéis pré-configurados (Cleland et al., 2021; Cruzeiro et al., 2019).

Adicionalmente, procurou-se apontar os alvos de regulação já descritos desses miRNAs (plataforma mirWalk) às proteínas observadas nas mesmas amostras em estudo prévio, por proteômica, realizado por nosso grupo (Maximino et al., 2023 – em submissão). Essa relação mostrou 57 proteínas identificadas no LCE dos pacientes, reguladas por pelos miRNAs diferencialmente expressos aqui evidenciados.

Os miRNAs podem ser encontrados em muitos fluidos corporais e possuem diversas funções em processos fisiológicos e patológicos, como metabolismo, funções relacionadas ao sistema imunológico e à tumorigênese (Ricci et al., 2018). Aqueles secretados podem mediar a comunicação parácrina e endócrina entre diferentes tecidos e, assim, modular a expressão gênica e funções das células distais (Mori et al., 2019). Disfunções nesses processos de modulação podem levar problemas relacionados à lesão tecidual, ao envelhecimento e à doenças em múltiplos sítios (Kumar et al., 2017; Mori et al., 2019). O perfil de miRNAs foi analisado em determinados tecidos no contexto de diversas doenças, de modo a se estabelecer possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, como também conhecer o seu papel regulador em processos que envolvem as mesmas (Shin; Chu, 2014; Verjans et al., 2017; Mori et al., 2019).

Considere-se, por exemplo, que em diversas categorias de câncer, os miRNAs têm papéis importantes na regulação de muitos processos. Jiang e Shen (2018) descreveram 6 miRNAs com expressão diferenciada entre grupos controle e de pacientes com câncer gástrico, inferindo possível papel do miRNA 375 na hipermetilação do gene PAX6, já bem estudado e sabidamente envolvido na progressão do câncer gástrico (Jiang; Shen, 2018).

Em câncer de mama, miRNAs foram associados a regulação de membros da superfamília Rho (homólogo da proteína RAS). Por exemplo, demonstrou-se que o miR-155 inibe diretamente a expressão da proteína Rho A (Kong et al., 2008), e a expressão do miR-10b é indutora do fator de transcrição helix-loop-helix (TWIST), ambos os processos se dão para iniciar a invasão tecidual indireta, por supressão direcionada de Homeobox D10 (HoxD10) e regulação positiva do gene pró-metastático Rho C (Ma et al., 2007).

No âmbito das doenças neurodegenerativas, os processos relativos ao estresse oxidativo, por exemplo, e as redes de miRNAs estão intimamente entrelaçados (Wang et al., 2020). O estresse oxidativo pode afetar os níveis de expressão de numerosos miRNAs e, inversamente, miRNAs são capazes de regular vários genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo também (Konovalova et al., 2019).

Em relação ao estudo de miRNAs em ELA, Freischmidt et al. (2014) comparando o perfil de miRNAs no soro de pacientes com forma esporádica (9 indivíduos) e com a forma familiar (13 indivíduos) de ELA com aqueles do grupo controle (10 indivíduos), todos caucasianos e pareados por idade, mostraram que 30 miRNAs estavam com seus níveis de expressão diminuídos nos pacientes com ELA familiar em relação aos controles, utilizando-se a técnica de microarray, sendo que destes, 4 foram testados por qPCR e 3 deles tiveram seus resultados confirmados também em uma coorte de pacientes com ELA esporádica (Freischmidt et al., 2014).

Desta forma, a identificação dos miRNAs presentes em doentes com ELA, independentemente da forma clínica com que ela se manifeste, é essencial na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença, assim como de outras doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, a utilização de miRNAs desregulados na ELA, pode trazer uma contribuição mais seletiva à descoberta de

biomarcadores de diagnóstico, prognóstico não desejado e acompanhamentos difíceis (Enciu et al., 2012; Ricci et al., 2018; Mori et al., 2019; Paul et al., 2020; van den Berg et al., 2020).

Entre os miRNAs analisados no LCE de ambos os grupos no nosso trabalho, 8 foram diferencialmente expressos e aumentados nos sujeitos com ELA quando comparados com os pacientes não ELA. Ressalta-se o miRNA 100-5p que se mostrou hiper-regulado nos sujeitos ELA em concordância com os achados de Kovanda et al., 2018. Kovanda et al. (2018) demonstraram o aumento desse miRNA no tecido muscular de pacientes ELA em relação aos controles, sugerindo com os demais miRNAs expressos, através de análises de KEGG e GO, uma possível relação com processos de apoptose neuronal e reinervação muscular (Kovanda et al., 2018). O miRNA 100-5p também está associado a importantes eventos na fisiopatologia de outras doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Huntington e Alzheimer (Díez-Planelles et al., 2016; Wang; Zhang, 2020).

Estudo realizado em camundongos com alterações neurológicas que mimetizam a doença de Alzheimer demonstrou os efeitos degenerativos que alterações no miRNA 100-5p provocam. Ye e colaboradores (2015) mostraram que essas alterações modificaram a sobrevivência de neurônios através da via mTOR e do estresse do retículo endoplasmático, levando a apoptose das células neuronais. Essas descrições estão em linha com outros dados da literatura a respeito da expressão aumentada de miRNAs e doenças neurodegenerativas (Kovanda et al., 2018; Ligouri et al., 2018; Taguchi; Wang, 2018).

Em relação aos eventos celulares influenciados pelo miRNA 584, estudos em câncer demonstraram que sua expressão inibe a migração e a proliferação celular e promove apoptose (Li et al., 2017; Guo et al., 2019), sendo que em alguns casos pode

ser considerado um potente agente supressor de tumores (Abdelfattah et al., 2018). Ressalta-se que o miRNA 584 também esteve aumentado no LCE dos pacientes com ELA avaliados no estudo já citado anteriormente (Ye et al., 2015) demonstrando a importância de novos estudos que venham a elucidar ainda mais seu papel nas doenças neurodegenerativas, em especial na ELA.

