

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Gabriela Zanotto Staevie

**EXPRESSÃO DE microRNA EM CEREBELO NO MODELO ANIMAL DE
AUTISMO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO PRENATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Porto Alegre

2016

Gabriela Zanotto Staevie

**EXPRESSÃO DE microRNA EM CEREBELO NO MODELO ANIMAL DE
AUTISMO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO PRENATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientador: Prof^ª Carmem Gottfried

Co-orientador: Mestre Mauro Mozael Hirsch

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Staevie, Gabriela
EXPRESSÃO DE microRNA EM CEREBELO NO MODELO
ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO PRENATAL
AO ÁCIDO VALPROICO / Gabriela Staevie. -- 2016.
43 f.

Orientadora: Carmem Gottfried.
Coorientador: Mauro Mozael Hirsch.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. expressão
relativa de microRNA. 3. Cerebelo. 4. modelo animal
de autismo. I. Gottfried, Carmem , orient. II.
Hirsch, Mauro Mozael, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriela Zanotto Staevie

**EXPRESSÃO DE microRNA EM CEREBELO NO MODELO ANIMAL DE
AUTISMO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO PRENATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Guilherme Baldo - UFRGS

Florencia M. Barbé-Tuana - UFRGS

Carmem Gottfried - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha orientadora, Professora Carmem Gottfried, por quase três anos de ensinamentos, dedicação e, principalmente, encorajamento. Com suas palavras e atitudes, sempre é um exemplo para nós, que, na maioria das vezes, estamos desorientados precisando de um guia e então você aparece e transparece esse amor pela ciência que nos faz ter vontade de seguir em frente. Obrigada por ser minha orientadora, e me tornar minha iniciação científica mais feliz.

Agradeço imensamente ao Mauro, coorientador, que nunca me abandonou desde que assumiu esse trabalho junto comigo. Agradeço tua paciência e dedicação para comigo e o trabalho, sempre buscando a maneira mais correta de fazer ciência, me tornou uma aluna melhor e mais dedicada. Descobri, além de um baita pesquisador, um amigo.

Agradeço a minha família pelo apoio ao longo da graduação, incentivando às minhas vontades e escolhas. Ao meu pai, obrigada pelo incentivo ao saber, que desde pequena me incentiva ao estudo e dedicação. A minha mãe, amiga e companheira, dedicada aos filhos sempre apoiando e incentivando a buscar o que nos faz feliz.

Ao meu namorado, meu ponto de apoio, meu amigo para todas as horas. Obrigado por me ajudar a manter o foco e a cabeça no lugar.

E por fim, não menos importante, aos meus colegas e amigos do Laboratório que tornam o trabalho muito divertido. Descobri amigos, parceiros, palhaços que estão sempre dispostos a ajudar e a fazerem piadas de mim. Amo vocês, obrigado pelas risadas e *brainstormings* que é muito melhor com vocês.

Ainda, agradeço às agências de fomento CAPES-CNPQ, FIPE-HCPA e UFRGS.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1.1. Transtorno do Espectro Autista.....	12
1.1.2. Desencadeamento do TEA.....	13
1.1.3. Dados epidemiológicos.....	14
1.1.4. Modelo animal de autismo.....	16
1.1.5. MicroRNA e seu envolvimento com TEA.....	17
1.1.6. Cerebelo e TEA.....	19
1.2. JUSTIFICATIVA.....	20
1.3. OBJETIVOS.....	29
1.3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	44
4. REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	50
Anexo 1.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência do TEA desde o ano 2000 até 2012.....	8
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS EM INGLÊS

ADDM - Autism and Developmental Disabilities Monitoring.....	15
APA – American Psychiatric Association.....	12
CDC - Centers for Disease Control and Prevention	15
DSM-5 – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.....	12
miRNA – microRNA.....	17
RISC – RNA-induced Silencing Complex.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS EM PORTUGUÊS

TEA – Transtorno do Espectro Autista.....	12
VPA – ácido valproico.....	14
SNC – Sistema Nervoso Central.....	18
RNAm – RNA mensageiro.....	17

RESUMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma desordem heterogênea, multifatorial e, segundo o DSM-5, diagnosticada através de uma tríade comportamental que inclui déficits na comunicação e interação social e um repertório de atividades e interesses restritos. A etiologia do TEA ainda é desconhecida, mas se acredita que há uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais envolvidos no desencadeamento do transtorno. A incidência do autismo vem aumentando desde seus primeiros estudos epidemiológicos, implicando no aumento do custo social do transtorno. Dentre os fatores de risco ambientais destaca-se o ácido valproico (VPA). O VPA é um anticonvulsivante sabidamente teratogêno que, quando utilizado durante o primeiro trimestre gestacional, aumenta em sete vezes o risco de o feto desenvolver TEA. Dessa maneira, a exposição pré-natal ao VPA foi demonstrada como um método adequado para indução de modelo animal deste transtorno e está bem estabelecido no nosso laboratório. Os estudos no TEA mostram um complexo envolvimento de diversas áreas cerebrais alteradas no autismo, incluindo o cerebelo. Diversas alterações moleculares, funcionais e morfológicas no cerebelo são relatadas tanto em pacientes com TEA como em modelos animais de autismo. Condições patológicas do cerebelo, como hipoplasia cerebelar e síndrome de Joubert apresentam naturalmente algumas características do tipo autista e ainda, há uma elevada incidência de desenvolvimento de TEA nesses pacientes. Além disso, diversos estudos têm mostrado alterações em níveis de microRNA (miRNA) em diversas amostras biológicas como sangue, tecidos encefálicos *postmortem* e cultura celular. Os miRNA modulam os níveis de proteínas ao se ligar ao seu RNAm alvos e impedir a tradução protéica via degradação do transcrito ou via bloqueio da translação ribossomal. Esse trabalho analisou o nível de expressão de um conjunto de miRNA em ratos de 30 dias do modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA. Ratas prenhes receberam uma única injeção intraperitoneal de VPA (600 mg/kg) ou de salina 0,9% delimitando os grupos VPA e controle. Aos 30 dias de vida os filhotes machos foram eutanasiados e tiveram suas estruturas encefálicas retiradas. O cerebelo foi imediatamente homogeneizado em Trizol e estocado em -80°C. Para análise da expressão gênica foi utilizado RT-qPCR utilizando *primers stem-loop* para a síntese de cDNA. Os dados foram submetidos ao *GeNorm* para determinação dos miRNA normalizadores dentro do conjunto analisado. As expressões relativas foram

calculadas pelo método considerando os valores de eficiência para cada miRNA através do método $-\Delta\Delta Ct$. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student através do *GraphPad*. Considerando um $p < 0,05$ foi encontrado um aumento da expressão relativa do miR-132 e miR-181a. Uma busca por alvos através dos bancos de dados *TargetScan*, *MiRDB* e *miRTarBase* identificou alvos importantes no TEA. Os transcritos *Mecp2* e *Bcl2* são alvos validados tanto em humanos como em ratos do miR-132 e miR-181a respectivamente. *Mecp2* codifica a proteína 2 ligante de metil-CpG que modula a transcrição de diversos genes envolvidos com o funcionamento neuronal e sináptico, muito importante no TEA. Portanto, níveis diminuídos de MECP2 estariam implicados em desregulação sináptica e neuronal. O transcrito *Bcl2* codifica a proteína antiapoptótica BCL2. Níveis diminuídos de BCL2 poderiam influenciar taxas elevadas de apoptose no cerebelo, o que explicaria a perda neuronal e hipoplasia cerebelar. Faz-se necessário analisar os níveis proteicos de MECP2 e BCL2 para explorar seu envolvimento com os miRNA alterados.

1. INTRODUÇÃO

1.1.1. Transtorno do Espectro Autista

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um Transtorno do neurodesenvolvimento primeiramente descrito em 1943 por Leo Kanner (KANNER, 1943). Tipicamente, esses transtornos se manifestam durante a primeira infância e os déficits do desenvolvimento resultam em alterações em habilidades sociais, acadêmicas, pessoais e ocupacionais (APA, 2013).

O DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) é um manual para profissionais da área da saúde mental que lista diferentes categorias de transtornos mentais e critérios para diagnosticá-los, de acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association - APA*). A classificação descrita no DSM-IV como autismo clássico, síndrome de Asperger, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento não-especificados recebem a classificação única de Transtorno do Espectro Autista pelo DSM-5 (APA, 2000, 1994).

Outra mudança significativa descrita no DSM-5 é que a caracterização do espectro anteriormente dividida em três áreas (prejuízo na sociabilidade, na comunicação e presença de estereotípias e comportamentos repetitivos), passa a ser agrupada em dois domínios comportamentais:

- 1) Prejuízo persistente na comunicação e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits em reciprocidade social, comunicação não-verbal utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos;
- 2) Padrões restritos e repetitivos de comportamentos, atividades e interesses.

É importante ressaltar que os sintomas citados acima necessariamente devem estar presentes no início da infância causando prejuízo do funcionamento diário, mas podem não se tornar plenamente manifestos até que as demandas sociais excedam as capacidades limitadas do indivíduo com TEA.

Além disso, existem diversas condições associadas ao TEA, tais como reduzido contato visual (ZWAIGENBAUM et al., 2005), inabilidade para interpretar emoções a partir de expressões faciais (TAYLOR et al., 2015), hipo e hiperresponsividade a estímulos sensoriais (LITTLE et al., 2015), déficits motores (PAN; TSAI; CHU, 2009)

distúrbios gastrointestinais (BUIE et al., 2010). Ainda se observa a presença de epilepsia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (YERYS et al., 2010), desordens de humor e retardo mental (CASANOVA, 2007; GESCHWIND, 2009).

Apesar de haver um padrão restrito para o diagnóstico, o TEA é uma desordem heterogênea e multifatorial (GOTTFRIED; BAMBINI-JUNIOR, 2013). Assim, o transtorno pode estar presente em indivíduos com manifestações distintas e tão vastas, que dois indivíduos não compartilham o mesmo conjunto de sintomas (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; RAPIN; TUCHMAN, 2008). Contudo, todos os indivíduos apresentam necessariamente prejuízos no comportamento social, na comunicação verbal e não-verbal e nos comportamentos repetitivos ou estereotipados, sendo que essas alterações variam em intensidade, mas são presentes ao longo de toda vida (TUCHMAN; MOSHÉ; RAPIN, 2009).

O diagnóstico do TEA costuma ser mais tardio, entre 3-5 anos de idade porque as características comportamentais que podem se manifestar nos primeiros meses de vida são pouco perceptíveis, os prejuízos sociais se tornam mais evidentes somente com o tempo. Além disso, ainda não existe um bom biomarcador que possa servir de auxiliar no diagnóstico precoce

1.1.2. Desencadeamento do TEA

A etiologia do TEA permanece desconhecida e suas bases moleculares ainda estão sob constante investigação. No entanto, estudos apontam para uma interação complexa entre fatores de risco ambientais e fatores genéticos associados ao desencadeamento do transtorno, provavelmente, durante a embriogênese.

Já foi demonstrado que o TEA apresenta um forte componente genético. Estudos com gêmeos apresentam concordância de 60-64% entre gêmeos monozigóticos, comparado a 0-10% entre dizigóticos no autismo clássico (SPENCE, 2004). A alta concordância em monozigóticos é um indicativo de que a herança genética é um fator determinante no desencadeamento do TEA. Ainda, foi revisado por Yin e Schaaf que a herdabilidade do TEA está em torno de 85-92% (YIN; SCHAAF, 2016). Além disso, algumas condições genéticas, como Síndrome do X-frágil e Esclerose Tuberosa, têm alta correlação com TEA (COHEN; PICHARD; TORDJMAN, 2005).

