



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0903797-7 B1



(22) Data do Depósito: 17/09/2009

(45) Data de Concessão: 20/10/2020

(54) Título: MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLEINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE MIRNAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

(51) Int.Cl.: G01N 33/50; G01N 33/58.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; SPINOMICS LTDA.-EPP.

(72) Inventor(es): ROGÉRIO MARGIS; REGINA MARGIS; CARLOS ROBERTO DE MELLO RIEDER.

(57) Resumo: MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLEINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE MIRNAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS. A presente invenção revela um método de diagnóstico/prognóstico de alfa-sinucleinopatias como a Doença de Parkinson. O método da invenção compreende a detecção do nível de microRNAs maduros específicos em amostras de fluidos biológicos como o sangue, sendo útil para o diagnóstico, monitoramento de resposta a tratamento químico ou cirúrgico.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLÉINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE MIRNAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos *in vitro* de diagnóstico e/ou prognóstico. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um método para o diagnóstico e/ou prognóstico de alfa-sinucleinopatias, como a Doença de Parkinson. O método da invenção compreende a quantificação comparativa de miRNAs de amostras de indivíduos suspeitos ou acometidos de alfa-sinucleinopatias, proporcionando informação diagnóstica/prognóstica útil na definição de condutas clínicas.

Antecedentes da Invenção

15 A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica que acomete homens e mulheres de diferentes raças e classes sociais. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a DP ocorre em 1.8¹-3.3²% dos indivíduos com idade superior a 65 anos. Frente ao aumento da expectativa de vida da população mundial torna-se evidente a tendência ao aumento do número de pessoas potencialmente acometidas pela DP e a importância do adequado diagnóstico nestes pacientes. Também tem sido demonstrado piora na qualidade de vida dos indivíduos com DP³⁻⁵ e de seus cuidadores⁴.

20 A Doença de Parkinson é uma alfa-sinucleinopatia caracterizada pela ocorrência de sintomas motores como rigidez muscular, tremor de repouso, bradicinesia e instabilidade postural⁶. Os sintomas não-motores da DP incluem disfunções autonômicas, sensoriais e neuropsiquiátricas⁷.

25 As características clínicas da DP e a sua progressão são muito variáveis para cada paciente. Existem diferentes propostas para os critérios a serem considerados no diagnóstico clínico da DP. Os critérios propostos pelo Banco de Cérebros de Londres⁶ têm sido utilizados e consistem em três etapas: (1) Na primeira etapa é avaliada a presença de sintomas compatíveis com a

síndrome parkinsoniana, na qual é necessária a presença de bradicinesia associada a pelo menos uma das seguintes manifestações: rigidez muscular, tremor de repouso, instabilidade postural. (2) Na segunda etapa são considerados os critérios de exclusão para a DP, ou seja, o indivíduo não pode

5 apresentar: história de acidentes vasculares encefálicos de repetição com progressão em degraus de sintomas, história de traumas cranianos repetidos, antecedente comprovado de encefalite, crises oculógiras, uso de neuroléptico desde o início dos sintomas da doença, mais que um caso de acometimento familiar, remissão prolongada de sintomas, persistência de acometimento

10 unilateral após três anos, paralisia ocular supranuclear, sinais cerebelares, acometimento autonômico precoce e acentuado, demência em fases iniciais da doença, sinais piramidais, presença de lesões expansivas intra-cranianas (tumores, hidrocefalia à neuroimagem), exposição ao MPTP, má-resposta terapêutica a altas doses de levodopa. (3) Na terceira etapa estão os critérios

15 denominados como de sustentação para o diagnóstico da DP, sendo necessário três ou mais dos seguintes: início unilateral, acometimento assimétrico; doença progressiva; assimetria persistente afetando principalmente o lado de início da doença; resposta excelente à levodopa (melhora de 70 a 100%); resposta à levodopa por cinco anos ou mais;

20 discinesia induzida pela terapia com levodopa; evolução clínica igual ou superior a dez anos.