Dois sujeitos portadores de ELA apresentaram amplificação do miRNA 346 em nosso estudo (qPCR). Esse miRNA é responsável por diversos efeitos protetores em doenças neurodegenerativas, entre eles redução das espécies reativas de oxigênio, proteção celular contra estresse do retículo endoplasmático e inibição da autofagia (Guo et al., 2018). Estudos relacionados com a doença de Alzheimer mostram forte associação com a regulação da molécula APP, assim como no presente estudo (Maciotta et al., 2013; Long et al., 2019).

Em relação ao miRNA 338-5p, estudos prévios já demonstraram maiores concentrações em leucócitos, soro, LCE e nas amostras da medula espinhal de doentes ELA esporádica (De Felice et al., 2012; De Felice et al., 2018; Vrabec et al., 2018) o que concorda com nossos achados. O miRNA 338-5p também foi associado a outras doenças neurodegenerativas o que mostra sua importância em neurologia (Ravnik-Glavač; Glavač, 2020). Ricci et al. (2018) descreveram que o miRNA 338-5p participa de diversas vias moleculares, principalmente relativas a neurodegeneração, a apoptose de neuroblastos e a inibição da proliferação, invasão e migração, eventos esses que contribuem para a patogênese da ELA (Ricci et al., 2018).

O miRNA 520D-3p foi mostrado desregulado em diversas categorias de células tumorais e possui papel importante na regulação da tumorigênese, visto que ele atua como supressor de tumores, como em casos de osteosarcoma e câncer de mama (He et al., 2018; Ren et al., 2018). No sistema nervoso, o miRNA 520D-3p exerce efeito sobre

a proteína  $\beta$ -amilóide, a ceruloplasmina, processos inflamatórios e de apoptose (Gayen et al., 2020). Neste estudo, o grupo ELA apresentou maior expressão do miRNA 520D-3p em relação ao grupo controle, sugerindo que ele pode estar relacionado a apoptose de neurônios motores e processos neuroinflamatórios, assim como observado em outras doenças neurodegenerativas como Parkinson, onde também foi observado o aumento de miRNA 520D-3p no soro dos pacientes (Jin et al., 2018).

Em estudos utilizando outros tecidos biológicos, foram observadas baixas expressões do miRNA 638, como em leucócitos isolados (De Felice et al., 2012) e soro (Freischmidt et al., 2014; Grasso et al., 2014; Shah et al., 2017). Neste estudo foi evidenciado que no LCE os níveis desse miRNA são mais elevados que no grupo controle.

Outro microRNA com capacidade de promover apoptose, alterar o estado oxidativo celular e suprimir a proliferação e o crescimento de células é o miRNA 875-5p, principalmente em células cancerígenas (Li et al., 2013; Zhang et al., 2016; Hu et al., 2018). Em nosso estudo, os níveis de miRNA 875-5p mostraram-se elevados nos doentes ELA em relação ao grupo controle, corroborando achados anteriores em doenças neurodegenerativas, especialmente a doença de Parkinson (Li et al., 2013; Foggin et al., 2019), o que sugere seu envolvimento nos processos de degeneração neuronal.

O miRNA 639 foi identificado em algumas categorias de câncer e está associado a estágios mais avançados e menor sobrevida dos pacientes portadores. Esses estudos sugerem que esse miRNA pode promover metástase e proliferação celular (Li et al., 2014; Wang et al., 2018). Os níveis do miRNA 639 mostrados diminuídos na doença de Alzheimer (Ren et al., 2016; Martinez e Peplow et al., 2019).



Dentre as 57 moléculas alvos dos miRNAs relacionadas, treze foram evidenciadas através das análises enriquecidas, algumas delas parecem ter um papel bem claro dentro do contexto de degeneração neuronal, sendo que três delas se destacaram nas dosagens do LCE de pacientes ELA. São elas: a Molécula de Adesão Celular Neuronal (NCAM1, do inglês Neural cell adhesion molecule 1), a proteína amilóide beta A4 (APP, do inglês Amyloid-beta protein) e o Componente do Complemento 9 (C9).

A proteína NCAM1 atua como mediadora do crescimento axônio/dendritos e ramificações, plasticidade sináptica, reconhecimento e adesão celular homofílica. Além disso, o NCAM1 possui 3 isoformas (NCAM120, NCAM140 e NCAM180) e é essencial para funções cognitivas como aprendizado e memória (Brenneman; Maness, 2009). Devido ao seu papel essencial para a cognição normal do hipocampo e do córtex pré-frontal, em diversas doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas essa molécula está desregulada: foi observado aumento das formas solúveis de NCAM em diversas regiões de tecido neurológico de pacientes com doença de Alzheimer (Todaro et al., 2004; Strekalova et al., 2006) transtornos de humor (Castren, 2005), esquizofrenia (Lewis et al., 2003; Sullivan et al., 2007), os quais estão fortemente relacionados a idade, neurodegeneração e grau de deficiência cognitiva.

A NCAM1 aumentada nos doentes ELA quando comparados aos não ELA, corrobora achados de que essa molécula está presente em doenças neurodegenerativas (Jennings et al., 2022), e conforme observado nas análises de relação entre a expressão de miRNAs e moléculas, o miRNA 520D-3p está associado a NCAM1, visto que esse miRNA já foi associado a outras desordens neurológicas.

Apesar da molécula APP não apresentar diferença significativa entre doentes ELA e o grupo controle, ela mostrou uma tendência de aumento nos pacientes. Essa proteína possui um papel fundamental na fisiologia cerebral, na patogênese de doenças