Além de componentes genéticos, outros componentes intimamente envolvidos com o desencadeamento do TEA são as alterações no sistema imunológico durante a gestação (ASHWOOD, 2006; PATTERSON, 2009). Evidências epidemiológicas relacionam ativação do sistema imunológico materno durante a gestação e alterações genéticas relacionadas ao sistema imunológico, com o desenvolvimento de TEA pela prole (ATLADÓTTIR; THORSEN, 2010; CROEN; GREYER, 2005; KORVATSKA et al., 2002). Esses achados são corroborados por estudos envolvendo modelos animais (BAUMAN; IOSIF; SMITH, 2014; MALKOVA; YU; HSIAO, 2012) e, juntamente com as alterações imunológicas encontradas em pessoas com TEA (ASHWOOD; KRAKOWIAK, 2011), ajudam a estabelecer a natureza neuroimunológica desse transtorno.

Observações epidemiológicas também sugerem que a exposição das gestantes a alguns teratógenos podem estar relacionados com o desencadeamento do TEA, destacando-se o valproato de sódio (VPA) (ROULLET; LAI; FOSTER, 2012; SMITH; BROWN, 2014) e a talidomida (IMAI; IIDA; YAMAMOTO, 2014). Um importante estudo epidemiológico mostrou que gestantes que utilizam VPA, principalmente durante o primeiro trimestre gestacional, tem um risco aumentado em sete vezes o desencadeamento do TEA nos seus filhos (CHRISTENSEN, 2014; HARDEN, 2013). Além disso, já foi demonstrado que o VPA induz alterações similares em roedores e seres humanos (GOTTFRIED; BAMBINI-JUNIOR, 2013).

Essas observações levaram ao estabelecimento de um modelo animal para o estudo de TEA, induzidos farmacologicamente pela exposição pré-natal ao ácido valproico, sugerido pela primeira vez em 1997 por Rodier e colaboradores (RODIER et al., 1997).

1.1.3. Dados epidemiológicos

Os primeiros estudos epidemiológicos utilizaram dados de casos ocorridos na Europa e foram apresentados entre 1960 e início de 1970, utilizando os critérios de diagnóstico estabelecidos por Kanner e Eisenberg (KANNER, 1943), que consistiam em profunda ausência de contato afetivo pelo menos até os cinco anos de idade e elaboradas rotinas repetitivas (LOTTER, 1966). Esses dados apresentaram prevalência de 1 a cada 2500 crianças, esses critérios foram utilizados até a década de 1980

(GILLBERG; WING, 1999). No final da década de 1980, um estudo observou uma prevalência de quatro casos de TEA para cada 10000 crianças utilizando os critérios do DSM-III (RITVO ER, FREEMAN BJ, 1989). Em 2000, o órgão Centros de Controle e Prevenção de Doenças (em inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) dos EUA criou a rede *Autism and Developmental Disabilities Monitoring* (ADDM) para a realização dos estudos epidemiológicos do TEA nos EUA. A tabela abaixo ilustra o aumento na prevalência do TEA no período entre 2000 e 2012, estimada a cada dois anos para crianças de oito anos de idade.

Tabela 1. Prevalência do TEA desde o ano 2000 até 2012.

Prevalência	Ano de monitoramento
1:150	2000 e 2002
1:125	2004
1:110	2006
1:88	2008
1:68	2010 e 2012

Fonte: Adaptado de CDC - Autism Spectrum Disorder: Data and Statistics.

Os dados acima não estão separados por gênero, mas é importante ressaltar que há uma diferença na prevalência entre meninos e meninas, sendo o TEA mais frequente em meninos. Em 2012, a prevalência era de 1:42 meninos e 1:189 meninas (CHRISTENSEN et al., 2016).

O aumento na prevalência observado não deve ser atribuído somente ao aumento da incidência do TEA. Outros fatores também podem estar contribuindo para o aumento da prevalência, incluindo mudanças nos critérios e consequente migração de diagnósticos para TEA, além do aumento da consciência sobre o TEA tanto pelos pais e educadores como pelos profissionais da saúde (FOMBONNE, 2009). Além disso, estudos epidemiológicos (CHRISTENSEN, 2014) e com modelos animais apontam para fatores de risco ambientais que estariam contribuindo para o aumento da incidência (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013).

1.1.4. Modelo animal de autismo

Os primeiros relatos relacionando autismo com exposição pré-natal a um teratígeno foram com talidomida. Durante um estudo com vítimas da talidomida na Suécia, se observou que algumas delas foram diagnosticadas com autismo e que foram expostas à talidomida, aproximadamente, entre os dias 20 a 24 de gestação (MILLER, 1991). No entanto, a talidomida não reproduz em ratos os mesmos efeitos observados em humanos, sendo necessário utilizar outros fármacos que tivessem efeitos semelhantes, como o VPA (RODIER et al., 1996).

O VPA é um anticonvulsivante utilizado no tratamento de epilepsia e transtorno bipolar (PHIEL et al., 2001), e foi demonstrado que quando utilizado por mulheres durante o primeiro trimestre gestacional, está relacionado com um aumento em sete vezes no risco do feto desenvolver TEA (BROMLEY; CLAYTON-SMITH, 2009; CHRISTENSEN, 2014). Além disso, o VPA pode promover atrasos no desenvolvimento e malformações congênitas (ROULLET; LAI; FOSTER, 2013). Rodier e colaboradores tinham a hipótese de que alterações no momento do fechamento do tubo neural poderiam estar envolvidas com o desenvolvimento de TEA. Baseado nisso, eles testaram um modelo animal com exposição pré-natal ao VPA nos dias embrionários 11,5, 12 e 12,5, que corresponde ao período de formação dos nervos cranianos e fechamento do tubo neural, e observaram alterações anatômicas semelhantes às encontradas em indivíduos com TEA (RODIER et al., 1996).

A ideia de utilizar o VPA surgiu da frequente incidência de características do tipo autista em crianças com a Síndrome Fetal do Valproato (CHRISTIANSON; CHESLER; KROMBERG, 1994; WILLIAMS et al., 2001; WILLIAMS; HERSH, 1997). Em seguida, o grupo de Tomasz Schneider validou o modelo de exposição pré-natal ao VPA no dia embrionário 12,5 (E12,5), o qual apresentou diversas características comportamentais e neurais comuns àquelas encontradas em indivíduos com autismo, tais como a presença de comportamentos estereotipados/repetitivos e déficits no comportamento social (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). Diversas alterações neurais são encontradas no TEA, como prejuízo no balanço excitatório/inibitório (NELSON; VALAKH, 2015) e alterações sinápticas (ROULLET; LAI; FOSTER, 2013). Dentre as regiões encefálicas mais comumente afetadas no TEA destacam-se o córtex pré-frontal, a amígdala e o cerebelo (AMARAL; SCHUMANN; NORDAHL, 2008). Além disso, alterações imunológicas podem estar presentes, como ativação microglial e astrocítica, resposta inflamatória aumentada frente a estímulos e

alterações no balanço de citocinas pró-inflamatórias (GESUNDHEIT et al., 2013). Um modelo animal precisa apresentar alguns critérios para que seja considerado adequado, caracterizando as validades de face e construto. A validade de face indica que o modelo animal reproduz os sintomas e alterações análogas às observadas na patologia humana. A validade de construto indica que o modelo animal tem as mesmas alterações biológicas que desencadeiam a patologia no humano (mutação gênica por exemplo) (SILVERMAN et al., 2010). Portanto, o modelo animal de autismo baseado na exposição pré-natal ao VPA apresenta essas validades, garantindo seu uso como metodologia no estudo do TEA (CRAWLEY, 2007).

1.1.5. MicroRNA e seu envolvimento com TEA

MicroRNA (miRNA) são pequenos RNA não-codificantes com 19 a 25 nucleotídeos que atuam como reguladores pós-transcricionais de diversos componentes da maquinaria intra e extracelular, sendo elementos essenciais no controle de diversos processos celulares durante o desenvolvimento e na fase adulta. Diversos miRNA já foram relacionados a variadas doenças como Alzheimer, Huntington e câncer (DE SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; LEVA; CALIN; CROCE, 2006). Os miRNA são gerados a partir de genes específicos que são transcritos pela enzima polimerase II na forma de um longo miRNA primordial (pri-miRNA) com várias estruturas em grampo. O longo pri-miRNA é clivado no núcleo pelo complexo microprocessador (formado pela endonuclease do tipo RNase III, *Drosha*, e seu cofator, a proteína DiGeorge Syndrome Critical Region 8, DGCR8), liberando o miRNA precursor (pré-miRNA) com estrutura mais curta em forma de grampo. O pré-miRNA é exportado do núcleo ao se complexar com a exportina-5 e liberado no citosol (HA; KIM, 2014). Em seguida o pré-miRNA é clivado pela enzima *Dicer*, outra endonuclease do tipo RNase III, resultando em um duplex (miRNA:miRNA*). A proteína Argonauta 2 (AGO2) cliva esse duplex, liberando o miRNA* que, devido à sua instabilidade, é degradado, enquanto o miRNA é incorporado ao complexo RISC (do inglês *RNA-induced Silencing Complex*) (BARTEL, 2004).

O mecanismo de ação dos miRNA dependerá da complementaridade de bases entre essas moléculas e a região 3'UTR do seu RNA mensageiro (RNAm) alvo. O complexo RISC:miRNA promove a degradação através das proteínas AGO se o

pareamento de bases for perfeito. No caso de o pareamento de bases não ser perfeito, pode ocorrer a desestabilização do RNAm e posterior clivagem das caudas poli(A) na extremidade 3' e CAP na extremidade 5'; ou pode ocorrer o bloqueio da tradução ribossomal, impedindo a tradução deste transcrito (BARTEL, 2009; SONG; TUAN, 2006).

Os miRNA são abundantes no sistema nervoso central (SNC), sendo que alguns são específicos do cérebro ou de outras regiões encefálicas. Eles são sensíveis à atividade neuronal e também podem modula-la (CAO; LI; CHAN, 2016). Os miRNA também estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso, na manutenção do fenótipo neuronal e na diferenciação celular. Além disso, podem ser expressos em dendritos e espinhos dendríticos, a exemplo do miR-134 e miR-132, que regulam negativamente o tamanho de espinhos dendríticos (SCHRATT et al., 2006), assim como participam do desenvolvimento sináptico (SIM; BAKES; KAANG, 2014).

Evidências apontam para o envolvimento do miR-132 em processos de memória e aprendizado, que envolvem a plasticidade sináptica (WANG et al., 2013). Alguns miRNA se mostraram necessários para o crescimento e orientação axonal, a exemplo do miR-132, miR-124 e miR-218. O miR-134, por sua vez, está envolvido com manutenção e proliferação de progenitores neurais (CAO; LI; CHAN, 2016). Um estudo *in vitro* mostrou que o miR-146a influencia o sistema excitatório ao reprimir o RNAm de GRIA3 (que codifica a subunidade do receptor AMPA) e RNAm de KCNK2 (que codifica um tipo de canal de potássio, fundamental para excitabilidade neuronal) (NGUYEN et al., 2016). O miR-195 regula a expressão de BDNF, um importante fator que influencia diversos mecanismos do sistema nervoso (MELLIOS et al., 2008), bem como de receptores de serotonina (BEVERIDGE et al., 2010).

Essas funções atribuídas aos miRNA podem estar relacionadas com as alterações encontradas em pacientes com TEA e em modelos animais, o que pode estar ligado às alterações de diversos componentes envolvidos nas funções cerebrais e no neurodesenvolvimento. Estudos anteriores mostram níveis alterados de miRNA em sangue e tecidos encefálicos *postmortem*, como o córtex cerebelar de pacientes com TEA, bem como em cultura de células linfoblastoides (ABU-ELNEEL et al., 2008; ANDER et al., 2015; MUNDALIL VASU et al., 2014; SARACHANA et al., 2010). No

entanto, estes estudos mostram que há uma heterogeneidade na expressão de miRNA nas variadas amostras de pacientes com autismo.