Atualmente, o diagnóstico definitivo para DP só é possível com a confirmação pela necropsia. Os critérios propostos para confirmação histopatológica da DP consistem em redução substancial de células nervosas

25 na substância negra acompanhada de gliose; pelo menos um corpúsculo de Lewy na substância negra ou no *locus ceruleus* (devem ser examinadas pelo menos quatro diferentes seções em cada uma dessas áreas antes de concluir que os corpúsculos de Lewy estão ausentes); nenhuma evidência patológica para outra doença que produza parkinsonismo, por exemplo: paralisia

30 supranuclear progressiva, degeneração córtico-gânglio-basal, atrofia de múltiplos sistemas⁸. Ressalta-se, desta forma, a importância da diferenciação

entre DP e outras doenças que apresentem parkinsonismo como paralisia supranuclear progressiva, degeneração cortico-gânglio-basal, atrofia de múltiplos sistemas.

Os sinais e sintomas motores da DP devem-se, primariamente, a alterações funcionais dos núcleos da base. De fato, a progressão das dificuldades motoras na DP reflete a gradual degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. No entanto, ressalta-se que a partir dos achados descritos por Braak e cols (2002)⁹ foi destacado o envolvimento de diferentes estruturas cerebrais, além dos núcleos da base, na fisiopatologia da DP o que auxilia a compreender as diferentes manifestações motoras e não motoras da DP. Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da DP a sua etiologia ainda não está completamente estabelecida. Deve-se destacar que o diagnóstico de DP permanece unicamente baseado em critérios clínicos e na experiência da avaliação realizada pelo médico neurologista. Ressalta-se que diversos quadros clínicos cursam com a ocorrência tremor o que reforça a necessidade do adequado diagnóstico diferencial. Estudos atuais sugerem que é freqüente a presença de sintomas não motores antecedendo os sintomas motores e desta forma o diagnóstico de DP¹⁰.

Pesquisas em biologia molecular têm estudado e identificado diferentes microRNAs (miRNAs)¹¹. As miRNAs são seqüências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA (ácido ribonucléico) não-codificante e tem sido proposto que regulem a expressão do gene através do emparelhamento base-específico com RNAmensageiro (RNAm) alvo. Até o momento entende-se que a maioria do miRNAs, em espécies animais, atuam através da inibição da efetiva tradução do RNAm de genes alvo através de um imperfeito pareamento de base com a região 3'UTR (untranslated region) dos RNAm alvo. Esse mecanismo parece estar envolvido com a inibição do início da tradução¹². Em 2007, foi identificado um miRNA, miR-133b, que é expresso em neurônios dopaminérgicos. O miR-133b regula a maturação e função de neurônios dopaminérgicos e foi identificado como deficiente no cérebro de pacientes com DP¹³.

A ocorrência de alterações na expressão de miRNA também foi descrita em células tumorais e tem sido proposto que tais alterações possam contribuir no desenvolvimento do câncer¹⁴. Também foi identificada modificação na expressão de miRNA em líquido cérebro-espinhal relacionados à Doença de Alzheimer¹⁵.

Considerado o potencial da quantificação de miRNA para o diagnóstico de diversas patologias a necessidade de utilizar tecido para essa dosagem dificulta a utilização desta medida em patologias neurológicas. No entanto, a possibilidade da quantificação de miRNAs em sangue venoso periférico poderia ser considerado como uma ferramenta útil e de baixo risco se comparado a procedimentos como biopsia cerebral e punção de líquido cérebro-espinhal.

A literatura científica que circunscreve os objetos da invenção, sem contudo antecipá-los ou sequer sugerir-los é apresentada a seguir.

1. De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*.2000; 54(11) Suppl 5: S21-3.

2. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, Cardoso F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). *Mov Disord*. 2006; 21(6):800-8.

3. Chrischilles EA, Rubenstein LM, Voelker MD, Wallace RB, Rodnitzky RL. The health burdens of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13(3):406-13.

4. Schestatsky P, Zanatto VC, Margis R, Chachamovich E, Reche M, Batista RG, Ficke D, Rieder CRM. Quality of life in a Brazilian sample of patients with Parkinson's disease and their caregivers. *Rev Bras Psiquiatr*.2006; 28(3):209-11.

5. Rahman S, Griffin HJ, Quinn NP, Jahanshahi M. Quality of life in Parkinson's Disease: the relative importance of the symptoms. *Mov Disord*. 2008; 23(10),1428-34.

6. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*.1992; 55:181-4.

7. Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008; 15(Suppl 1):14-20.

8. Gelb D; Oliver E; Gilman SAN. Diagnostic criteria for parkinson disease. *Archives of Neurology*.1999; (56): 33-39.

9. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*.2004; 318:121-34.

