

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Análise de expressão de microRNA em pacientes com
Transtorno do Espectro do Autismo: a relação do
comportamento fenotípico com alterações epigenéticas

Tamara da Silva Vaccaro

Porto Alegre, outubro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Análise de expressão de microRNA em pacientes com Transtorno
do Espectro do Autismo: a relação do comportamento fenotípico
com alterações epigenéticas

Tamara da Silva Vaccaro

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito parcial para
obtenção do título de doutor em
Bioquímica

Porto Alegre, outubro de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Vaccaro, Tamara da Silva
Análise de expressão de microRNA em pacientes com
Transtorno do Espectro do Autismo: a relação do
comportamento fenotípico com alterações epigenéticas /
Tamara da Silva Vaccaro. -- 2018.
72 f.
Orientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. microRNA. 2. Transtorno do Autismo. I. Souza,
Diogo Onofre Gomes de, orient. II. Título.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
Histórico	9
Transtorno do Espectro do Autismo	11
Diagnóstico	12
Tratamento	12
Epigenética no Transtorno do Espectro do Autismo	12
Epigenética	12
2.1 Metilação do DNA	13
2.2. Modificações de histonas	13
2.3 Alteração de microRNA	14
microRNA	14
1. Alterações de miRNA no Transtorno do Espectro do Autismo	18
miRNAs analisados neste trabalho	19
Principais mRNAs alvos encontrados neste estudo e envolvidos no TEA	21
Sirtuína 1	21
Histona desacetilase	22
MeCP2	22
2. Correlação entre espécies na expressão de microRNA	23
Modelo animal de TEA	23
microRNA analisados neste trabalho em modelo animal de TEA	24
OBJETIVO GERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25

MATERIAS E MÉTODOS	25
RESULTADOS	25
1. Alterations in the MicroRNA of the Blood of Autism Spectrum Disorder Patients: Effects on Epigenetic Regulation and Potential Biomarkers	26
2. Correlation between species in microRNA regulation: A study in ASD patients and ASD animal model	43
DISCUSSÃO	52
Transtorno de Ansiedade acompanha o Transtorno do Espectro do Autismo?	55
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	68

Lista de abreviaturas

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

DGCR8 - do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSM - Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria

dsRNA - RNA dupla fita

Exp5 - exportina-5

FMR1 - Fragile X Mental Retardation 1

GTP - trifosfato de guanosina

HDACs - histonas desacetilase

MECP2 - proteína de ligação a metil CpG 2

microRNA ou miRNA - pequenos RNAs não codificantes

mRNA - RNA mensageiro

mTOR - mammalian target of rapamycin

pré-miRNA - molécula precursora de miRNA

pri-miRNA - miRNA primário

RISC - Complexo de Indução de Silenciamento

RNA - ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

Sirt1 - Sirtuína 1

TEA - Transtorno do Espectro do Autismo

TID - Transtorno Invasivo do Desenvolvimento

TSC1 - Tuberous Sclerosis 1

TSC2 - Tuberous Sclerosis 2

3'UTR - do inglês: untranslated region

VPA - valproato de sódio

RESUMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é um grupo heterogêneo de desordens do desenvolvimento neurológico, caracterizado por prejuízos na comunicação e interação social e padrões repetitivos e estereotipados de comportamento. O diagnóstico clínico é avaliado apenas por entrevistas com os pais. A heterogeneidade deste transtorno é gerada por fatores genéticos e ambientais que desempenham um papel vital na predisposição dos indivíduos para o TEA com diferentes níveis de comprometimento. As alterações epigenéticas têm sido amplamente estudadas em doenças psiquiátricas. MicroRNAs (miRNAs) surgiram recentemente como reguladores epigenéticos importantes em uma variedade de processos celulares. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de alguns microRNAs (miRNAs) e correlacionar com vias bioquímicas em pacientes com TEA e em modelo animal de TEA. Nos pacientes com TEA, de um total de 26 miRNAs, sete foram estatisticamente alterados em pacientes quando comparado com o grupo controle: miR34c, miR92a-2, miR145 e miR199a têm aumento na expressão em pacientes enquanto os miR27a, miR19-b e miR193a estão reprimidos nos pacientes. Este estudo ainda mostra uma correlação de expressão de 4 miRNAs, miR34c, miR145 e miR199a e miR193a, em ambos os grupos (pacientes e do modelo animal de TEA). Os principais alvos, dos miRNAs, que estão reprimidos contribuem com o fenótipo encontrado no TEA são Sirtuína 1, HDAC2 e MeCP2. Além disso, este trabalho mostra algumas semelhanças na expressão de miRNAs alterados entre as duas espécies. É importante ressaltar o papel do miR34c que está intimamente ligado ao Transtorno de Ansiedade. Isto sugere que existe uma alteração epigenética no TEA que é persistente e conservada entre espécies, induzindo, possivelmente, o comportamento ansioso nos pacientes. Além de um perfil de expressão de microRNA como um possível marcador biológico, tanto diagnóstico quanto prognóstico, este estudo mostra uma possibilidade terapêutica para o tratamento da ansiedade em pacientes com TEA.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro do Autismo, microRNA, Sirtuína 1, HDAC2, MeCP2, miR34c, Transtorno de Ansiedade