Importante ressaltar que há apenas um estudo analisando o perfil de expressão de miRNA em modelo animal de TEA, o qual apresentou um aumento de miR-181c e miR-30d na região da amígdala no modelo induzido por VPA (OLDE LOOHUIS et al., 2015). Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa está procedendo a análises de perfis de miRNA em sangue de pacientes com TEA e em diversos tecidos do modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA.

1.1.6. Cerebelo e TEA

O cerebelo situa-se dorsalmente ao encéfalo na parte posterior do tronco cerebral. Há uma divisão anatômica ampla que compreende a *vermis*, no centro, e os hemisférios laterais. O cerebelo é constituído pelo córtex foliado - segregado em camadas que incluem a camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular - que envolve o núcleo cerebelar, onde estão os núcleos profundos. Os núcleos profundos são responsáveis pelas principais eferências do cerebelo (LETO et al., 2015). Tradicionalmente, o cerebelo tem suas funções estabelecidas nas atividades motoras, como coordenação motora adaptativa aos estímulos ambientais, manutenção postural e equilíbrio (SAAB; WILLIS, 2003). As primeiras evidências do envolvimento do cerebelo em funções cognitivas e afetivas, surgiram a partir de estudos de caso que receberam a denominação de Síndrome Cerebelar Cognitiva Afetiva (SCHMAHMANN; SHERMAN, 1998). Desde então, diversos estudos com ressonância magnética funcional revelaram que o cerebelo tem participação ativa no processamento afetivo, que envolve interação social, estando interconectado com regiões límbicas (BAUMANN; MATTINGLEY, 2012).

Já foi relatado em um estudo por imagem, que na maior parte dos casos de autismo analisados há hipoplasia da *vermis* cerebelar (nos lóbulos VI e VII) (COURCHESNE et al., 1994). Essa alteração pode estar correlacionada com achados de outros estudos em pacientes com TEA que demonstram envolvimento da *vermis* com comunicação e aspectos motores (WEBB et al., 2010).

Como já mencionado, o cerebelo regula funções motoras e não-motoras e, ainda, tem influência sobre as áreas pré-motora, pré-frontal e parietal do córtex cerebral via circuitos do tálamo e dos gânglios basais, atuando sobre funções como linguagem, emoções e cognição (BUCKNER et al., 2011), estando essa circuitaria alterada em pacientes com TEA (CRIPPA et al., 2016). Indivíduos com condições patológicas do cerebelo, como hipoplasias, atrofas cerebelares e Síndrome de Joubert (OZONOFF et al., 1999) apresentam elevada incidência de TEA e comportamentos do tipo autista (PARISI; DOBYNS, 2003).

Algumas alterações motoras observadas em crianças com desordens cerebelares também são encontradas em crianças com TEA, tais como apraxia motora, problemas no tônus muscular e alterações oculomotoras (TSAI, 2016). A literatura também relata alterações na conectividade intracerebelar e entre o cerebelo e as outras estruturas encefálicas em pacientes com TEA (KHAN et al., 2015). Também há relatos de alterações histológicas como mudanças na forma, no número e no volume das células de Purkinje cerebelares em pacientes com TEA e no modelo animal (INGRAM et al., 2000). Todas essas observações mostram o importante envolvimento do cerebelo na patofisiologia do TEA.

Observando esses dados da literatura, nós consideramos a hipótese de que algumas alterações encontradas no cerebelo de indivíduos com TEA poderiam estar sendo moduladas por miRNA possivelmente alterados neste transtorno. Sendo assim, esse trabalho se propõe analisar a expressão relativa de um conjunto de miRNA no cerebelo do modelo animal de TEA e buscar alvos possivelmente envolvidos com a sua patofisiologia.

1.2. JUSTIFICATIVA

Dada a limitação no estudo de sistema nervoso central de pacientes com TEA, o uso de um modelo animal torna-se fundamental para se estudar os mecanismos envolvidos na patofisiologia deste transtorno. O nosso grupo de pesquisa estuda o TEA desde 2008, a partir de estudos com soro de pacientes e por avaliações comportamentais e moleculares em um modelo animal induzido por VPA sob uma ótica translacional. Levando em conta as alterações encontradas nos níveis de miRNA em tecidos encefálicos *postmortem* de pacientes com TEA, se justifica a importância de uma análise dos níveis de miRNA no sistema nervoso central no modelo animal de autismo. Este trabalho propõe a análise da expressão de miRNA no cerebelo, para contribuir com um projeto maior que visa analisar a expressão dos miRNA em sangue e sistema nervoso central no modelo animal de TEA.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão relativa de um conjunto de miRNA no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA e relacionar seus RNA mensageiros alvos com possíveis alterações encontradas no TEA.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a expressão relativa de 16 miRNA previamente selecionados no cerebelo de ratos de 30 dias do modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA.

b) Realizar uma busca por transcritos alvos de miRNA alterados que possam estar envolvidos direta ou indiretamente com as alterações observadas no TEA.

2. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

(formatado de acordo com as regras do periódico *Journal of Molecular Biology* disponível no anexo 1)

Analysis of microRNA Expression in Cerebellum of Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid

Gabriela Staevie^{1,2}, Mauro Mozael Hirsch^{1,2}, Victorio Bambini-Junior^{2,3,4}, Rogerio Margis⁵, Carmem Gottfried^{1,2}

¹ Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Translational Research Group in Autism Spectrum Disorder (GETTEA)

³ Laboratory of Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Avenue Brasil 4365, 21045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ School of Pharmacy and Biomedical Science, University of Central Lancashire, Fylde Rd, PR1 2HE, Preston, Lancashire, England

⁵ Centre of Biotechnology, Building 43431, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, P.O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence address:

Gabriela Zanotto Staevie

Email: gsgabi2@hotmail.com

Department of Biochemistry

Institute of Health's Basic Science

Federal University of Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600

90035-003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL

Fax: +55 51 33085540 Phone: +55 51 33085551

carmem.gottfried@gmail.com

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) involves a complex interplay of both genetic and environmental risk factors, such as prenatal exposure to valproic acid (VPA). Severe functional and structural alterations are present in cerebellum of ASD patients and animal models. Also, there are studies showing alterations of microRNA (miRNA) levels in both blood and *postmortem* brain samples from ASD patients, making this approach an important tool in the ASD pathophysiology understanding. The aim of this study was to evaluate the expression profile of miRNA levels in cerebellum from animal model of autism by prenatal exposure to VPA. The levels of miR-132 (p=0.0149) and miR-181a (p=0.0417) were elevated in VPA group. miR-132 present a key role in neuronal network and has the MECP2 mRNA as a validated target that is altered in ASD and is essential to neurodevelopment. miR-181a has the BCL2 mRNA as a validated target that are altered in ASD and could be involved with apoptosis dysregulation in ASD. These miRNA have high specificity and cross-validated utility as a potential screening tool for ASD.

Highlights

- ASD is a neurodevelopmental disorder that affect multiple brain areas including cerebellum and present several altered miRNA in brain *postmortem* and blood samples of ASD patients.
- miR-132 and miR-181a were found increased in cerebellum of VPA model of autism compared with control.
- miR-132 and miR-181a have validated targets MECP2 and BCL2 mRNA respectively both in humans and rats.
- The validated targets are involved with neuronal network relevant to ASD.

Keywords: ASD, VPA model, microRNA, MECP2, BCL2, FXR1

Abbreviations

ASD – Autism Spectrum Disorder

VPA – Valproic Acid

miRNA – microRNA

CNS – Central Nervous System

Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is characterized by deficits in social behavior and communication, and restricted and repetitive behaviors (DSM-5)[1]. Beyond of core symptoms, there are many comorbidities associated including epilepsy, mental retardation, anxiety and mood-disorders. Epidemiological studies indicate that prenatal exposure to valproic acid (VPA) is a recognized risk factor for ASD, especially in the first trimester of pregnancy [2,3]. Thus, a rodent model of ASD induced by exposure of fetuses to VPA on the 12.5th day of gestation is an interesting and useful model for elucidating ASD pathophysiology [4,5].

The behavioral complexity of ASD is characterized by repetitive behavior, social and communication impairments and altered sensory functions. It suggests the involvement of alterations in multiple brain areas including limbic system, cortex, and the cerebellum [6,7]. Cerebellar neuropathology commonly occurs in ASD individuals. ASD postmortem brains studies relate molecular, morphological and functional alterations, as well as reduction in cells number and size in both cerebellar nuclei and cortex [8]. Structural magnetic resonance imaging shows a presence of hypoplasia cerebellar in patients [9]. Besides, evidence for oxidative stress in the cerebellum of ASD patients [10]. The VPA animal model reproduces several of these alterations [11–13].

MicroRNA (miRNA) are small noncoding RNA that act as regulators of mRNA translation and subsequent protein levels, resulting in regulation of many biological processes. Several miRNA have a role in some neurological diseases such as Tourette's Syndrome and Fragile-X Syndrome [14]. These molecules are abundant in brain, modulating many facets of the immunologic system, brain development and embryogenesis, synaptic plasticity, neurogenesis and synaptogenesis [15–17]. Thus, the functions attributed to miRNA overlap with the alterations found in the autism brain including growth abnormalities [18], delays and disorganization in neuronal and neural maturation, impairments in dendritic arborization in pyramidal neurons during infancy [19], as well as impairments in dendritic spines and synaptogenesis [20]. Several analyses of blood samples [21,22] and *postmortem* autistic brain, including cerebellar cortex show alterations on expression of miRNA [23,24]. In rodents, a study shows alteration in miRNA expression in VPA animal model in the amygdala [25] evidencing

the necessity of the cerebellar analysis in VPA animal model of autism, given the lack of data. Dereglulation of miRNA levels might contribute to the ASD features, as cause and/or consequences of the trigger. Thus, the aim of this work was to investigate the expression level of selected miRNA in cerebellum from VPA animal model of autism, as well as to search validated and predicted targets of the altered miRNA and explore their relevance to autism.

Results

The PCR efficiencies for standard curves based on single data points were above 1.77. The melt curves of each miRNA to both positive and respective negative control show only one peak of melting temperature of PCR products, demonstrating the absence of non-specific annealing in presence of cDNA input. This observation was confirmed by a unique band in agarose gel for each miRNA with cDNA input (supplementary material, figure S1 and S2). Using geNorm software we employed an analysis to determine the appropriate number of control miRNA and we used a cutoff of pairwise variation of 0.15, which resulted in number of two miRNA for normalization (figure 1A). Then the most stables miRNA analyzed throughout correlation of average expression stability values were miR-125a and miR-181b (figure 1B), which were used to evaluate the relative expression of 14 other miRNA between the VPA and control groups.

As showed in Figure 2, there is an increased relative expression of miR-132 ($p=0.0149$) and miR-181a ($p=0.0417$) in VPA group. miRNA that did not show differences between VPA and control groups are presented in the supplementary material, figure S3. A search for targets in databanks showed a variety of targets to miR-132 and miR-181a. We investigated particularly targets that have been previously described to be changed in ASD. Targets selected due to the ASD influence are listed in Table 2. Targets for miR-132: *Itga9*, *Fxr1* and *Mmp16* a (predicted in rats); *SIRT1* and *BDNF* (validated in humans); *Pten* and *Mmp9* (validated in rats); and *FXR1* and *MECP2* (validated to both rat and human). Targets for miR-181a: *Bcl2*, *Il1a*, *Fxr1*, *Nrg2*, *Gria2* and *Creb1* (predicted in rats); *BCL2*, *IL1A*, *BDNF* and *SIRT1* (validated in humans); and *Gria2* (validated in rats).

Discussion

We performed a search for mRNA targets of miR-132 and miR-181a. Some of these targets are involved in a range of processes, including regulation of development and function of nervous and immunological system, many of which are altered in ASD.