10. Chaudhuri RK, Naidu, Y. Early Parkinson' disease and non-motor issues. *J Neurol*. 2008; 225(suppl5): 33-38.

11. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005, 132:4653-4662.

12. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function *Cell* 2004, 116: 281-297.

13. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB et al. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 2007; 317: 1220-1224.

14. Meltzer PS. Small RNAs with big impacts *Nature*. 2005; 435:745-6.

15. Cogswell JP, Taylor IA, Waters , Shi Y, Cannon , Keinar K, Kemppainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer 's disease brain and CSF yields putative biomarkers ad insights into disease pathways. *J Alzheimer Dis*. 2008;14(1):27-41.

A literatura patentária contempla documentos apenas parcialmente relacionados aos objetos da presente invenção.

O pedido internacional de patente WO 2009/009457 "ALZHEIMER'S DISEASE-SPECIFIC MICRO-RNA MICROARRAY AND RELATED METHODS", depositado pela Fundação de Pesquisa da Universidade de Louisville, revela métodos de diagnóstico e/ou prognóstico de Alzheimer pela
5 medida da quantidade, em uma amostra biológica, de um ou mais micro-RNAs relacionados a Alzheimer.

O pedido internacional de patente WO 2008/153692 "MICRORNA EXPRESSION PROFILING OF CEREBROSPINAL FLUID", depositado por THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC., revela métodos de
10 diagnóstico nos quais o nível de determinado microRNAs específicos são determinados no fluido cérebro-espinhal de um indivíduo. O método pode ser usado para o diagnóstico ou monitoramento de doenças neurológicas, especialmente tumores cerebrais.

O pedido internacional de patente WO 2007/107789 "TREATMENT OF
15 CNS CONDITIONS", depositado por Silentis S.A., revela métodos e composições para o tratamento de condições patológicas do sistema nervoso central, por meio da administração intranasal de uma composição que modula, por RNA interferência, a expressão e/ou atividade de genes envolvidos em tais condições.

O pedido internacional de patente WO 2009/025852 "METHODS OF
20 USING miRNA FOR DETECTION OF IN VIVO CELL DEATH", depositado por Xenomics, INC. revela métodos não-invasivos para a detecção de morte celular, através da medida de miRNAs tecido-específicos. O método pode ser aplicado na detecção de patologias causadas ou acompanhadas de morte
25 celular, efeitos citotóxicos induzidos por fatores químicos ou físicos e a presença de anormalidades fetais específicas.

O pedido internacional de patente WO 2009/026416 "SHORT-
CONTROLLING NUCLEIC ACIDS USEFUL IN THE TREATMENT AND
DETECTION OF DISEASES", depositado por VDX LLC, revela métodos para a
30 utilização de sequências curtas controladores (scRNAs) para triagem e identificação de ácidos nucleicos alvo que se liguem a sequências de scRNAs

em *loop*. Também são revelados métodos para detectar scRNAs e métodos para diagnóstico e tratamento úteis de doenças nas quais scRNAs ou níveis aberrantes dos mesmos são expressos.

O pedido internacional de patente WO 05045034, "RNA
5 INTERFERENCE MEDIATED TREATMENT OF PARKINSON DISEASE
USING SHORT INTERFERING NUCLEIC ACID (siRNA)", depositado por
SIRNA Therapeutics, INC., revela métodos e reagentes úteis na modulação de
genes de Parkinson, por exemplo, a expressão gênica de PARK1 (SNCA),
PARK2, PARK7, e/ou PARK5 em uma variedade de aplicações, incluindo
10 terapêutica, diagnóstica, validação de alvos e descobertas genômicas.
Especificamente, são reveladas moléculas pequenas de ácido nucleico, como
siNA, siRNA, dsRNA, miRNA, e shRNA, como moléculas capazes de mediar a
RNA interferência contra a expressão gênica e/ou atividade de SNCA. As
referidas moléculas são propostas como úteis no diagnóstico e tratamento de
15 Doença de Parkinson e a qualquer outra doença ou condição que responda à
modulação da expressão ou atividade de PARK1 (SNCA), PARK2, PARK7,
e/ou PARK5.

Não foram encontrados no estado da arte antecedentes que antecipem
integralmente, ou sequer sugiram, mesmo que em combinação, a estratégia da
20 presente invenção.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar métodos de
diagnóstico e/ou prognóstico de alfa-sinucleinopatias, como a Doença de
25 Parkinson.