neuroológicas e está relacionada à fisiologia sináptica e adesão celular. Bryson et al. (2012) demonstraram que o aumento dos níveis de APP coincide com o início dos sintomas tanto em doentes com ELA esporádica como em camundongos SOD1 (G93A) e que a sua supressão gênica nos camundongos melhorou significativamente a inervação, função motora, características contráteis do músculo e a sobrevivência do neurônio motor (Bryson et al., 2012). Outros estudos em camundongos demonstraram que a hiperexpressão de APP comprometeu a neurogênese (Naumann et al., 2010) e aumentou a apoptose de neurônios (Oster-Granite et al., 1996). Também foi observado o acúmulo de APP em pacientes com doença de Alzheimer (O'Brien; Wong, 2011; Zheng; Koo, 2011; Watanabe et al., 2020). Em pacientes com Doença de Parkinson, também há deposição de APP, mas não associada à piora cognitiva (Melzer et al., 2019). A molécula C9, componente do sistema complemento, também não apresentou diferença significativa entre os grupos, porém observou-se uma tendência de diminuição dela, no grupo ELA. Essa molécula também é avaliada em doenças do SNC (Dalakas et al., 2020). A ativação do sistema complemento é essencial para respostas inflamatórias, no entanto, a ativação inadequada do complemento é um importante fator patológico. Na doença de Alzheimer, a inflamação e neurodegeneração são parcialmente desencadeadas pela ativação do complemento (Shen et al., 2013). Também foi visto que na doença de Huntington, fatores do complemento incluindo C9, produzidos pela micróglia, são ativados nas membranas neuronais contribuindo tanto para necrose quanto para o desenvolvimento de atividades pró-inflamatórias nas células (Singhrao et al., 1999).

As moléculas C6, C7 e CD59, assim como a C9, fazem parte do sistema complemento e foi relatado que disfunções nesses elementos também contribuem para distúrbios neurológicos inflamatórios (Dalakas et al., 2020). As proteínas CDH13, FGA,

FGB e PLG já foram associadas a outras doenças neurodegenerativas, principalmente por estarem relacionadas à plasticidade neuronal, reconhecimento celular, integridade dos axônios e respostas imunes (Hultman et al., 2014; Hawi et al., 2017; Liu et al., 2018; Wang et al., 2018; Baker et al., 2019).

Em relação a CNTN1, caracteriza-se pertencente ao grupo das contactinas que estão entre as principais moléculas que influenciam na estrutura do axônio mielinizado (Faivre-Sarrailh; Devaux, 2013). Em esclerose múltipla e outras determinadas doenças neurológicas onde há presença e ação de anticorpos anti-CNTN1, observa-se o bloqueio das interações entre a molécula NF155 e a CNTN1/CASPR1 com consequente desmielinização neuronal (Kira et al., 2019; Kalafatakis et al., 2021). Em LCE de sujeitos com Doença de Parkinson, os níveis de CNTN1 foram reduzidos, quando comparados a um grupo controle, o que pode ser devido a menor volume axonal, devido à perda sináptica e axonal, que são mecanismos patológicos bem conhecidos envolvido na patogênese da Doença de Parkinson (Chatterjee et al., 2020). Alternativamente, os níveis reduzidos podem ser devidos ao aprisionamento de proteínas sinápticas dentro dos corpos de Lewy no cérebro, levando à diminuição da liberação de CNTN1 no LCE (Chatterjee et al., 2020). Considerando-se que o miRNA que regula a CNTN1 está hiper-regulado, pode se cogitar uma diminuição nos níveis dessa molécula que, conseqüentemente, leva a uma interação neuronal prejudicada, também na ELA. São necessários mais estudos ligados a essa molécula para poder se verificar seus níveis na ELA e se desenvolver melhor tal hipótese.

A molécula SERPIND1 também conhecida como HCF2, é um inibidor de trombina ativado por determinados glicosaminoglicanos. O receptor de trombina PAR1 é expresso em diversas partes do SNC, particularmente na medula espinhal, cérebro e sistema neuromuscular (Festoff; Citron., 2019). Foi demonstrado apoptose de células

neuronal, em cultura, devido a clivagem do receptor PAR1 acoplado a proteína G sugerindo que a alta concentração de trombina livre pode ser neurotóxica, enquanto baixas concentrações teriam um efeito protetor (Festoff; Citron., 2019). De fato, esses dados foram corroborados em outros trabalhos que demonstraram que altas concentrações de trombina no SNC foram neurotóxicas e baixas concentrações, induzem a sobrevivência de astrócitos mesmo após algum tipo de injúria ao SNC, além disso, também foi mostrado que morte e sobrevivência mediada por trombina em neurônios do SNC compartilham muitas proteínas de sinalização (Ho et al., 1994; Xi et al., 2003). Como foi observado uma hiper-regulação do miRNA ligado a SERPIND1, assim como no caso da CNTN1, uma hipótese, é justamente que essa molécula esteja baixa em células do SNC na ELA (o miRNA pode estar inibindo a expressão) e conseqüentemente a trombina elevada, colaborando assim para o desenvolvimento e agravamento da doença. Porém, são necessários outros estudos para a comprovação de tal hipótese.

Dentre os 8 miRNAs evidenciados neste estudo, dois deles foram confirmados pela qPCR e todos, nas duas análises, apresentaram seus níveis aumentados no grupo ELA em relação ao não ELA. A esses 8 miRNAs foram relacionadas 57 proteínas que estavam presentes no LCE dos mesmos pacientes (estudo prévio), e entre essas proteínas 13 foram evidenciadas através de análises enriquecidas, sendo que 3 delas tiveram seus níveis avaliados, onde a molécula NCAM1 apresentou-se com diferença estatística entre os grupos.

Este estudo evidenciou a possibilidade de utilização de miRNAs e moléculas, relacionados a processos de apoptose e neurodegeneração, como meios para uma melhor compreensão da ELA de modo a facilitar novas soluções para o desenvolvimento de biomarcadores, diagnóstico mais precoce e possibilitando futuras estratégias terapêuticas para conter a evolução da doença.

## 6. CONCLUSÕES

1. A técnica de PCR array /TLDA identificou 8 miRNAs diferencialmente expressos no grupo ELA em relação ao grupo não ELA. Esses miRNA permitiram a identificação de genes/proteínas relacionados.
2. A técnica da qPCR não mostrou a desregulação de todos os miRNAs apontados pela PCR array /TLDA.
3. A correlação entre as proteínas, apontadas pelos seus genes relacionados aos miRNAs, com aquelas proteínas desreguladas no LCE no estudo prévio de proteômica, demonstrou a presença de 57 moléculas comuns às duas análises.
4. As análises enriquecidas feitas a partir das 57 moléculas comuns dos estudos de Mirnômica e Proteômica no LCE de sujeitos ELA comparados aos não ELA, realçaram as categorias Prion diseases, Blood Coagulation, Extracellular Exosome, Plasma Membrane e Calcium Ion Binding como aquelas que contém mecanismos potencialmente importantes na ELA.
5. Os alvos moleculares APP, C6, C7, C9, CD59, CDH13, CNTN1, FGA, FGB, NCAM1, NCAM, PLG e SERPIND1 foram ressaltados como potencialmente importantes nos mecanismos da ELA. Essas moléculas e os miRNAs desregulados devem ser analisados como biomarcadores da ELA em estudos futuros empregando coortes maiores.