It was demonstrated that miR-132 is enriched in mouse and human brain tissues and plays a role in neurogenesis and neuronal differentiation [16,26]. Moreover, miR-132 is expressed in dendritic spines and are involved in synaptic plasticity [27] that are altered in ASD. One validated target for miR-132 in both human and rat is *MECP2* (Table 2), that encodes the methyl-CpG binding protein 2 (MECP2). It was already demonstrated that a transgenic mice overexpressing miR-132 exhibited enhanced neuronal spine density and a decreased expression of MECP2 protein in brain tissues [28]. Thus, we believe that an increase of miR-132 could implicate impairments of these functions in our animal model, leading to some of these alterations observed in ASD. In fact, it was demonstrated in neuronal culture [29] and *in vivo* experiments [28] that increased levels of miR-132 downregulates MECP2 protein levels. Also, the *postmortem* evaluation of brain from ASD patients indicates that the level of MECP2 protein is decreased in cortex [30,31], highlighting the involvement of miR-132 in ASD pathophysiology.

MECP2 is a member of a family of proteins that specifically bind to methylated DNA sequences in the genome promoting expression or repression of genes by altering reversibly the chromatin [32]. Mutation or loss of function of this component have been related to severe neurodevelopmental disorders such Rett Syndrome, which presents autistic-like behavior [33]. Moreover, MECP2 protein has a pivotal role in brain development by supporting and repressing synapses, and also presents neurodevelopment-dependent expression, with low expression in early postnatal stages and increasing expression over the course of postnatal neuronal development [34,35]. The increased expression of miR-132, observed in VPA group, could be involved in MECP2 decrease observed in ASD patients, leading to neurodevelopmental impairments. In addition, miR-132 can be involved in BDNF alterations observed in peripheral tissues from ASD patients [36], decreased dendritic spine density and neuronal morphologies alterations [30] (Figure 3). These alterations could be involved with abnormal connectivity found in cerebellum and other cerebral regions.

Another important target of miR-132 is the *Fxr1* transcript. It is still unknown how the *FXR1* gene contributes to the autistic features, but the absence of this gene impacts neural development, synapse formation, plasticity [37] and glutamatergic signaling in hippocampus [38] and all these function are impaired in ASD. Besides, mutations of *FXR1* gene are related to fragile X syndrome, that share many symptoms with ASD and have an incidence of autism as comorbidity [39], showing the involvement of both *FXR1* gene and protein levels with ASD. Thus, the putatively decreased protein levels of FXR1 through miR-132 action could lead some impairments observed in ASD. It is necessary to investigate FXR1 protein levels to explore the relation with increased levels of miR-132.

Another miRNA with several targets putatively involved in ASD is the miR181a. Between these targets, we found IL1a and SIRT1, which are involved in immunological system that are known altered in ASD [40,41]. Furthermore, miR-181a was related with angiogenesis [42–44], a feature which was reported enhanced in ASD patients childhood and adult in *postmortem* cerebellum and others brain regions [44].

One target of miR-181a related to autism is *Bcl2* mRNA, which encodes the BCL2 anti-apoptotic protein. The BCL2 protein inhibit the apoptotic through caspases pathway and P53, leading to cell survival [45,46]. The increased expression of miR-181a observed in cerebellum from VPA group could decrease BCL2 protein levels as observed in cortex and cerebellum from autistic subjects [47]. In addition to this, it was reported that P53, a known proapoptotic protein, is increased in cortex from *postmortem* brain [47–49], suggesting a dysfunction in apoptotic pathway. These findings could underlie the loss of granular and Purkinje cells in cerebellum and cerebellar hypoplasia found in ASD (Figure 4).

A previous study with *postmortem* brain samples from autistic subjects performed an analysis of miRNA in cerebellar cortex, showing heterogeneity in the pattern of miRNA levels between ASD samples, which difficult interpretation[21]. Nevertheless, some ASD subjects presented decreased levels of miR-23a, miR-181b and miR-132 and increased level of miR-106b. In a study using lymphoblastoid cell lines of ASD patients presented variability in miR-199a expression, in addition to up-regulated levels of miR-181a and miR-181b compared to their sibling as control [50].

A serum miRNA profiles evaluation in children with autism demonstrated increased levels in miR-106b and decreased levels of miR-23a [22]. However, another study with lymphoblastoid cell lines found an up-regulation of miR-23a and down-regulation of miR-106b levels [51]. These data illustrate contradictions among several studies about the levels of miRNA in ASD samples. We have to consider that these studies have employed different sample tissues, besides different individuals with a large variation in age, symptoms and comorbidities associated. These contradictory results also reflect the variability of the spectrum.

In summary, we demonstrate for the first time, alterations of two miRNA in cerebellum from VPA autism model, highlighting an important group of potential targets to further investigation in ASD pathophysiology.

Materials and methods

Animal model prenatally exposed to VPA

Procedures were performed according to the established protocol [52]. Briefly, females and males Wistar rats from the local breeding colony (ICBS-Federal University of Rio Grande do Sul), were mated overnight. Pregnancy was determined by the presence of spermatozooids in vaginal fluid of rats in the morning, which was considered the day 0 of gestation (E0). VPA (Acros Organics, NJ, USA) was dissolved in 0.9% saline for a concentration of 250 mg/mL. Females received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg of VPA or physiological saline on E12.5. After weaned at 21 days old, only males offspring were kept in the litter. Cerebellar structures were obtained after deep anesthesia and euthanasia from males at postnatal day 30 and immediately homogenized with Trizol® (Ambion, USA) for downstream applications. The experimental groups consisted of one animal per litter being used five litters per group. They were handled in accordance to the governmental and Brazilian Experimental Biology Societies Federation guidelines.

RNA Extraction and RT-qPCR Procedure

After samples homogenization with Trizol®, chloroform was added to perform phase separation, and RNA was precipitated from the upper aqueous layer using isopropanol. The precipitated RNA was washed with ethanol to remove impurities, and

ressuspended in RNase-free water and stored at -80°C . The concentration and purity of the RNA was assessed using a spectrophotometer (Eppendorf, USA) and only those samples with A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} index more than 1.70 were used.

Mature miRNA expression was evaluated by reverse transcriptase followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) [53]. The 16 miR were selected according to their relevance to synaptic structural, functional plasticity and possible molecular alterations in ASD [54], as well as miRNA with dysregulated levels in both blood and *postmortem* brain from autistic subjects. All mature miRNA sequences were obtained of miRBase [55] (<http://www.mirbase.org/>) and the miRNA primers were designed to annealing temperature of 60°C using an online calculator (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) according to Kramer [56]. All primers sequences used are available in Table 1.

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from mature miRNA using reverse transcriptase reaction containing 2 μg of total RNA, 1 μL of 10 mM dNTP mix (Invitrogen, USA), 3 μL of stem loop RT primer mix (Sigma-Aldrich, USA) (Table 1), 4 μL M-MLV reverse transcriptase 5X reaction buffer (Invitrogen, USA), 2 μL of 0.1 M DTT (Invitrogen, USA), 1 μL of RNase inhibitor (Ludwig Biotech, Brazil), 1 μL of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and RNase-free water to a final volume of 20 μL . The reaction was completed after a sequence of three incubations at 65°C for 5 min, 37°C for 50 min and 70°C for 15 min.

The quantitative PCR mix was formed by 2 μL of 5 μM specific miRNA forward and universal reverse primer mix (Sigma-Aldrich, USA) (Table 1), 12 μL of cDNA (1:33), 2.4 μL of 10X PCR buffer (Invitrogen, USA), 0.8 μL of 50 mM MgCl_2 (Invitrogen, USA), 2 μL of 1X SYBR Green[®] (Molecular Probes, USA), 0.5 μL of 10 μM dNTP mix, 0.1 μL of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) and RNase-free water to a final volume of 24 μL . The fluorescence of SYBR Green[®] was used to detect amplification, estimate Ct values and to determine specificity after melting curve analysis. PCR cycling conditions were standardized to 95°C for 5 min followed by 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 10 s. After the main amplification, sample fluorescence was measured from 60°C to 95°C , with an increasing ramp of 0.3°C each, in order to obtain the denaturing curve of the amplified products, to assure their homogeneity after peak detection, and T_m estimation using data obtained from a StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

The PCR products were confirmed with 3% agarose gel. The samples were subjects to horizontal electrophoresis on 1x TBE (Tris, boric acid, EDTA) buffered solution in presence 1x SYBR[®] Safe (Invitrogen, USA) for 50 min and 100 V. The gels were illuminated with UV light (302 nm) transilluminator and digitally recorded (Gelliance 200[™], Perkin Elmer[®], USA). Considering the result of stem-loop primer and miRNA pairing [56] the amplicon size expected was approximately 70pb length.

Data analysis

The RT-qPCR results were imported to Microsoft Excel and the geNorm algorithm was used to assess the variance in expression levels and to evaluate the expression stabilities of set of 16 miRNA analyzed. A pairwise variation analysis was performed by geNorm to determine the number of control miRNA required for accurate normalization [57].

The PCR efficiencies were calculated from the slope of the amplification curve by exponential amplification analysis using the LinRegPCR algorithm [58]. The relative expressions of miRNA were calculated considering the PCR efficiencies and the $-\Delta\Delta C_t$ values for each miRNA, accordingly methodology previously described [59]. To account for possible differences in expression levels of miRNA between groups, statistical analysis was performed in GraphPad by T-Student's test and p-values less than 0.05 were considered significant.

Next, we perform a search for mRNA targets in human and in rat of miR-132 and miR-181a. To looking for validated targets was used the *miRTarBase* (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) [60], and to predicted targets was used TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71/) [61] and MiRDB (<http://www.mirdb.org/miRDB/>) [62].

Figures and tables

Table 1. List of forward (F), stem loop (SL) and universal reverse primers sequences used for RT-qPCR analysis.

ID mature miRNA	ID accession		Primers sequences
miR-132	MIMAT0000838	F	TCCGGCTAACAGTCTACAGCCA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGACCA
miR-138	MIMAT0000844	F	TCCGGAAGCTGGTGTGTGAATC
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGGCCT
miR-125a	MIMAT0000829	F	GTCGCGATCCCTGAGACCCTTTA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAG
miR-195	MIMAT0000870	F	GGGCGCTAGCAGCACAGAAATA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCCAAT
miR-106b	MIMAT0000825	F	GGGCGCTAAAGTGCTGACAGT
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATCTGC
miR-199a	MIMAT0000872	F	GATGCGCCAGTGTTCAGACT
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGAACAG
miR-134	MIMAT0000840	F	GGCTCTTGTACTGGTTGACCA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCCTC
miR-124	MIMAT0000828	F	CTAGCTTAAGGCACGCGGTGA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGCATT
miR-181a	MIMAT0000858	F	GCGCTGAACATTCAACGCTGTC
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTCAC
miR-181b	MIMAT0000859	F	GCTGCGCAACATTTCATTGCTGTC
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACCCAC
miR-25	MIMAT0000795	F	TCAGCACATTGCACTTGTCTCGG
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAGAC
miR-21	MIMAT0000790	F	CCGGCGCTAGCTTATCAGACTGAT
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR-23a	MIMAT0000792	F	GCTGTCATCACATTGCCAGGGA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAAAT
miR-146a	MIMAT0000852	F	CGTGCGTGAGAAGTGAATTCCA
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCCA
miR-218a	MIMAT0000888	F	GCCGTCCTTGTGCTTGATCTAACC
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACATGG
miR-30c	MIMAT0000804	F	GCGTCGCTGTAACATCCTACTC
		SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCTGAG
Reverse Universal			CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

Table 2. Predicted and validated targets for miR-132 and miR-181a in human (h) rats (r) and both humans and rats (h,r).

miRNA	Validated targets	Predicted targets
miR-132	<i>SIRT1</i> (h), <i>BDNF</i> (h), <i>FXR1</i> (h,r), <i>MECP2</i> (h,r), <i>FOXO3</i> (h,r), <i>Pten</i> (r), <i>Mmp9</i> (r)	<i>Itga9</i> (r), <i>Fxr1</i> (r), <i>Mmp16</i> (r)
miR-181a	<i>BCL2</i> (h), <i>IL1A</i> (h), <i>BDNF</i> (h), <i>SIRT1</i> (h), <i>Gria2</i> (r),	<i>Bcl2</i> (r), <i>Il1a</i> (r), <i>Fxr1</i> (r), <i>Gria2</i> (r), <i>Creb1</i> (r)

SIRT1: sirtuin 1, *BDNF*: brain derived neurotrophic factor, *FXR1*: FMR1 autosomal homolog 1, *MECP2*: methyl-CpG binding protein 2, *FOXO3*: forkhead box O3, *Pten*: phosphatase and tensin homolog, *Mmp9, 16*: matrix metalloproteinase 9 and 16, *BCL2*: B-cell lymphoma 2, *IL1A*: interleukin 1 alpha, *Gria2*: Glutamate ionotropic receptor AMPA 2, *Itga9*: Integrin subunit alpha 9, *Creb1*: CAMP responsive element binding protein 1.