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders characterized by impairments in communication and social interaction and repetitive and stereotyped patterns of behavior. The clinical diagnosis is only assessed by interviews with parents. The heterogeneity of this disorder is generated by genetic and environmental factors that play a vital role in the predisposition of individuals to the ASD with different levels of commitment. Epigenetic changes have been widely studied in psychiatric disorders. miRNAs have recently emerged as important regulators of epigenetic a variety of cellular processes. The aim of this study was to evaluate the expression of miRNA and correlate with biochemical pathways in ASD patients and in ASD animal model. In the ASD patients, a total of 26 miRNA, seven were significantly altered when compared with the control group: miR34c, miR92a-2, miR145 and miR199a have increased expression in patients while miR27a, miR19-b miR193a are suppressed in patients. This study also shows a correlation of 4 miRNA expression, miR34c, miR145, miR199a and miR193a in both groups (patients and ASD animal model). The main targets that are repressed in these miRNAs expressed differently contribute to the phenotype found in ASD and are Sirtuin 1, HDAC2 and MeCP2. Also, this work shows some similarities in miRNAs expression changed between the two species. It is important to emphasize the role of miR34c that is closely linked to anxiety disorder. This suggests that there is an epigenetic change in ASD and is persistent and conserved among species, inducing possibly the anxious behavior in patients. Besides a microRNA expression profile as a biomarker can both diagnosis and prognosis, this study shows the therapeutic opportunity for treatment of anxiety in patients with ASD.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, microRNA, Sirtuin 1, HDAC2, MeCP2, miR34c, anxiety disorder

INTRODUÇÃO

Histórico

A limitação nas relações humanas apresentada por pacientes com esquizofrenia foi referida, pela primeira vez, como autismo, por Eugen Bleuler em 1911¹. O termo autismo, derivado do radical grego “autos” (em si mesmo), foi utilizado, portanto, para descrever um sintoma de uma doença psiquiátrica, já conhecida na época.

Somente em 1943, Leo Kanner utilizou o termo “distúrbios autistas do contato afetivo” para descrever 11 crianças que apresentavam comportamento marcado pela inabilidade de estabelecer contato afetivo e interpessoal, de uma forma distinta de outras patologias como a esquizofrenia, e que parecia afetar os pacientes desde o início de suas vidas².

Hans Asperger, em 1944, descreveu casos de crianças com inteligência normal, porém com algumas características semelhantes ao autismo em relação às dificuldades de comunicação social².

Em 1980, o autismo foi, pela primeira vez, reconhecido no Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM III) e na revisão de 1987 (DSM III-R) foram estabelecidos dois diagnósticos sob o termo de “Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID)”: 1) autismo; 2) transtorno invasivo (ou global) do desenvolvimento não especificado.

Em 1994, (DSM IV), novos critérios foram incluídos devido à necessidade de identificação de subgrupos homogêneos de indivíduos com autismo, tanto para finalidades práticas quanto de pesquisa. Na versão de 2000, (DSM-IV-TR), os critérios diagnósticos permaneceram os mesmos que os do DSM-IV, os quais possibilitavam o diagnóstico dos TID com as seguintes subdivisões: 1)Autismo; 2)Síndrome de Rett;

3) Transtorno desintegrativo da infância; 4) Transtorno invasivo do desenvolvimento não especificado; 5) Síndrome de Asperger.

A versão mais recente do DSM, conhecida como DSM-V, reuniu quatro dos diferentes diagnósticos do espectro em um só diagnóstico: Transtorno do Espectro do Autismo (TEA). A Síndrome de Rett foi excluída do espectro por ser uma síndrome reconhecida por ter um gene alterado conhecido, mesmo possuindo muitos sintomas clínicos parecidos com os do TEA.