Em um aspecto, sendo, portanto, um dos objetos da invenção, é
proporcionado um método que compreende a quantificação comparativa de
miRNAs de amostras de indivíduos suspeitos ou acometidos de alfa-
sinucleinopatias.

30 É também um outro objeto da presente invenção proporcionar um
método diagnóstico/prognóstico que compreende a quantificação comparativa

de miRNAs (microRNAs) selecionados de um grupo que compreende: miR 1, miR16-2*, miR22*, miR26a2*, miR29a, miR30a, miR487b, let7c*, miR16, miR100, miR150, miR125-b1*, miR132 e miR191, ou ainda combinações dos mesmos.

- 5 Estes e outros da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

Breve Descrição das Figuras

- 10 A figura 1 mostra o padrão de expressão de microRNAs com níveis alterados na comparação entre indivíduos controle (Cnt) e diagnosticados clinicamente como apresentando a Doença de Parkinson (PD) – Grupo I (Low temperature).

- 15 A figura 2 mostra o padrão de expressão de microRNAs com níveis alterados na comparação entre indivíduos controle (Cnt) e diagnosticados clinicamente como apresentando a Doença de Parkinson (PD) - Grupo II (High temperature).

Descrição Detalhada da Invenção

- 20 Os detalhes relatados a seguir visam facilitar a reprodução da invenção, devendo, portanto, ser compreendidos como meramente ilustrativos, sem com isso restringir o escopo da invenção.

- 25 A presente invenção é baseada no fato de que alguns miRNAs são expressos em diferentes níveis em sangue periférico, quando avaliado pacientes com Doença de Parkinson em relação a indivíduos sem a doença. Esta observação permite considerar a utilização de sangue periférico na avaliação desta patologia. A comparação pode ser feita entre os níveis de miRNA em sangue venoso de um determinado indivíduo em relação a controles. A comparação pode ser feita de forma direta ou pelo cálculo da
30 razão entre os microRNAs e a determinação da presença da patologia (e sua

evolução ou remissão) se a relação exceder limites de 25, 50 ou 75% em relação aos níveis observados em indivíduos controle, sem a doença.

A invenção é direcionada para o diagnóstico e monitoramento de uma alfa-sinucleinopatia, a Doença de Parkinson, a partir de amostra de sangue venoso em um determinado indivíduo. O termo diagnóstico se refere à detecção da doença. O termo monitoramento se refere aos testes realizados em pacientes com o diagnóstico prévio da referida doença tendo como proposta medir a progressão da doença ou efeito do tratamento.

Em uma concretização preferencial, o método da invenção compreende a obtenção de uma amostra de sangue venoso periférico de um dado indivíduo e a análise dessa amostra para determinar a concentração ou quantidade de uma série de até quatorze microRNAs em análise. Os resultados obtidos são comparados com os obtidos de amostras controle. A amostra controle provém de indivíduos livres da doença. No caso em que o método for utilizado para monitorar a doença, a amostra “controle” é o resultado do teste obtido do próprio paciente na medida anterior. Ou seja, o paciente pode ser avaliado para mudanças nos níveis de miRNAs em diferentes momentos e estágios da doença, assim como previamente e posteriormente a determinada intervenção terapêutica (medicação ou cirurgia).

Ressalta-se que não é necessário que a amostra controle seja obtida e analisada no mesmo momento em que esteja sendo realizada a análise da amostra teste. Uma vez que os dados “controle” podem ser pré-estabelecidos, esses níveis poderão fornecer a base para comparação sem a necessidade de repetir uma nova análise do controle para cada teste a ser analisado. A comparação entre as amostras teste e controle fornece a base para a conclusão quanto ao fato de o indivíduo ser acometido por uma alfa-sinucleinopatia (por exemplo, Doença de Parkinson) em análise no caso do método estar sendo utilizado para o diagnóstico ou se a doença está progredindo ou regredindo; no caso do método estar sendo utilizado para monitorar a patologia. De um modo geral, quanto maior diferença entre a

amostra teste e a amostra controle, mais intensa a indicação da presença da doença.

Os microRNAs empregados no método da invenção incluem: miR-1; let-7c*; miR-22*; miR-26a2*; miR-29a; miR-30a; miR-16-2*; miR-487b; miR-16; miR-100; miR-150; miR-125-b1*; miR-132*; miR-191. As designações fornecidas estão associadas a sequências específicas que podem ser encontradas no registro de microRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Os microRNAs referem-se a sequências encontradas em humanos, ilustradas/os na tabela 1.