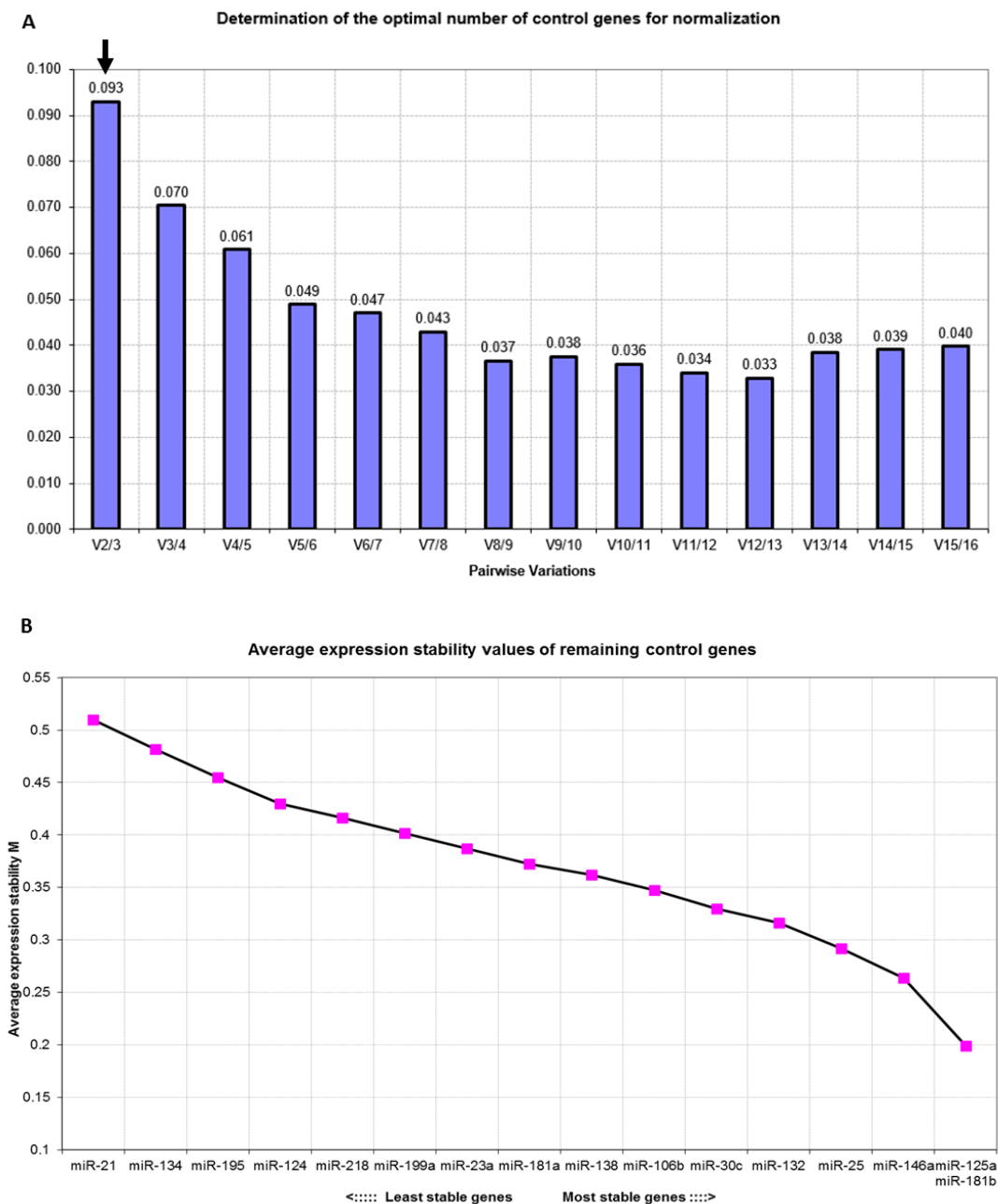


Figure 1. Determination of the optimal number of control genes for normalization. (A) Pairwise variation analysis between miRNA to determine the number of control miRNA required for accurate normalization (black arrow = optimal number of control genes for normalization). (B) Analysis of average expression stability of miRNA analyzed, showing that miR-125a and miR-181b are the most stable miRNA.

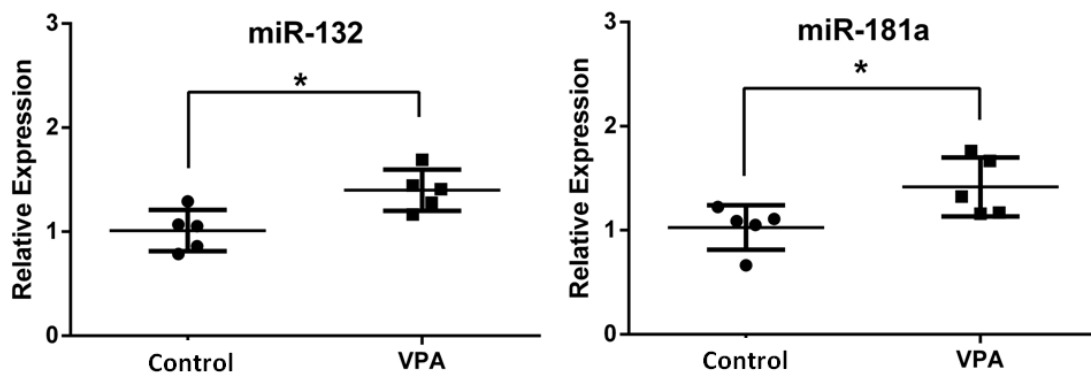


Figure 2. Increased levels of cerebellar miR-132 and miR-181a in VPA group . (A) miR-132 control (1.012 ± 0.08841) and VPA (1.398 ± 0.08828) $p=0.0149$. (B) miR-181a control (1.027 ± 0.09548) and VPA (1.416 ± 0.1260) $p=0,0417$.

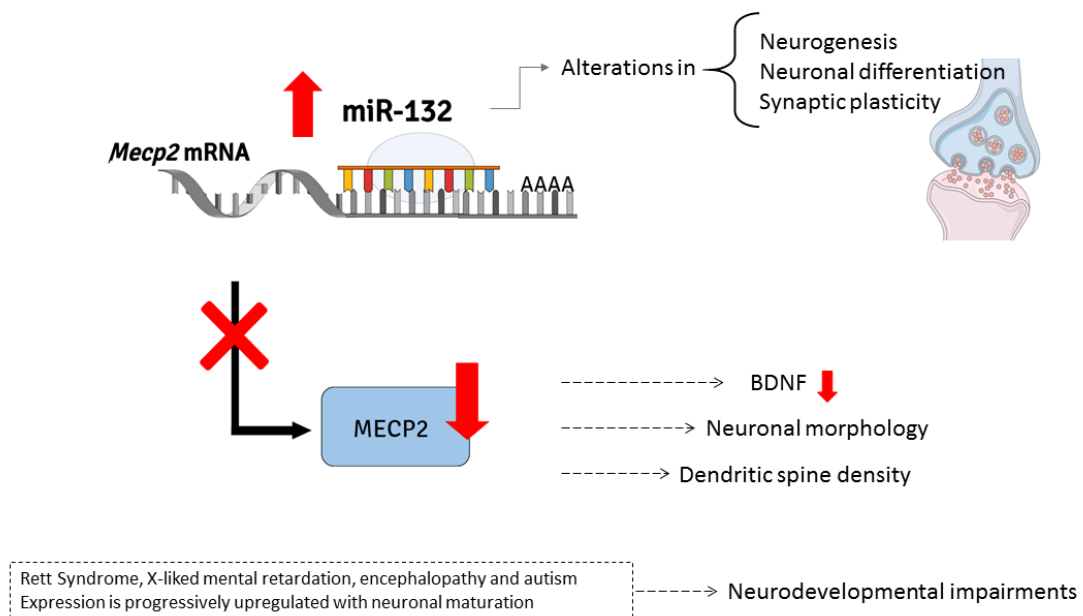


Figure 3. MeCP2 as a target of miR-132 modulating several neuronal function. Adapted from Lyu et al., 2016. MECP2: methyl-CpG binding protein 2, BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor.

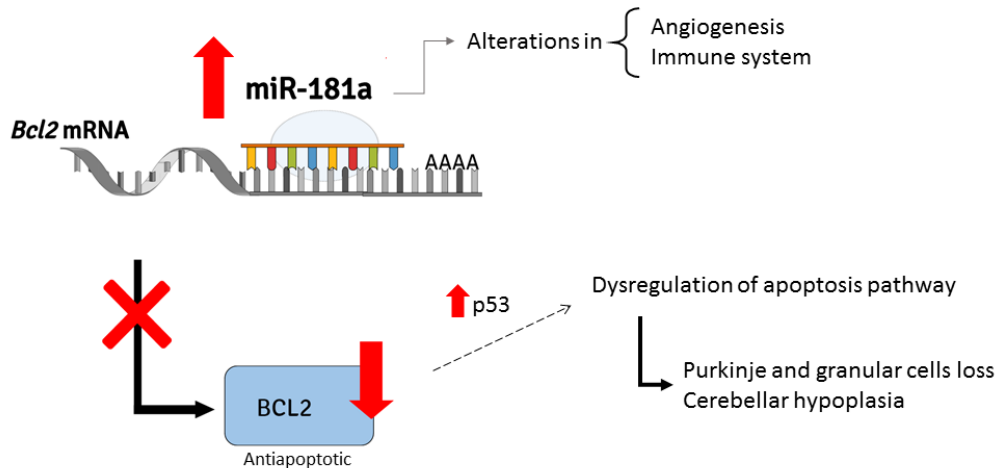


Figure 4. Bcl2 as a target of miR-181a modulating apoptosis pathway. BCL2: B-cell lymphoma 2, p53: cellular tumor antigen p53.