Portanto, a partir de 18 de maio de 2013, todos os pacientes foram incluídos dentro deste espectro³.

De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (DSM-V-“Development Team”), os padrões para o diagnóstico do TEA mudaram por várias razões, pois embora seja possível distinguir claramente a diferença entre as pessoas com TEA e aqueles com o desenvolvimento típico, é mais difícil de diagnosticar os subtipos válidos e antes existentes.

Uma vez que todos os pacientes com TEA exibem alguns dos comportamentos típicos do espectro, foi melhor redefinir o diagnóstico por gravidade do que ter um padrão completamente separado para cada, assim sendo, um único diagnóstico de TEA reflete melhor a apresentação e a patologia do autismo. A versão anterior do DSM tinha três critérios principais para o diagnóstico, conhecida como tríade de sintomas: inabilidade na linguagem, déficit na interação social e comportamentos estereotipados ou de modo repetitivo.

O novo DSM-V tem apenas duas áreas principais: comunicação social e os comportamentos fixos ou repetitivos. Os autores do DSM-V reiteram que é difícil separar os déficits de comunicação e os déficits sociais, uma vez que estas duas áreas se sobrepõem de forma significativa. A comunicação é frequentemente utilizada para fins

sociais, e os déficits de comunicação podem afetar drasticamente o desempenho social. Portanto, os atrasos na linguagem não mais fazem parte do diagnóstico. Por exemplo, anteriormente, um déficit na linguagem era um fator significativo no diagnóstico de autismo clássico, tanto que o primeiro diagnóstico da vida do paciente era realizado após um não desenvolvimento de linguagem típico.

Transtorno do Espectro do Autismo

O TEA não tem sua etiologia definida, apesar de muitos estudos recentes nesta área. Entre as patologias com etiologia complexa da psiquiatria, o Transtorno do Espectro do Autismo é um dos que apresenta maior herança genética, ou seja, os genes têm um papel importante na determinação da sua etiologia. Possivelmente, predisposição genética ligada a um fator ambiental podem estar relacionados com o desencadeamento do transtorno⁴. Esse pensamento corrobora o fato da apresentação de graus diferentes do mesmo, com cada qual seguindo a variação da gravidade da exposição ambiental junto com a predisposição genética⁵.

Diversos genes e variações alélicas foram relatados como possíveis marcadores moleculares do TEA^{6,7}, porém o TEA acompanha, também, pacientes que possuem alterações cromossômicas bem descritas na literatura médica, como Síndrome de Down, Síndrome do X-Frágil, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Angelman, entre outras^{6,7}.

Alterações gênicas e genéticas estão envolvidas no desencadeamento do TEA, porém verifica-se que modificações imunológicas, do ciclo circadiano, alterações hormonais e, recentemente, com mais ênfase, alterações epigenéticas estão presentes nos pacientes com TEA⁸⁻¹⁰.

Apesar dos altos valores de herdabilidade atribuídos ao TEA, o grande número de regiões cromossômicas implicadas dificulta a busca por genes associados^{6,11,12}.

Tem sido relatada por estudos epidemiológicos nos Estados Unidos que a prevalência do TEA é de 1 caso para cada 88 crianças com idade de 8 anos, e mais frequente no sexo masculino, na proporção média de 4 para 1 caso no gênero feminino. O aumento no número de diagnósticos é explicado pelo aumento no conhecimento sobre o transtorno, uma vez que, por enquanto, só é disponibilizado o diagnóstico clínico através de entrevistas com os pais¹³.

Diagnóstico

Quanto mais precoce o diagnóstico clínico, melhores as chances de tratamento para o desenvolvimento do paciente. Atualmente, o diagnóstico ocorre a partir dos três anos de idade, e é realizado por profissionais médicos através de entrevista sobre o comportamento da criança¹³.

Tratamento

Todos os tratamentos farmacológicos são paliativos, sendo utilizados para tratar os sintomas apresentados por cada indivíduo. Não existe tratamento específico para o TEA, não existe cura para o TEA; o que existe são tratamentos farmacológicos (anti-psicóticos, ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivantes) e terapêuticos para o controle e desenvolvimento do paciente¹³.