## 7. ANEXO

### FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:.....  
SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... N° ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:.....  
SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... N° ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Identificação de biomarcadores no líquido cérebro-espinal de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica

PESQUISADOR: Prof. Dr. Gerson Chadi

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 53368

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia

DURAÇÃO A PESQUISA: 48 meses

## FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma Doença Neurodegenerativa do Neurônio Motor que causa fraqueza e paralisia dos músculos. A doença pode começar em qualquer músculo do braço, mão, perna, pé, da fala, ou da respiração, mas evolui rapidamente para os outros músculos. A inexistência de Biomarcadores faz com que diagnóstico da doença seja muito difícil e dependa da evolução do quadro clínico e também da exclusão de uma série de outras doenças que atingem o nervo periférico e o neurônio motor. Os Biomarcadores são alterações detectadas por exames que ajudam no diagnóstico da doença e na avaliação da sua progressão. Eles precisam ser descobertos e este é o objetivo da pesquisa.

Você, com suspeita de ser portador da ELA/Doença do Neurônio Motor, recebeu esclarecimentos sobre esta pesquisa, sobre todas as suas Etapas e exames a serem realizados em você. Se você decidir por participar do estudo, você será acompanhado ao Ambulatório de Pesquisa em ELA do HCFMUSP onde será lido com você o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que deverá ser assinado por você após todas as possíveis dúvidas terem sido esclarecidas. O TCLE é um documento que informa e esclarece o sujeito da pesquisa de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa, sem constrangimentos sobre a sua participação em um projeto de pesquisa e você receberá uma via do TCLE.

Na visita 1, você será avaliado pelo neurologista para a avaliação clínica geral do seu estado e pesquisa para a confirmação da suspeita do diagnóstico de ELA e estadiamento da sua doença. Será coletado sangue de uma veia superficial do seu braço no Laboratório Central do HCFMUSP. Uma parte do sangue coletado será enviada ao LIM-45 para extração de DNA e análise posterior da possibilidade da presença de algumas mutações nos genes envolvidos na sua doença. Você poderá ter pequeno hematoma e sentir dor no local da coleta do sangue, o que poderá durar 1 ou dois dias e desaparecerão sozinhos. Você será orientado a coletar sua urina num frasco para exame laboratorial. Na visita 1 ou nos dias seguintes, você também poderá ser submetido ao exame de eletroneuromiografia (ENMG) a critério dos médicos que acompanharão você no estudo. O exame será feito no Centro de ENMG do HCFMUSP por neurofisiologista clínico especializado. A ENMG é sempre necessária para a confirmação do diagnóstico da ELA e consiste na introdução de agulhas em diversos músculos do seu corpo, uma por vez, e registro do funcionamento destes músculos. As agulhas serão colocadas em

determinados músculos da palma da mão, braço, pé, perna, costas, e na língua, dos dois lados do corpo, e ficarão nestes músculos por alguns segundos para o registro. Dor será sentida nestes locais durante a introdução das agulhas, tempo do registro e no dia do exame, que deverá ir desaparecendo nos próximos 2 ou 3 dias. Você será orientado a tomar medicação para dor, caso sinta desconforto maior. Pequeno sangramento poderá ocorrer apenas após a retirada das agulhas. A ENMG poderá ser repetida uma segunda vez a critério do neurologista no acompanhamento da sua doença.

Você também será submetido aos exames de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e Tomografia de Tórax neste período ou em fases seguintes do acompanhamento de sua doença. Você será levado à Divisão de Radiologia onde você entrará numa máquina que coletará as imagens do seu cérebro e medula espinal. Os exames não causam dor e não liberam radiação em você.

Em seguida, você será acompanhado ao setor competente do HCFMUSP para a coleta do seu líquido. Este procedimento será feito por médico especializado no procedimento. Você será posicionado sobre o leito em posição lateral. Será feita uma anestesia superficial local na porção lombar das suas costas. Em seguida, uma agulha apropriada será introduzida na coluna vertebral desta região e será coletado 14 ml de líquido, 7 ml serão utilizados para exames realizados pelo Laboratório Central do HCFMUSP e a outra parte será enviada ao Laboratório de Investigação Médica (LIM-45) onde será processado para o estudo dos Biomarcadores. Ao término da coleta, você deverá permanecer deitado e em observação por algumas horas até ser liberado pelo médico responsável pelo procedimento. Você sentirá dor e desconforto local por um período aproximado de 1 ou 2 dias e receberá medicação para diminuir o desconforto, que deverá desaparecer após este período. Você também não deverá sentir nenhum desconforto após a realização deste exame. Entretanto, você deve saber que há a possibilidade mais rara do desenvolvimento da cefaleia mais intensa após esta punção. Se isto ocorrer, você receberá instruções de como entrar em contato com a equipe, que o chamará de volta ao HCFMUSP para avaliação clínica e medicação com analgésicos e anti-inflamatórios que farão a dor regredir e desaparecer entre 3 a 7 dias. Em casos excepcionais de dor muito intensa, você será internado no HCFMUSP para o acompanhamento e a retirada de 15 ml de sangue de seu braço e injeção no local da punção. Há também a possibilidade rara do desenvolvimento de meningite pela punção lombar. Esta ocorrência é rara e todos os cuidados são tomados no Laboratório



Central do HCFMUSP para que isto seja evitado. Se ocorrer, você apresentará febre, vômito e perda do apetite após 24h da punção. Você deverá contatar a equipe que imediatamente chamará você ao HCFMUSP para avaliação e diagnóstico da intercorrência. Na presença de meningite, você será internado na Instituição e devidamente tratado com antibióticos até que os sintomas desapareçam.