Acknowledgments

This work was supported by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Institute of Science and Technology in Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), and Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- [1] American Psychiatric Association, No Title, in: Diagnostic Stat. Man. Ment. Disord., 5th ed., 2013. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- [2] R.L. Bromley, J. Clayton-Smith, Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs, *Neurology*. 73 (2009) 997. doi:10.1212/WNL.0b013e3181af0b95.
- [3] J. Christensen, Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders, 309 (2014).
- [4] V. Bambini-Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, J.C.F. Moreira, R. Riesgo, C. Gottfried, Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate:

- behavioral changes and liver parameters., *Brain Res.* 1408 (2011) 8–16. doi:10.1016/j.brainres.2011.06.015.
- [5] V. Bambini-Junior, G. Zanatta, G. Della Flora Nunes, G. Mueller de Melo, M. Michels, M. Fontes-Dutra, V. Nogueira Freire, R. Riesgo, C. Gottfried, Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid, *Neurosci. Lett.* 583 (2014) 176–181. doi:10.1016/j.neulet.2014.09.039.
- [6] J. a. Chen, O. Peñagarikano, T.G. Belgard, V. Swarup, D.H. Geschwind, The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 10 (2015) 111–144. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040405.
- [7] C.J. Stoodley, J.D. Schmahmann, Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing, *Cortex.* 46 (2010) 831–844. doi:10.1016/j.cortex.2009.11.008.
- [8] T.D. Rogers, E. McKimm, P.E. Dickson, D. Goldowitz, C.D. Blaha, G. Mittleman, Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research., *Front. Syst. Neurosci.* 7 (2013) 15. doi:10.3389/fnsys.2013.00015.
- [9] M.M. Ismail, R.S. Keynton, M.M.M.O. Mostapha, A.H. Eltanboly, M.F. Casanova, G.L. Georgy, A. El-Baz, Studying Autism Spectrum Disorder with Structural and Diffusion Magnetic Resonance Imaging: A Survey, *Front. Hum. Neurosci.* 10 (2016) 1–42. doi:10.3389/fnhum.2016.00211.
- [10] E.M. Sajdel-Sulkowska, M. Xu, W. McGinnis, N. Koibuchi, Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD), *Cerebellum.* 10 (2011) 43–48. doi:10.1007/s12311-010-0223-4.
- [11] M.G. Codagnone, M.F. Podestà, N.A. Uccelli, A. Reindl, Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism, *Dev. Neurosci.* (2015). doi:10.1159/000375489.
- [12] J.L. Ingram, S.M. Peckham, B. Tisdale, P.M. Rodier, Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism., *Neurotoxicol. Teratol.* 22 (2000) 319–24. doi:10.1016/S0892-0362(99)00083-5.
- [13] P.T. Tsai, Autism and cerebellar dysfunction: Evidence from animal models, *Semin. Fetal Neonatal Med.* (2016) 1–7. doi:10.1016/j.siny.2016.04.009.
- [14] A.M. Gurtan, P.A. Sharp, The role of miRNAs in regulating gene expression networks, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 3582–3600. doi:10.1016/j.jmb.2013.03.007.
- [15] K.S. Kosik, The neuronal microRNA system., *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 911–920. doi:10.1038/nrn2037.
- [16] L. Song, R.S. Tuan, MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development, *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 78 (2006) 140–149. doi:10.1002/bdrc.20070.
- [17] C. Carissimi, V. Fulci, G. Macino, MicroRNAs: Novel regulators of immunity, *Autoimmun. Rev.* 8 (2009) 520–524. doi:10.1016/j.autrev.2009.01.008.
- [18] E. Courchesne, Brain development in autism: Early overgrowth followed by premature arrest of growth, *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 10 (2004) 106–111. doi:10.1002/mrdd.20020.

- [19] E. Courchesne, K. Pierce, Brain overgrowth in autism during a critical time in development: Implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity, *Int. J. Dev. Neurosci.* 23 (2005) 153–170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.01.003.
- [20] P. Penzes, M.E. Cahill, K. a Jones, J.-E. VanLeeuwen, K.M. Woolfrey, Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders., *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 285–293. doi:10.1038/nn.2741.
- [21] K. Abu-Elneel, T. Liu, F.S. Gazzaniga, Y. Nishimura, D.P. Wall, D.H. Geschwind, K. Lao, K.S. Kosik, Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum, *Neurogenetics.* 9 (2008) 153–161. doi:10.1007/s10048-008-0133-5.
- [22] M. Mundalil Vasu, A. Anitha, I. Thanseem, K. Suzuki, K. Yamada, T. Takahashi, T. Wakuda, K. Iwata, M. Tsujii, T. Sugiyama, N. Mori, Serum microRNA profiles in children with autism., *Mol. Autism.* 5 (2014) 40. doi:10.1186/2040-2392-5-40.
- [23] B.P. Ander, N. Barger, B. Stamova, F.R. Sharp, C.M. Schumann, Atypical miRNA expression in temporal cortex associated with dysregulation of immune, cell cycle, and other pathways in autism spectrum disorders., *Mol. Autism.* 6 (2015) 37. doi:10.1186/s13229-015-0029-9.
- [24] F. Huang, T. Zhou, X. Yao, J. Yi, F. Zhou, Z. long, X. Hou, C. Wang, Z. Chen, H. Jiang, miRNA profiling in autism spectrum disorder in China, *Genomics Data.* 6 (2015) 108–109. doi:10.1016/j.gdata.2015.08.006.
- [25] N.F.M. Olde Loohuis, K. Kole, J.C. Glennon, P. Karel, G. Van der Borg, Y. Van Gemert, D. Van den Bosch, J. Meinhardt, A. Kos, F. Shahabipour, P. Tiesinga, H. van Bokhoven, G.J.M. Martens, B.B. Kaplan, J.R. Homberg, A. Aschrafi, Elevated microRNA-181c and microRNA-30d levels in the enlarged amygdala of the valproic acid rat model of autism., *Neurobiol. Dis.* 80 (2015) 42–53. doi:10.1016/j.nbd.2015.05.006.
- [26] E. De Smaele, E. Ferretti, A. Gulino, MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders, *Brain Res.* 1338 (2010) 100–111. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.103.
- [27] P. Tognini, T. Pizzorusso, MicroRNA212/132 family: Molecular transducer of neuronal function and plasticity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 6–10. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.015.
- [28] K.F. Hansen, K. Sakamoto, G.A. Wayman, S. Impey, K. Obrietan, Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0015497.
- [29] J.-W. Lyu, B. Yuan, T.-L. Cheng, Z.-L. Qiu, W.-H. Zhou, Reciprocal regulation of autism-related genes MeCP2 and PTEN via microRNAs., *Sci. Rep.* 6 (2016) 20392. doi:10.1038/srep20392.
- [30] E.E. Smeets, K. Pelc, B. Dan, Rett Syndrome, *Mol Syndr.* 2 (2012) 113–127. doi:000337637.
- [31] R.P. Nagarajan, A.R. Hogart, Y. Gwyne, M.R. Martin, J.M. LaSalle, Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation, *Epigenetics.* 1 (2006). doi:10.4161/epi.1.4.3514.

- [32] X. Nan, A. Bird, The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome, *Brain Dev.* 23 (2016) S32–S37. doi:10.1016/S0387-7604(01)00333-3.
- [33] M.L. Gonzales, J.M. LaSalle, The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders, *Curr. Psychiatry Rep.* 12 (2010) 127–134. doi:10.1007/s11920-010-0097-7.
- [34] D. Balmer, J. Goldstine, Y.M. Rao, J.M. LaSalle, Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation., *J. Mol. Med. (Berl)*. 81 (2003) 61–68. doi:10.1007/s00109-002-0396-5.
- [35] R.C. Samaco, R.P. Nagarajan, D. Braunschweig, J.M. LaSalle, Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 629–639. doi:10.1093/hmg/ddh063.
- [36] Z. Zheng, L. Zhang, T. Zhu, J. Huang, Y. Qu, D. Mu, Peripheral brain-derived neurotrophic factor in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis., *Sci. Rep.* 6 (2016) 31241. doi:10.1038/srep31241.
- [37] B. Stepniak, A. Kästner, G. Poggi, M. Mitjans, M. Begemann, A. Hartmann, S. Van der Auwera, F. Sananbenesi, D. Krueger-Burg, G. Matuszko, C. Brosi, G. Homuth, H. Völzke, F. Benseler, C. Bagni, U. Fischer, A. Dityatev, H.-J. Grabe, D. Rujescu, A. Fischer, H. Ehrenreich, Accumulated common variants in the broader fragile X gene family modulate autistic phenotypes., *EMBO Mol. Med.* 7 (2015) 1565–79. doi:10.15252/emmm.201505696.
- [38] J. Zhang, L. Hou, E. Klann, D.L. Nelson, Altered hippocampal synaptic plasticity in the FMR1 gene family knockout mouse models., *J. Neurophysiol.* 101 (2009) 2572–80. doi:10.1152/jn.90558.2008.
- [39] S.J. Rogers, E.A. Wehner, R. Hagerman, The behavioral phenotype in fragile X: Symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders, *J. Dev. Behav. Pediatr.* 22 (2001) 409–417. doi:10.1097/00004703-200112000-00008.
- [40] J. Mead, P. Ashwood, Evidence supporting an altered immune response in ASD, *Immunol. Lett.* 163 (2015) 49–55. doi:10.1016/j.imlet.2014.11.006.
- [41] S. Kong, M.W. McBurney, D. Fang, Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity, *Immunol. Cell Biol.* 90 (2012) 6–13. doi:10.1038/icb.2011.102.
- [42] T.T. Bizuayehu, I. Babiak, MicroRNA in teleost fish, *Genome Biol. Evol.* 6 (2014) 1911–1937. doi:10.1093/gbe/evu151.
- [43] J. Kazenwadel, M.Z. Michael, N.L. Harvey, W. Dc, Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells, *Blood.* 116 (2011) 2395–2401. doi:10.1182/blood-2009-12-256297.
- [44] E.C. Azmitia, Z.T. Saccomano, M.F. Alzoobaee, M. Boldrini, P.M. Whitaker-Azmitia, Persistent Angiogenesis in the Autism Brain: An Immunocytochemical Study of Postmortem Cortex, Brainstem and Cerebellum, *J. Autism Dev. Disord.* 46 (2016) 1307–1318. doi:10.1007/s10803-015-2672-6.
- [45] M. Certo, V.D.G. Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S.A. Armstrong, A. Letai, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to

- antiapoptotic BCL-2 family members, *Cancer Cell*. 9 (2006) 351–365. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027.
- [46] R.J. Schloesser, J. Huang, P.S. Klein, H.K. Manji, Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder., *Neuropsychopharmacology*. 33 (2008) 110–133. doi:10.1038/sj.npp.1301575.
- [47] A.M. Sheikh, M. Malik, G. Wen, A. Chauhan, V. Chauhan, C.X. Gong, F. Liu, W.T. Brown, X. Li, BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects, *J. Neurosci. Res.* 88 (2010) 2641–2647. doi:10.1002/jnr.22416.
- [48] S.H. Fatemi, a R. Halt, J.M. Stary, G.M. Realmuto, M. Jalali-Mousavi, Reduction in anti-apoptotic protein Bcl-2 in autistic cerebellum., *Neuroreport*. 12 (2001) 929–33. doi:10.1097/00001756-200104170-00013.
- [49] M. Araghi-Niknam, S.H. Fatemi, Levels of Bcl-2 and P53 Are Altered in Superior Frontal and Cerebellar Cortices of Autistic Subjects, *Cell. Mol. Neurobiol.* 23 (2003) 945–952. doi:10.1023/B:CEMN.0000005322.27203.73.
- [50] M.M. Ghahramani Seno, P. Hu, F.G. Gwadry, D. Pinto, C.R. Marshall, G. Casallo, S.W. Scherer, Gene and miRNA expression profiles in autism spectrum disorders, *Brain Res.* 1380 (2011) 85–97. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.046.
- [51] T. Sarachana, R. Zhou, G. Chen, H.K. Manji, V.W. Hu, Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines, *Genome Med.* 2 (2010) 23. doi:10.1186/gm144.
- [52] V. Bambini-Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, J.C.F. Moreira, R. Riesgo, C. Gottfried, Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters, *Brain Res.* 1408 (2011) 8–16. doi:10.1016/j.brainres.2011.06.015.
- [53] C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 1–9. doi:10.1093/nar/gni178.
- [54] H.-I. Im, P.J. Kenny, MicroRNAs in neuronal function and dysfunction., *Trends Neurosci.* 35 (2012) 325–34. doi:10.1016/j.tins.2012.01.004.
- [55] A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 42 (2013) D68. doi:10.1093/nar/gkt1181.
- [56] M. Kramer, Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, *J. Biol. Chem.* 7 (2013) 355–62. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95.
- [57] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes., *Genome Biol.* 3 (2002) RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [58] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H. Lekanne Deprez, A.F.M. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neurosci. Lett.* 339 (2003) 62–66. doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4.