Epigenética no Transtorno do Espectro do Autismo

Epigenética

O termo epigenética foi empregado pela primeira vez, na década de 1940, pelo geneticista e embriologista britânico Conrad Waddington, que a descreveu como: "as interações entre genes com o ambiente, que fazem o fenótipo existir"¹⁴.

O conhecimento atual reforça esse entendimento e a epigenética, atualmente, engloba a avaliação da alteração da transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA) através de variações na metilação do DNA, modificações de histonas, alterações de transcrição de ácido ribonucleico (RNA) não-codificante, sem alterações na sequência de DNA. Estas variantes representam o epigenoma, que por sua vez irá ser refletido no transcriptoma: a porção do DNA que é transcrita em RNA^{15,16}.

É importante considerar que o RNA não-codificante representa mais de 90% dos transcritos na maioria das células. Regiões de DNA que não codificam para proteínas (ou seja, regiões intergênicas) podem ser ativamente transcritas e participar da regulação de expressão gênica e proteica. Fatores epigenéticos podem ter impacto em grande escala e modificar as grandes “bibliotecas” dos processos celulares: transcriptoma, RNAoma, proteoma e metabaloma^{17,18}.

2.1 Metilação do DNA: Em eventos pós-replicação, a DNA metiltransferase, enzima que catalisa a adição de um grupo metil (CH₃-) a partir do doador de metil, S-adenosil-L-metionina, para os nucleotídeos citosina ou adenina do DNA, tipicamente na posição C5 dos dinucleotídeos CpG. Ela ocorre em 70 a 80% nas ilhas CpG que estão associadas aos promotores gênicos. Este processo bioquímico regula a transcrição e expressão de genes e está relacionada normalmente ao silenciamento dos mesmos.

2.2. Modificações de histonas: Em células de mamíferos, a unidade de base da embalagem do DNA é o nucleossoma, formado por proteínas – histonas – que envolvem o núcleo no qual o DNA é empacotado. Esta formação constitui a cromatina¹⁹. As modificações covalentes das proteínas histona Influenciam a

disponibilidade de DNA para processos de transcrição, regulando desta forma a estrutura de DNA para a expressão do gene correspondente.

2.3 Alteração de microRNA: Os miRNAs são sequências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA não-codificante que regulam a expressão de outros genes através do emparelhamento base-específico com o RNA mensageiro (mRNA) alvo. Esse mecanismo parece estar envolvido com a inibição do início da tradução²⁰.

microRNA

No início deste milênio foram feitas as primeiras descobertas correlacionando a existência de pequenos RNAs (microRNA ou miRNA) com os processos de regulação da expressão gênica em eucariotos. Os miRNAs são sequências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA não-codificante que regulam a expressão de outros genes através do emparelhamento base-específico na região 3'UTR (do inglês: untranslated region), região essa que se estende do códon de terminação (sinal para o fim da síntese protéica) até a cauda poli-A do RNA mensageiro (mRNA) alvo²⁰. Padrões diferenciais de expressão destes miRNAs tem sido correlacionados com um grande número de patologias de natureza multifatorial, como câncer²¹, Alzheimer²² e, mais recentemente, autismo^{23,24}.

Os miRNAs são moléculas de RNA endógenas, não-codificantes e evolutivamente conservadas, envolvidas no processo pós-transcricional como repressoras do gene através da clivagem do mRNA alvo por meio da formação de um Complexo de Indução de Silenciamento (RISC). No RISC, o miRNA liga-se à pares de

bases complementares do mRNA alvo, este processo faz com que haja o silenciamento da expressão gênica ou a clivagem endonucleolítica do mRNA alvo.

A via de transcrição dos miRNAs tem um processamento compartimentado (Fig. 1). Duas enzimas estão envolvidas no processo de transcrição do precursor de miRNA maduro: a RNA polimerase II (responsável pela transcrição da maioria das sequências de miRNA) e a RNA polimerase III.²⁰

A biogênese do miRNA, exemplificada na figura 1, inicia-se com a transcrição de sua sequência pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli-A²⁵. O pri-miRNA apresenta uma estrutura conformacional tipo *hairpin*, que é clivada, ainda no núcleo celular, pelo complexo enzimático: ribonuclease III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando uma molécula precursora de miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos²⁶. Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP (trifosfato de guanosina) como cofator²⁷. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pelas enzimas ribonuclease III (RNase) e Dicer (enzima nuclease que cliva moléculas de RNA dupla fita (dsRNA)), gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos²⁸. Este produto é incorporado ao complexo RISC, que possui as proteínas argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do *duplex* de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de mRNA alvos²⁹.