Na visita 2, que ocorrerá 3 meses após a visita 1, você receberá todas as informações sobre os resultados obtidos na visita 1. Se os resultados mostrarem que você é portador de outra doença que não a Doença do Neurônio Motor, você será excluído da pesquisa e receberá todas as orientações e encaminhamento para o acompanhamento da sua doença na Instituição. Se os resultados mostrarem que você é portador de Doença do Neurônio Motor/ELA, você receberá agendamento para visitas **trimestrais** no Ambulatório de Pesquisa em ELA do HCFMUSP. Nestas visitas ao Ambulatório de ELA do HCFMUSP, a evolução natural da sua doença será acompanhada a nível assistencial ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde. Apenas no caso da sua doença ir evoluindo para a ELA e a critério do neurologista, você será submetido a outras duas coletas de líquido, para que os biomarcadores do líquido possam ser estudados e identificados nas três fases da doença.

Os dados obtidos de todos os pacientes serão avaliados no término do estudo, quando os Biomarcadores da ELA nas fases ELA clinicamente possível, ELA clinicamente provável ou ELA clinicamente definitiva serão apontados. Os pacientes do estudo que tiveram o líquido coletado, mas não evoluíram para ELA clinicamente provável e eventualmente clinicamente definitiva no período de 4 anos de execução do projeto serão excluídos do estudo e o seu líquido armazenado na Instituição será descartado. Aqueles pacientes que tiveram duas amostras de líquido coletadas, mas no período de 4 anos do projeto não atingirem o estágio de ELA clinicamente definida não serão submetidos à terceira punção para a coleta de líquido, entretanto, os seus dados relativos às fases anteriores serão computados e será feita menção sobre o fato na publicação científica final.

Você não será beneficiado diretamente pelo resultado da pesquisa. Entretanto, a sua participação na pesquisa ajudará os pesquisadores a definirem os biomarcadores da ELA, o que contribuirá para o entendimento clínico da doença e pesquisas futuras para novos tratamentos.

A você será oferecida assistência imediata e assistência integral no que se refere

a eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa. Este documento será assinado por você ou por seu representante legal, e pelo pesquisador principal em 2 vias, sendo que uma delas ficará em seu poder.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas em qualquer etapa do estudo. O investigador principal é o Prof. Dr Gerson Chadi que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo 455, sala 2115, 2º. Andar; Telefone 3061-7460. Email: [gerchadi@usp.br](mailto:gerchadi@usp.br). No mesmo telefone, você poderá encontrar também outros médicos, os Drs. Dagoberto Callegaro e Frederico Menucci de Haidar Jorge que participarão das avaliações clínicas a serem feitas em você. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP). **Rua Ovídio Pires de Campos 225, 5º. Andar. Prédio da Administração. CEP:05403-001 Cerqueira César - São Paulo – SP. Tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549 e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).**

É garantida a você, a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Você será protegido pelo sigilo da pesquisa. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente.

A você será garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo, quando os pesquisadores os tiverem.

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

O pesquisador principal da pesquisa compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado e esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Identificação de biomarcadores no líquido cérebro-espinal de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica”.

Eu discuti com o Prof. Dr. Gerson Chadi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de

confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Para casos de pacientes, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## 8. REFERÊNCIAS

Abdelfattah N, Rajamanickam S, Panneerdoss S, Timilsina S, Yadav P, Onyeagucha BC, et al. MiR-584-5p potentiates vincristine and radiation response by inducing spindle defects and DNA damage in medulloblastoma. *Nat Commun*. 2018;9(1):4541.

Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005;132(21):4653-62.

Andersen CL, Ledet-Jensen J, Orntoft T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245-50.

Andrews JA, Jackson CE, Heiman-Patterson TD, Bettica P, Brooks BR, Pioro EP. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2020;21(7-8):509-18.

Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, Kordasiewicz HB, McAlonis-Downes M, et al. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(8):E736-45.

Baker SK, Chen ZL, Norris EH, Strickland S. Plasminogen mediates communication between the peripheral and central immune systems during systemic immune challenge with lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):172.

Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, Bastos ML, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases – a mechanistic approach. *Toxicol Lett*. 2014;230(2):85-103.

Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*. 2011;117(11):3140-6.

Bakola E, Kokotis P, Zambelis T, Karandreas N. Inappropriate surgeries in amyotrophic lateral sclerosis: a still considerable issue. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014;15(3-4):315-7.

Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med*. 2016;18(4):551-560. Epub 2016 Apr 27.

Bergemalm D, Forsberg K, Srivastava V, Graffmo KS, Andersen PM, Brännström T, Wingsle G, Marklund SL. Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurochem*. 2010;114(2):408-18.

Böhme MA, Beis C, Reddy-Alla S, Reynolds E, Mampell MM, Grasskamp AT, et al. Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune Ca<sup>2+</sup> channel-vesicle coupling. *Nat Neurosci*. 2016;19(10):1311–20.

Bowser R, Turner MR, Shefner J. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(11):631-8.

Bradley WG. Biological markers in amyotrophic lateral sclerosis: help or hindrance? *J Neurol*. 1999;246 Suppl 3:III13-5.

Brenneman LH, Maness PF. NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2010;663:299-317.

Bryson JB, Hobbs C, Parsons MJ, Bosch KD, Pandraud A, Walsh FS, Doherty P, Greensmith L. Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(17):3871-82.

Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(2):162-72.

Charcot J-M, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. Paris, Masson, 1869.

Chatterjee M, van Steenoven I, Huisman E, Oosterveld L, Berendse H, van der Flier WM, et al. Contactin-1 Is Reduced in Cerebrospinal Fluid of Parkinson's Disease Patients and Is Present within Lewy Bodies. *Biomolecules*. 2020;10(8):1177.

Chelstowska B, Kuzma-Kozakiewicz M. Is cerebrospinal fluid obtained for diagnostic purpose a good material for biomarker studies in amyotrophic lateral sclerosis? *Biomarkers*. 2014;19(7):571-7.

Chen-Plotkin AS, Lee VM, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:211–20.

Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018;17(1):94-102.