- [59] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and, *Methods*. 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [60] S.-D. Hsu, F.-M. Lin, W.-Y. Wu, C. Liang, W.-C. Huang, W.-L. Chan, W.-T. Tsai, G.-Z. Chen, C.-J. Lee, C.-M. Chiu, C.-H. Chien, M.-C. Wu, C.-Y. Huang, A.-P. Tsou, H.-D. Huang, miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions., *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D163-9. doi:10.1093/nar/gkq1107.
- [61] B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets., *Cell*. 120 (2005) 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
- [62] N. Wong, X. Wang, miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations, *Nucleic Acids Res.* . 43 (2015) D146–D152. doi:10.1093/nar/gku1104.

Supplementary materials

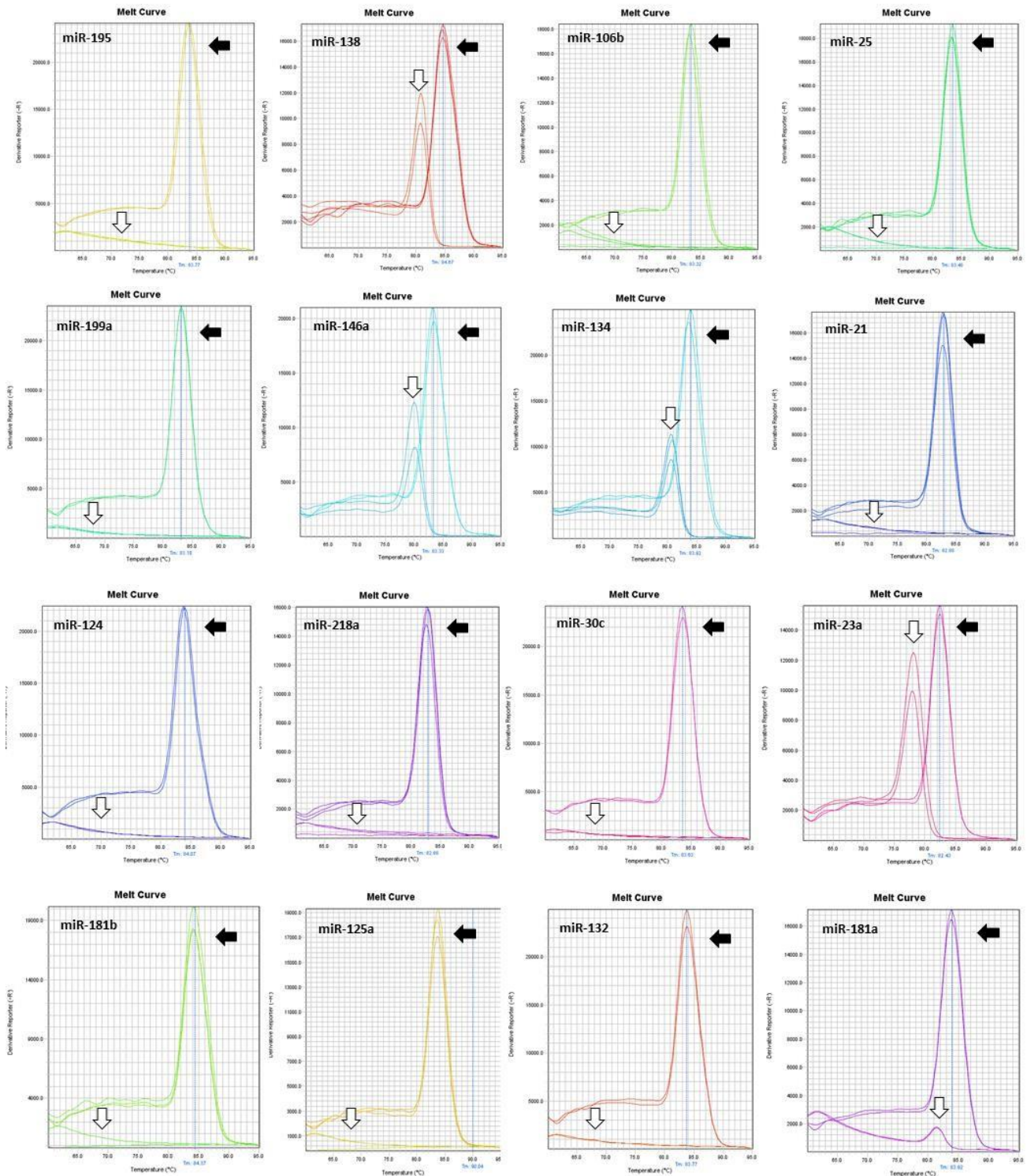


Figure S1. Melt curves of PCR products referent to each miRNA considering a pool of cDNA samples (positive control, black arrow) and a negative control, white arrow. Note that some miRNA present a peak corresponding to non-specific annealing in melting curves of negative controls. However, this not reproduce in presence of cDNA, suggesting that primers annealing with cDNA stronger than with itself to forms secondary structure, so there is no amplification of co-products.

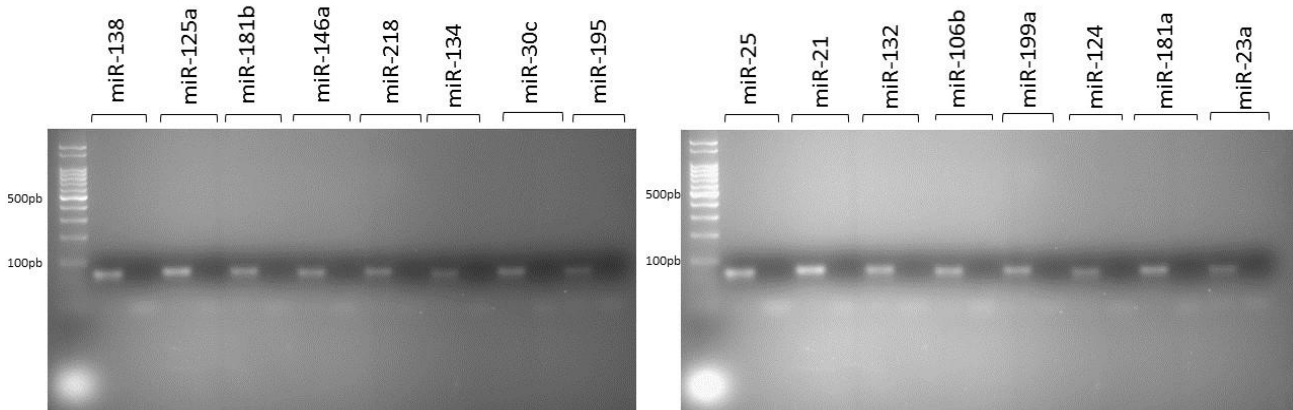


Figure S2. Agarose gel of PCR products referent to each miRNA considering a positive and a negative control. Note the existence, in positive controls, of only one band which appears in the molecular weight below 100 bp to each miRNA, confirming the specificity observed in melt curves above.

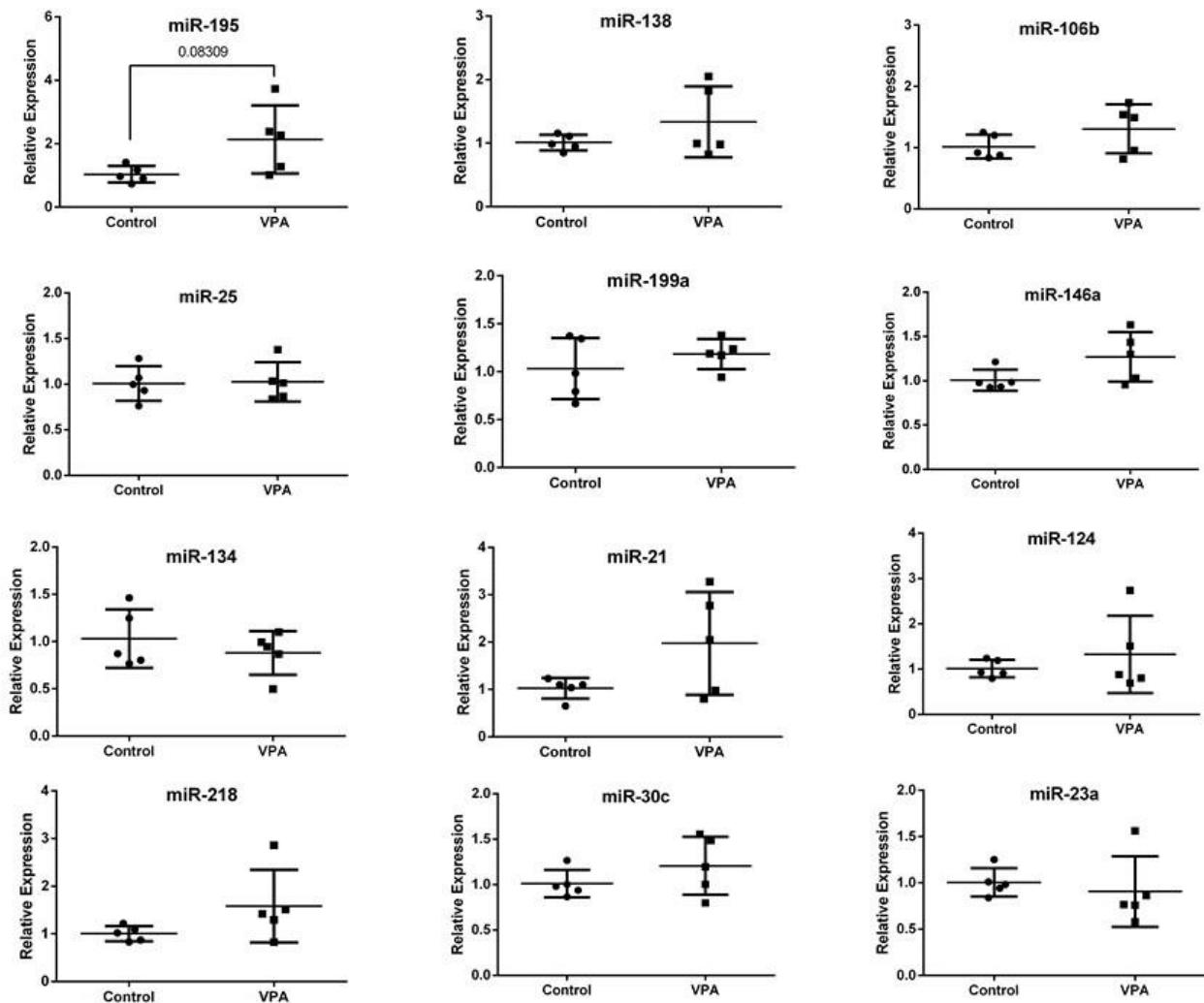


Figure S3. Relative expression of 12 miRNA which presents no difference between VPA and control groups ($p > 0.05$). Only miR-195 presents a tendency to increase ($p = 0.08309$).

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse foi o primeiro trabalho no qual se analisou a expressão relativa de miRNA no cerebelo em um modelo animal de TEA. Constatou-se que há um aumento da expressão relativa de dois miRNA (miR-132 e miR-181a) no cerebelo do grupo VPA em relação ao grupo controle, e que esses possuem como alvos importantes RNA mensageiros relacionados com já conhecidas alterações no TEA. Observando o conjunto de dados obtidos e os resultados de outros autores, podemos notar uma heterogeneidade na expressão dos miRNA no autismo. É preciso observar que os tipos de amostras variaram muito, principalmente quando se utiliza tecidos *postmortem* de pacientes que tiveram as mais variadas causas de morte e utilizaram diversos fármacos de tratamento ao longo da vida. Isso remete à importância de investir esforços para analisar os miRNA no modelo animal, que mimetiza o transtorno de maneira controlada e com o mínimo de fatores externos.

Olhando para os resultados desse trabalho observamos que os miRNA alterados, principalmente o miR-132, estão envolvidos em processos importantes relacionados com o TEA. Como já mencionado, diversas alterações que englobam todo o ambiente sináptico são descritas no TEA, e encontrar um miRNA que é expresso nos espinhos dendríticos e participa da plasticidade sináptica abre caminhos para uma nova abordagem sobre esse assunto, a fim de realizar mais análises para validar os alvos encontrados na literatura no modelo VPA.