10 **Tabela 1:** Sequências nucleotídicas dos microRNAs maduros, com os quais foi desenvolvida a metodologia para diagnóstico de alfa-sinucleinopatias.

MicroRNA	Sequência	SEQ ID No.
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	SEQ ID No. 1
let-7c*	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA	SEQ ID No. 2
miR-22*	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	SEQ ID No. 3
miR-26a2*	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	SEQ ID No. 4
miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	SEQ ID No. 5
miR-30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	SEQ ID No. 6
miR-16-2*	CCAAUAUUACUGUGCUGCUUUA	SEQ ID No. 7
miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	SEQ ID No. 8
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	SEQ ID No. 9
miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	SEQ ID No. 10
miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	SEQ ID No. 11
miR-125-b1*	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	SEQ ID No. 12
miR-132*	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	SEQ ID No. 13
miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	SEQ ID No. 14

Por vezes, há membros da família destes miRNAs que são reconhecidos e os quais poderiam ser considerados como equivalentes a seqüência específica. Apesar das seqüências serem apresentadas como seqüências de RNA, deve ser compreendido que se referindo à hibridização ou outros ensaios as seqüências de DNA correspondente podem ser utilizadas da mesma forma. Por exemplo, seqüência de RNA pode ser transcrita ao reverso e amplificada usando a reação em cadeia da polimerase visando facilitar a detecção. Nesses casos será o DNA diretamente quantificado. Também deve ser esclarecido que o complemento da seqüência de DNA transcrita ao reverso pode ser analisado ao invés da seqüência em si. Nesse contexto, o termo complemento se refere ao oligonucleotídeo que apresenta a exata seqüência complementar.

Para análise dos microRNAs a partir da amostra de sangue é utilizado o método de PCR quantitativo, com o emprego de fluoróforos intercalantes como o SYBR-green (ou equivalente) como descrito no trabalhos de Chen et al de 2005 (Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33:e179) e de Jiang JM et al de 2005 (Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research* 33: 5394-5403).

Também podem ser utilizadas sondas marcadas com fluoróforos específicos (FAM, HEX, TAMRA ou outros) como descrito em trabalhos correlacionando níveis de miRNAs com o câncer (Chen et al. 2009. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* 50: 358-369; Childs et al. 2009. Low-Level Expression of MicroRNAs let-7d and miR-205 Are Prognostic Markers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *American Journal of Pathology* 174: 736-745; Sun et al. 2008. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 464-473; Szafranska et al. 2008. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical Chemistry* 54: 1716-1724; Tang et al. 2008. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease.

Alcoholism-Clinical and Experimental Research 32: 355-364).

O nível de expressão dos microRNAs quantificada, tendo-se como base a metodologia de PCR em tempo real, será realizada em duas etapas. Na 1ª etapa, uma série de até 14 oligonucleotídeos (multi-plex) contendo uma seqüência universal fusionada a uma seqüência microRNA específica de seis nucleotídeos será utilizado para a síntese de cDNA a partir do microRNA. Na 2ª etapa, as reações de PCR em tempo real serão realizadas utilizando um oligonucleotídeo que é microRNA específico e um oligonucleotídeo complementar a seqüência universal presente no oligonucleotídeo utilizado para a síntese dos cDNAs.

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) serão realizadas em equipamento padrão. De forma ilustrativa, considera-se que a PCR apresente etapas das reações que serão compostas de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 10s a 94°C, 15s a 60°C e 10s a 72°C. Após, as amostras serão aquecidas de 60 para 99°C com um aumento de 0,1°C/s para adquirir os dados produzidos pela curva de desnaturação dos produtos amplificados. qRT-PCRs serão feitos em um volume final de 20 µL composto de 10 µL de cada amostra de cDNA diluída de 50 a 100 vezes em 2 µL de Platinum Taq 10x PCR buffer, 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,4 µL dNTPs 5 mM, 0,4 µL do par de oligonucleotídeos a 10 µM, 3,95 µL H₂O, 2,0 µL SYBR green ou sonda marcada, e 0,05 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL).

Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações na forma de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Método *in vitro* para diagnóstico e monitoramento de alfa-sinucleinopatias em determinado indivíduo **caracterizado** por compreender:

- a) determinar a concentração, em um material compreendendo fluido e/ou tecido biológico, da quantidade ou níveis de um ou mais microRNAs através de metodologia de PCR quantitativa utilizando fluoróforos intercalantes e/ou sondas fluorescentes, referido microRNA sendo selecionado do grupo que compreende: SEQ ID No. 1; SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 4; SEQ ID No. 5; SEQ ID No. 6; SEQ ID No. 7; SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 9; SEQ ID No. 10; SEQ ID No. 11; SEQ ID No. 12; SEQ ID No. 13; SEQ ID No. 14; ou combinações dos mesmos; e
- b) comparar a concentração ou quantidade de um ou mais dos referidos microRNAs determinada na etapa a) com a concentração ou quantidade dos mesmos de uma ou mais amostras biológicas de indivíduos controle.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de que a referida alfa-sinucleinopatia é a Doença de Parkinson.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de que o referido fluido biológico é sangue.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de que o referido material biológico compreende células mononucleares.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por compreender amostras de indivíduos submetidos a tratamentos ou modificação de tratamentos farmacoterápicos para alfa-sinucleinopatias e Doença de Parkinson, baseadas na quantificação de um ou mais miRNAs.

6. Método *in vitro* para determinar a eficiência de tratamento e/ou progressão de alfa-sinucleinopatias e/ou Doença de Parkinson em um indivíduo, **caracterizado** por compreender:

- a) analisar uma série de amostras biológicas para identificar e determinar a quantidade de um ou mais miRNAs correlacionados a alfa-sinucleinopatias

e/ou Doença de Parkinson; onde um ou mais microRNAs é/são amplificado(s) através de metodologia de PCR quantitativa utilizando fluoróforos intercalantes e/ou sondas fluorescentes, referido(s) microRNA(s) sendo selecionado(s) do grupo que compreende: SEQ ID No. 1; SEQ ID No. 2; SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 4; SEQ ID No. 5; SEQ ID No. 6; SEQ ID No. 7; SEQ ID No. 8; SEQ ID No. 9; SEQ ID No. 10; SEQ ID No. 11; SEQ ID No. 12; SEQ ID No. 13; SEQ ID No. 14; ou combinações dos mesmos; e

b) comparar as mudanças mensuráveis de quantidades de um ou mais dos referidos miRNAs em cada uma das amostras biológicas proporcionando indicadores para a determinação da eficiência do tratamento e/ou progressão da alfa-sinucleinopatias e/ou Doença de Parkinson.

Figuras

Figura 1

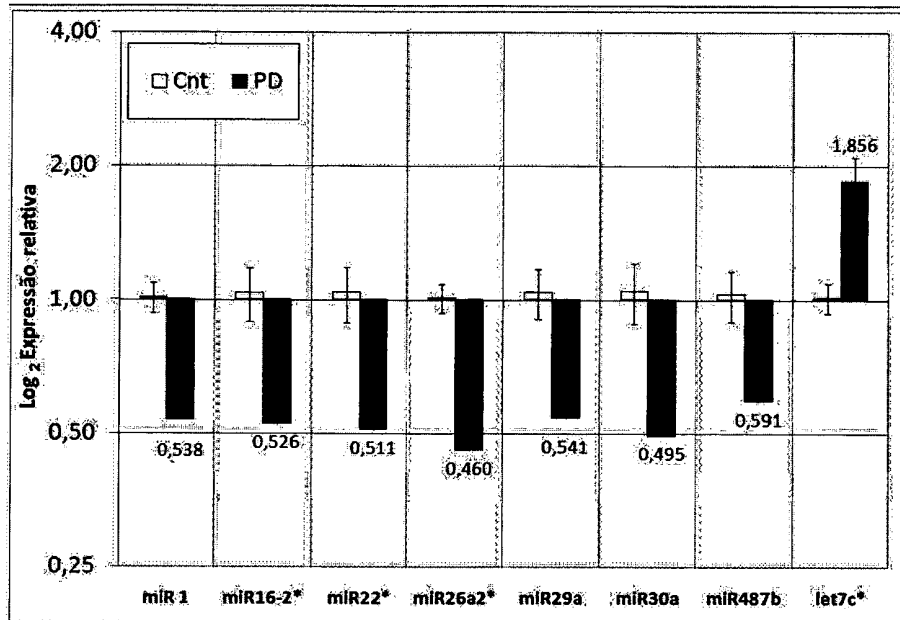


Figura 2