Cirnigliaro M, Barbagallo C, Gulisano M, Domini CN, Barone R, Barbagallo D, et al. Expression and Regulatory Network Analysis of miR-140-3p, a New Potential Serum Biomarker for Autism Spectrum Disorder. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:250.

Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. 2015;347(6229):1436-41.

Cleland A, Malloy K, Donnelly MC, Davidson J, Simpson KJ, Petrik J. Design and evaluation of Taqman low density array for monitoring post-transplant viral infections. *Transpl Infect Dis*. 2021;23(2):e13499.

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):806-19.

Collins MA, An J, Hood BL, Conrads TP, Bowser RP. Label-Free LC-MS/MS Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Identifies Protein/Pathway Alterations and Candidate Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Proteome Res.* 2015;14(11): 4486-501.

Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, et al. Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain.* 2014;137(Pt 7):2040-51.

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1794-805.

Cruzeiro GAV, Salomão KB, de Biagi CAO Jr, Baumgartner M, Sturm D, Lira RCP, et al. A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma subgrouping. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):33.

Dalakas MC, Alexopoulos H, Spaeth PJ. Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(11):601-17.

Dangla-Valls A, Molinuevo JL, Altirriba J, Sánchez-Valle R, Alcolea D, Fortea J, et al. CSF microRNA Profiling in Alzheimer's Disease: a Screening and Validation Study. *Mol Neurobiol.* 2017;54(9):6647-54.

Darvasi O, Szabo PM, Nemeth K, Szabo K, Spisak S, Liko I, et al. Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):169-82.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56.

Demestre M, Pullen A, Orrell RW, Orth M. ALS-IgG-induced selective motor neurone apoptosis in rat mixed primary spinal cord cultures. *J Neurochem.* 2005;94(1):268-75.

De Felice B, Guida M, Guida M, Coppola C, De Mieri G, Cotrufo RA. miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene.* 2012;508(1):35-40.

De Felice B, Manfellotto F, Fiorentino G, Annuziata A, Biffali E, Pannone R, Federico A. Wide-Ranging Analysis of MicroRNA Profiles in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Using Next-Generation Sequencing. *Front Genet.* 2018;9:310.

de Ronde MWJ, Ruijter JM, Moerland PD, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. Study Design and qPCR Data Analysis Guidelines for Reliable Circulating miRNA Biomarker Experiments: A Review. *Clin Chem.* 2018;64(9):1308-18.

Dhillon VS, Fenech M. Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 2014;759:1-13.

Díez-Planelles C, Sánchez-Lozano P, Crespo MC, Gil-Zamorano J, Ribacoba R, González N, et al. Circulating microRNAs in Huntington's disease: Emerging mediators in metabolic impairment. *Pharmacol Res.* 2016;108:102-10.

Dietrich-Neto F, Callegaro D, Dias-Tosta E, Silva HA, Ferraz ME, Lima JM, Oliveira AS. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000;58(3A):607-15.

Elden AC, Kim H-J, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature.* 2010;466(7310):1069-75.

Enciu AM, Popescu BO, Gheorghisan-Galateanu A. MicroRNAs in brain development and degeneration. *Mol Biol Rep.* 2012;39(3):2243–52.

Faivre-Sarrailh C, Devaux J. Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: Implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:196.

Festoff BW, Citron BA. Thrombin and the Coag-Inflammatory Nexus in Neurotrauma, ALS, and Other Neurodegenerative Disorders. *Front Neurol.* 2019;10:59.

Foggin S, Mesquita-Ribeiro R, Dajas-Bailador F, Layfield R. Biological Significance of microRNA Biomarkers in ALS-Innocent Bystanders or Disease Culprits? *Front Neurol.* 2019;10:578.

Freischmidt A, Müller K, Zondler L, Weydt P, Volk AE, Božič AL, et al. Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain.* 2014;137(Pt 11):2938-50.

Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Müller K, et al. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci.* 2015;18(5):631–6.

Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R. Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem.* 2011;117(3):528-37.

Gayen M, Bhomia M, Balakathiresan N, Knollmann-Ritschel B. Exosomal MicroRNAs Released by Activated Astrocytes as Potential Neuroinflammatory Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2312.

Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules.* 2014;19(5):6891-910.

Guo J, Yang Z, Yang X, Li T, Liu M, Tang H. miR-346 functions as a pro-survival factor under ER stress by activating mitophagy. *Cancer Lett.* 2018;413:69-81.

Guo T, Zheng C, Wang Z, Zheng X. miR-584-5p regulates migration and invasion in non-small cell lung cancer cell lines through regulation of MMP-14. *Mol Med Rep.* 2019;19(3):1747-52.

Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, Shaw PJ, Simmons Z, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17085.

Haukedal H, Freude K. Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *J Mol Biol*. 2019;431(9):1818-29.

Hawi Z, Tong J, Dark C, Yates H, Johnson B, Bellgrove MA. The role of cadherin genes in five major psychiatric disorders: A literature update. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2018;177(2):168-80.

He TD, Zhu JK, Wei ZX, Wang YM. MicroRNA-520d-3p inhibits osteosarcoma progression by degradation of Akt1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(8):2315-20.

Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J*. 2017;474(8):1417-38.

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1359-69.

Ho GJ, Smirnova IV, Akaaboune M, Hantaï D, Festoff BW. Serine proteases and their serpin inhibitors in Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*. 1994;48(7):296-304.

Hu C, Cui S, Zheng J, Yin T, Lv J, Long J, et al. MiR-875-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by repressing astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) expression. *Transl Cancer Res*. 2018;7(1):158-69.

Hultman K, Cortes-Canteli M, Bounoutas A, Richards AT, Strickland S, Norris EH. Plasmin deficiency leads to fibrin accumulation and a compromised inflammatory response in the mouse brain. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):701-12.

Jennings MJ, Kagiava A, Vendredy L, Spaulding EL, Stavrou M, Hathazi D, et al. NCAM1 and GDF15 are biomarkers of Charcot-Marie-Tooth disease in patients and mice. *Brain*. 2022;145(11):3999-4015.

Jiang F, Shen XB. miRNA and mRNA expression profiles in gastric cancer patients and the relationship with circRNA. *Neoplasma*. 2019;66(6):879-86.