O cerebelo é uma estrutura ainda pouco entendida em relação ao seu funcionamento quando comparado com outras regiões encefálicas como o córtex. No entanto, cada vez mais surgem estudos com análises de imagem mostrando que o cerebelo está intimamente conectado com outras regiões encefálicas. E a medida que esses estudos progredirem novos estudos mostram que há alterações na conectividade entre o cerebelo e outras regiões encefálicas no autismo. Portanto, é fundamental investir estudos sobre essa região encefálica para ajudar a entender a patofisiologia do TEA.

Apesar dessa heterogeneidade nos níveis de miRNA, eles surgem como um potencial marcador clínico do autismo, uma vez que poderiam ser dosados a partir de amostras de sangue. Para isso, é necessário encontrar um grupo de miRNA que

mantenha um padrão de expressão no autismo e investir na padronização de *kits* que possam auxiliar a no diagnóstico precoce do TEA.

Alguns RNA mensageiros alvos dos miRNA encontrados alterados neste trabalho, como o MECP2 e o FXR1, participam ativamente do neurodesenvolvimento e remetem à ideia de terem ocorrido alterações no período embrionário e que permaneceram na vida pós-natal. Portanto, fica também como perspectiva a observação de alterações moleculares, morfológicas e funcionais a nível embrionário, para se poder entender como o VPA age no desencadeamento do TEA. Outra perspectiva será comparar e agrupar esses resultados com as outras análises de miRNA que ocorreram concomitante a essa análise, em outras regiões encefálicas e no sangue do modelo animal induzido pelo VPA.

4. REFERÊNCIAS

ABU-ELNEEL, K. et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. **Neurogenetics**, v. 9, n. 3, p. 153–161, 2008.

AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 3, p. 137–145, 2008.

ANDER, B. P. et al. Atypical miRNA expression in temporal cortex associated with dysregulation of immune, cell cycle, and other pathways in autism spectrum disorders. **Molecular autism**, v. 6, p. 37, Jan. 2015.

APA, A. P. A. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition Text Revision - DSM IV-TR**. Washington, DC: [s.n.].

APA, A. P. A.-. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition - DSM IV**. Fourth Edi ed. Washington, DC: [s.n.].

APA, A. P. A.-. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-V**. Fifth Edit ed. Washington, DC: [s.n.].

ASHWOOD, P. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **Journal of leukocyte ...**, 2006.

ASHWOOD, P.; KRAKOWIAK, P. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. ... , **behavior, and immunity**, 2011.

ATLADÓTTIR, H.; THORSEN, P. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. **Journal of autism and ...**, 2010.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BAUMAN, M.; IOSIF, A.; SMITH, S. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. **Biological ...**, 2014.

BAUMANN, O.; MATTINGLEY, J. B. Functional topography of primary emotion processing in the human cerebellum. **NeuroImage**, v. 61, n. 4, p. 805–811, 2012.

BEVERIDGE, N. J. et al. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1176–89, 2010.

BROMLEY, R. L.; CLAYTON-SMITH, J. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. **Neurology**, v. 73, n. 12, p. 997, 2009.

BUCKNER, R. L. et al. The organization of the human cerebellum estimated by intrinsic functional connectivity. **J Neurophysiol**, v. 106, p. 2322–2345, 2011.

BUIE, T. et al. Evaluation, Diagnosis, and Treatment of Gastrointestinal Disorders in Individuals With ASDs: A Consensus Report. **Pediatrics**, v. 125, n. Supplement, p. S1–S18, 2010.

CAO, D. D.; LI, L.; CHAN, W. Y. MicroRNAs: Key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–28, 2016.

CASANOVA, M. F. The neuropathology of autism. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 17, n. 4, p. 422–33, Oct. 2007.

CHRISTENSEN, D. L. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)**, v. 65, n. 3, p. 1–23, Jan. 2016.

CHRISTENSEN, J. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders. v. 309, n. 16, 2014.

CHRISTIANSON, A.; CHESLER, N.; KROMBERG, J. Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neurodevelopmental Features in Two Siblings Pairs. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 36, p. 357–369, 1994.

COHEN, D.; PICHARD, N.; TORDJMAN, S. Specific Genetic Disorders and Autism: Clinical Contribution Towards their Identification. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 35, n. 1, p. 103, 2005.

COURCHESNE, E. et al. Abnormality of Cerebellar Vermian Lobules VI and VII in Patients with Infantile Autism. **Ajr**, v. 162, n. February, p. 123–130, 1994.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain Pathology**, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.

CRIPPA, A. et al. Cortico-Cerebellar Connectivity in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know So Far? **Frontiers in Psychiatry**, v. 7, n. February, p. 1–7, 2016.

CROEN, L.; GREYER, J. Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case-control study. ... **of pediatrics & ...**, 2005.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain Research**, v. 1338, p. 100–111, 2010.

FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric Research**, v. 65, n. 6, p. 591–598, 2009.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. [Autism and pervasive developmental disorders]. **Jornal de pediatria**, v. 80, n. 2 Suppl, p. S83-94, Apr. 2004.

GESCHWIND, D. H. Advances in autism. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 367–80, Jan. 2009.

GESUNDHEIT, B. et al. Immunological and autoimmune considerations of

- Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autoimmunity**, v. 44, p. 1–7, 2013.
- GILLBERG, C.; WING, L. Autism: not an extremely rare disorder. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 99, n. 6, p. 399–406, 1999.
- GOTTFRIED, C.; BAMBINI-JUNIOR, V. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. **Recent Advances in ...**, 2013.
- HA, M.; KIM, N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.
- HARDEN, C. L. In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. **Epilepsy currents / American Epilepsy Society**, v. 13, n. 6, p. 282–4, Nov. 2013.
- IMAI, K.; IIDA, T.; YAMAMOTO, M. Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. **Psychiatry and ...**, 2014.
- INGRAM, J. L. et al. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. **Neurotoxicology and teratology**, v. 22, n. 3, p. 319–24, 2000.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous child**, 1943.
- KHAN, A. J. et al. Cerebro-cerebellar resting-state functional connectivity in children and adolescents with autism spectrum disorder. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 9, p. 625–634, 2015.
- KORVATSKA, E. et al. Genetic and immunologic considerations in autism. **Neurobiology of disease**, v. 9, n. 2, p. 107–25, Mar. 2002.
- LETO, K. et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. **Cerebellum**, p. 789–828, 2015.
- LEVA, G. DI; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 78, n. 2, p. 180–189, 2006.
- LITTLE, L. M. et al. Activity Participation and Sensory Features Among Children with Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 9, p. 2981–2990, 2015.
- LOTTER, V. Epidemiology of autistic conditions in young studies designed to examine changes in the epide- children. 1:124 137. **Soc Psychiatry**, p. 124–137, 1966.
- MALKOVA, N.; YU, C.; HSIAO, E. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. ... , **behavior, and immunity**, 2012.
- MELLIOS, N. et al. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 19, p. 3030–3042, 2008.
- MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1061–1079, 2009.
- MILLER, M. T. Thalidomide embryopathy: a model for the study of congenital incomitant horizontal strabismus. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 89, p. 623–74, 1991.
- MUNDALIL VASU, M. et al. Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular autism**, v. 5, n. 1, p. 40, 2014.
- NELSON, S. B.; VALAKH, V. Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. **Neuron**, v. 87, n. 4, p. 684–698, 2015.
- NGUYEN, L. S. et al. Profiling olfactory stem cells from living patients

identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. **Molecular Autism**, p. 1–13, 2016.

OLDE LOOHUIS, N. F. M. et al. Elevated microRNA-181c and microRNA-30d levels in the enlarged amygdala of the valproic acid rat model of autism. **Neurobiology of disease**, v. 80, p. 42–53, 2015.

OZONOFF, S. et al. Autism and Autistic Behavior in Joubert Syndrome. **J Child Neurol**, v. 14, n. 10, p. 636–641, 1999.

PAN, C.-Y.; TSAI, C.-L.; CHU, C.-H. Fundamental Movement Skills in Children Diagnosed with Autism Spectrum Disorders and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 39, n. 12, p. 1694–1705, 2009.

PARISI, M. A.; DOBYNS, W. B. Human malformations of the midbrain and hindbrain: Review and proposed classification scheme. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, n. 1–2, p. 36–53, 2003.

PATTERSON, P. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. **Behavioural brain research**, 2009.

PHIEL, C. J. et al. Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734–36741, 2001.

RAPIN, I.; TUCHMAN, R. F. Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. **Pediatric clinics of North America**, v. 55, n. 5, p. 1129–46, viii, Oct. 2008.

RITVO ER, FREEMAN BJ, P. C. The UCLA university of Utah epidemiologic survey of autism: prevalence. **Am J Psychiatry**, v. 9, n. February, p. 194, 1989.

RODIER, P. M. et al. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 2, p. 247–261, 1996.

RODIER, P. M. et al. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 11, n. 2–3, p. 417–22, Jan. 1997.

ROULLET, F. I.; LAI, J. K. Y.; FOSTER, J. A. In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 47–56, 2013.

ROULLET, F.; LAI, J.; FOSTER, J. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and teratology**, 2012.

SAAB, C. Y.; WILLIS, W. D. The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 85–95, 2003.

SARACHANA, T. et al. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.

SCHMAHMANN, J. D.; SHERMAN, J. C. The cerebellar cognitive affective syndrome. **Brain**, v. 121, n. 4, p. 561–579, 1998.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–9, 2005.

SCHRATT, G. M. et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 283–289, 2006.

SILVERMAN, J. L. et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490–502, 2010.

SIM, S.-E.; BAKES, J.; KAANG, B.-K. Neuronal Activity-Dependent

- Regulation of MicroRNAs. **Molecules and Cells**, v. 37, n. 7, p. 511–517, 2014.
- SMITH, V.; BROWN, N. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. **Archives of disease in childhood-Education & ...**, 2014.
- SONG, L.; TUAN, R. S. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 78, n. 2, p. 140–149, 2006.
- SPENCE, S. J. **The genetics of autism** *Seminars in Pediatric Neurology*, May 2004.
- TAYLOR, L. J. et al. Evidence for shared deficits in identifying emotions from faces and from voices in autism spectrum disorders and specific language impairment. **International Journal of Language and Communication Disorders**, v. 50, n. 4, p. 452–466, 2015.
- TSAI, P. T. Autism and cerebellar dysfunction: Evidence from animal models. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, p. 1–7, 2016.
- TUCHMAN, R.; MOSHÉ, S.; RAPIN, I. Convulsing toward the pathophysiology of autism. **Brain and Development**, 2009.
- WANG, R. Y. et al. In vivo knockdown of hippocampal miR-132 expression impairs memory acquisition of trace fear conditioning. **Hippocampus**, v. 23, n. 7, p. 625–633, 2013.
- WEBB, S. J. et al. Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. v. 172, n. 1, p. 61–67, 2010.
- WILLIAMS, G. et al. Foetal valproate syndrome and autism: Additional evidence of an association. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 43, p. 202–206, 2001.
- WILLIAMS, P. G.; HERSH, J. H. **A male with fetal valproate syndrome and autism** *Developmental Medicine & Child Neurology*, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8749.1997.tb07500.x>>
- YERYS, B. E. et al. Attention deficit/hyperactivity disorder symptoms moderate cognition and behavior in children with autism spectrum disorders. **Autism Research**, v. 2, n. 6, p. 322–333, 2010.
- YIN, J.; SCHAAF, C. P. Autism genetics - an overview. **Prenatal diagnosis**, 15 Oct. 2016.
- ZACHOR, D. A.; CURATOLO, P. Recommendations for early diagnosis and intervention in autism spectrum disorders: An Italian-Israeli consensus conference. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 18, n. 2, p. 107–118, 2014.
- ZWAIGENBAUM, L. et al. Behavioral manifestations of autism in the first year of life. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 143–152, 2005.