Jin L, Wan W, Wang L, Wang C, Xiao J, Zhang F, et al. Elevated microRNA-520d-5p in the serum of patients with Parkinson's disease, possibly through regulation of cereloplasmin expression. *Neurosci Lett*. 2018;687:88-93.

Johnson JO, Pioro EP, Boehringer A, Chia R, Feit H, Renton AE, et al. Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2014;17(5):664-6.

Kalafatakis I, Savvaki M, Velona T, Karagogeos D. Implication of Contactins in Demyelinating Pathologies. *Life (Basel)*. 2021;11(1):51.

Kalra S, Arnold D. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2003;4(4):243-8.



- Kawahara R, Ortega F, Rosa-Fernandes L, Guimarães V, Quina D, Nahas W, et al. Distinct urinary glycoprotein signatures in prostate cancer patients. *Oncotarget*. 2018;9(69):33077-97.
- Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 2013;495(7442):467-73.
- Kira JI, Yamasaki R, Ogata H. Anti-neurofascin autoantibody and demyelination. *Neurochem Int*. 2019;130:104360.
- Konovalova J, Gerasymchuk D, Parkkinen I, Chmielarz P, Domanskyi A. Interplay between MicroRNAs and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):6055.
- Kovanda A, Leonardis L, Zidar J, Koritnik B, Dolenc-Groselj L, Kovacic SR, Curk T, Rogelj B. Differential expression of microRNAs and other small RNAs in muscle tissue of patients with ALS and healthy age-matched controls. *Sci Rep*. 2018;8(1):5609.
- Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, Reddy PH. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;146:47-94.
- Laslo P, Lipski J, Nicholson LF, Miles GB, Funk GD. GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2001;169:461-71.
- Lee YB, Chen HJ, Peres JN, Gomez-Deza J, Attig J, Stalekar M, et al. Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep*. 2013;5(5):1178-86.
- Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2012;15(6):827-35.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2003;73(1):34-48.
- Li L, Chen HZ, Chen FF, Li F, Wang M, Wang L, et al. Global microRNA expression profiling reveals differential expression of target genes in 6-hydroxydopamine-injured MN9D cells. *Neuromolecular Med*. 2013;15(3):593-604.
- Li L, Qiu Xg, Lv Pw, Wnag F. miR-639 promotes the proliferation and invasion of breast cancer cell in vitro. *Cancer Cell Int*. 2014;14:39.
- Li Q, Li Z, Wei S, Wang W, Chen Z, Zhang L, et al. Overexpression of miR-584-5p inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):59.

- Ligouri M, Nuzziello N, Introna A, Consiglio A, Licciulli F, D'Errico E, et al. Dysregulation of MicroRNAs and Target Genes Networks in Peripheral Blood of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:288.
- Liu FF, Zhang Z, Chen W, Gu, H.Y, Yan Qj. Regulatory mechanism of microRNA-377 on CDH13 expression in the cell model of Alzheimer's disease. *Eur Rev Med Pharmacol*. 2018;22:2801-8.
- Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2017;8:1005.
- Long JM, Maloney B, Rogers JT, Lahiri DK. Novel upregulation of amyloid- $\beta$  precursor protein (APP) by microRNA-346 via targeting of APP mRNA 5'-untranslated region: Implications in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2019;24(3):345-363.
- Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol*. 2019; 32(5):771-6.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-8.
- Lusardi TA, Phillips JI, Wiedrick JT, Harrington CA, Lind B, Lapidus JA, Quinn JF, Saugstad JA. MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;55(3):1223-33.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007; 449(7163):682-8.
- Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:265.
- Marin B, Boumédiène F, Logroscino G, Couratier P, Babron M-C, Leutenegger AL, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017;46(1):57-74.
- Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic and therapeutic tools for Alzheimer's disease: advances and limitations. *Neural Regen Res*. 2019;14(2):242-55.
- Makki AA, Benatar M. Diagnostic accuracy of thoracic paraspinal electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurophysiol*. 2007;24(3):298-300.
- Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci*. 2019;13:1310.
- Melzer TR, Stark MR, Keenan RJ, Myall DJ, MacAskill MR, Pitcher TL, et al. Beta Amyloid Deposition Is Not Associated With Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2019;10:391.

- Mitsumoto H, Gordon P, Kaufmann P, Gooch CL, Przedborski S, Rowland LP. Randomized control trials in ALS: lessons learned. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2004;5 Suppl 1:8-13.
- Mor E, Cabilly Y, Goldshmit Y, Zalts H, Modai S, Edry L, et al. Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):3710–23.
- Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab*. 2019;30(4):656-73.
- Moura MC, Casulari LA, Carvalho Garbi Novaes MR. Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016;17(3-4):275-81.
- Mulder DW. Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*. 1982;36:15-22.
- Naumann N, Alpár A, Ueberham U, Arendt T, Gärtner U. Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus*. 2010;20(8):971-9.
- Neumann M, Bentmann E, Dormann D, Jawaid A, DeJesus-Hernandez M, Ansorge O, et al. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2595-609.
- Norris SP, Likanje MN, Andrews JA. Amyotrophic lateral sclerosis: update on clinical management. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(5):641-8.
- O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185–204.
- Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 1996;16(21):6732-41.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
- Paul S, Vázquez LAB, Uribe SP, Reyes-Pérez PR, Sharma A. Current Status of microRNA-Based Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Disorders. *Cell*. 2020;9(7):1698.
- Poser CM, Bunch LD. Serum amino acid studies in amyotrophic lateral sclerosis. II. Results of metrecal arginine lysine tolerance tests in US caucasians and Guam Chamorros. *Arch Neurol*. 1966;14(3):305-12.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):358-69.
- Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol*. 2016;26(9):668-79.

Pullen AH, Demestre M, Howard RS, Orrell RW. Passive transfer of purified IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis to mice results in degeneration of motor neurons accompanied by Ca<sup>2+</sup> enhancement. *Acta Neuropathol.* 2004;107(1):35-46.

Ratti A, Buratti E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem.* 2016;138(Suppl. 1):95–111.

Ravnik-Glavač M, Glavač D. Circulating RNAs as Potential Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1714.

Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;107:215-62.

Ren RJ, Zhang YF, Dammer EB, Zhou Y, Wang LL, Liu XH, et al. Peripheral blood microRNA expression profiles in Alzheimer's disease: Screening, validation, association with clinical phenotype and implications for molecular mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016;53(8):5772–81.

Ren Z, Yang T, Ding J, Liu W, Meng X, Zhang P, Liu K, Wang P. MiR-520d-3p antitumor activity in human breast cancer via post-transcriptional regulation of spindle and kinetochore associated 2 expression. *Am J Transl Res.* 2018;10(4):1097-108.

Riancho J, Vázquez-Higuera JL, Pozueta A, Lage C, Kazimierczak M, Bravo M, et al. MicroRNA Profile in Patients with Alzheimer's Disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in Raw and Exosome Enriched Cerebrospinal Fluid Samples. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(2):483-91.

Ricci C, Marzocchi C, Battistini S. MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells.* 2018;7(11):219-38.

Rosen DR, T Siddique, D Patterson, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362(6415):59–62.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol.* 2008;26(4):462-9.

Rowland LP. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol.* 2001;58(3):512-5.

Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, Burns TM, Warder J, David WS, et al. Electrical impedance myography as a biomarker to assess ALS progression. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012;13(5):439-45.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101–8.

Schwenk BM, Hartmann H, Serdaroglu A, Schludi MH, Hornburg D, Meissner F, et al. TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *EMBO J.* 2016; 35(21):2350–70.

Shah P, Cho SK, Thulstrup PW, Bjerrum MJ, Lee PH, Kang JH, Bhang YJ, Yang SW. MicroRNA Biomarkers in Neurodegenerative Diseases and Emerging NanoSensors Technology. *J Mov Disord*. 2017;10(1):18–28.

Shen Y, Yang L, Li R. What does complement do in Alzheimer's disease? Old molecules with new insights. *Transl Neurodegener*. 2013;2(1):21.

Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10432-9.

Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol*. 1999;159(2):362-76.

Sorensen SS, Nygaard AB, Nielsen MY, Jensen K, Christensen T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res*. 2014;5(6):711-8.

Sta M, Sylva-Steenland RM, Casula M, de Jong JMBV, Troost D, Aronica E, Baas F. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):211-20.

Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *Plos One*. 2018;13(10):e0206239.

Strekalova H, Buhmann C, Kleene R, Eggers C, Saffell J, Hemperly J, et al. Elevated levels of neural recognition molecule L1 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and other dementia syndromes. *Neurobiol Aging*. 2006;27(1):1–9.

Sturme E, Malaspina A. Blood biomarkers in ALS: challenges, applications and novel frontiers. *Acta Neurol Scand*. 2022;146(4):375-88.

Sullivan PF, Keefe RS, Lange LA, Lange EM, Stroup TS, Lieberman J, Maness PF. NCAM1 and neurocognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2007;61(7):902–10.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008;319(5870):1668–72.

Taguchi YH, Wang H. Exploring microRNA Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19:E1318.

Takahashi F, Takei K, Tsuda K, Palumbo J. Post-hoc analysis of MCI186-17, the extension study to MCI186-16, the confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of edaravone in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017;18(supp.1):32-9.

Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernández-Klett F, Lin G, Sagar, et al. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci*. 2017;20(6):793–803.

Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206.

Todaro L, Puricelli L, Gioseffi H, Guadalupe Pallotta M, Lastiri J, Bal de Kier Joffé E, Varela M, Sacerdote de Lustig E. Neural cell adhesion molecule in human serum. Increased levels in dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol Dis*. 2004;15(2):387-93.

Turner MR, Agosta F, Bede P, Govind V, Lule D, Verstraete E. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomark Med*. 2012;6(3):319-37.

Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2009;8(1):94-109.

Varcianna A, Myszczyńska MA, Castelli LM, O'Neill B, Kim Y, Talbot J, et al. Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS. *EBioMedicine*. 2019;40:626-35.

van den Berg MMJ, Krauskopf J, Ramaekers JG, Kleinjans JCS, Prickaerts J, Briedé JJ. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2020;185:101732.

Verjans R, van Bilsen M, Schroen B. MiRNA Deregulation in Cardiac Aging and Associated Disorders. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;334:207-63.

Vrabec K, Boštjancic E, Koritnik B, Leonardis L, Grošelj LD, Zidar J, et al. Differential Expression of Several miRNAs and the Host Genes AATK and DNMT2 in Leukocytes of Sporadic ALS Patients. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:106.

Vucic S, Kiernan MC. Utility of transcranial magnetic stimulation in delineating amyotrophic lateral sclerosis pathophysiology. *Handb Clin Neurol*. 2013;116:561-75.

Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem*. 2003;84(1):3-9.

Wan Y, Liu Y, Wang X, Wu J, Liu K, Zhou J, Liu L, Zhang C. Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2015;10(3).

Wang L, Zhang L. Circulating Exosomal miRNA as Diagnostic Biomarkers of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:53.

Wang YH, Yin YW, Zhou H, Cao YD. miR-639 is associated with advanced cancer stages and promotes proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;16(6):6903-9.

Wang X, Zhou Y, Gao Q, Ping D, Wang Y, Wu W, Lin X, Fang Y, Zhang J, Shao A. The Role of Exosomal microRNAs and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:3232869.

Watanabe Y, Taguchi K, Tanaka M. Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2020;9(9):2022.

Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*. 2005;309(5732):310-1.

Ye X, Luo H, Chen Y, Wu Q, Xiong Y, Zhu J, et al. MicroRNAs 99b-5p/100-5p Regulated by Endoplasmic Reticulum Stress are Involved in Abeta-Induced Pathologies. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:210.

Zhang T, Cai X, Li Q, Xue P, Chen Z, Dong X, Xue Y. Hsa-miR-875-5p exerts tumor suppressor function through down-regulation of EGFR in colorectal carcinoma (CRC). *Oncotarget*. 2016;7:42225-40.

Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1):27.

Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol*. 2007;17:1438-43.

Ziu M, Fletcher L, Rana S, Jimenez DF, Digicaylioglu M. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. *Plos One*. 2011;6(2):e14724.