Um único miRNA pode ter diversos alvos de mRNA e um mRNA alvo pode ser reprimido por diversos miRNAs²⁰, além disso, alguns polimorfismos na sequência nucleotídica do microRNA ou na região 3' UTR do mRNA alvo podem modificar o

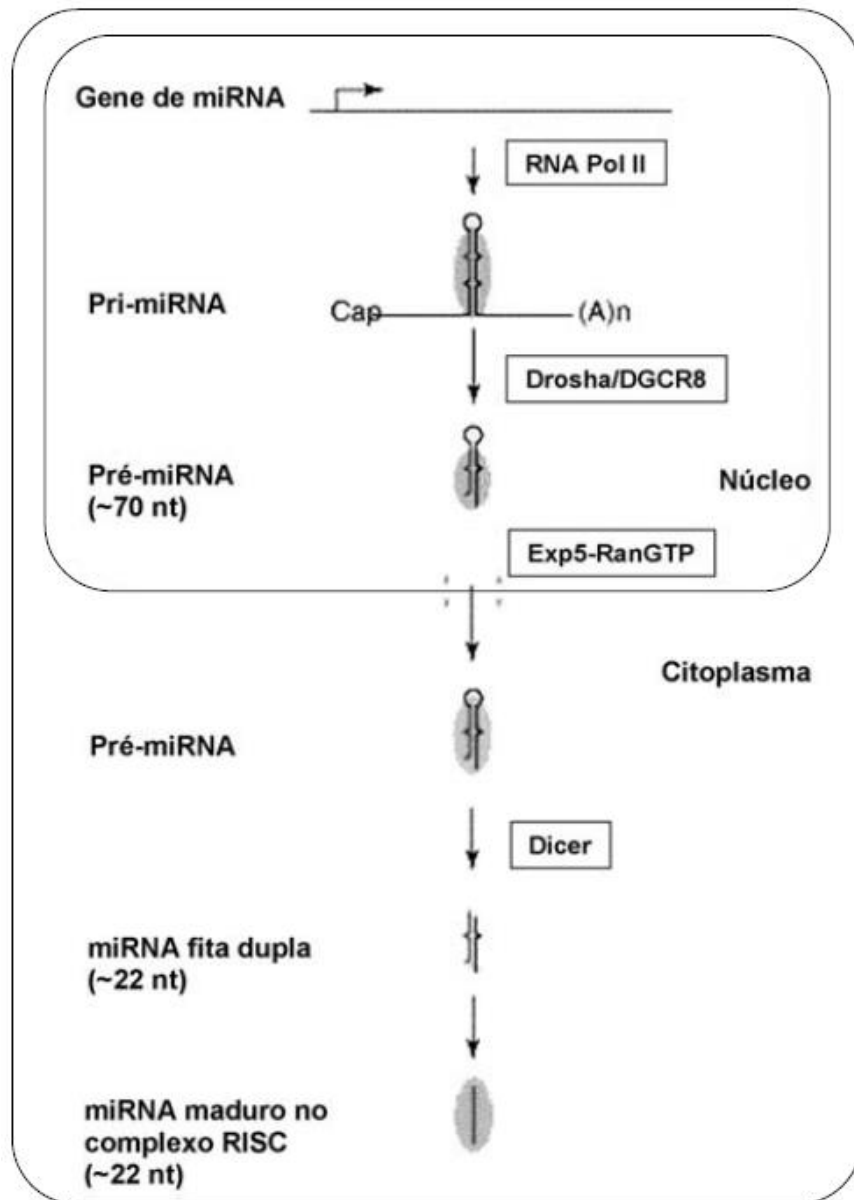
perfil de repressão envolvido, surgindo novas possibilidades de pareamento específico^{30,31}.

Os miRNAs participam de vários processos biológicos, tais como: o controle da proliferação celular, apoptose celular, o metabolismo de lipídeos e a morte celular^{20,32}. Os miRNAs regulam sua própria biogênese que envolve também fatores de regulação de transcrição²⁰ por isso que RNAs não-codificantes são importantes para a compreensão dos processos biológicos complexos dos organismos²⁰.

A regulação negativa da expressão de mRNA alvo através da função do miRNA é um mecanismo epigenético específico para o mRNA alvo, tais como a metilação do DNA e a modificação de histonas³².

Os miRNAs também podem ser dosados no plasma e no soro de humanos e de outros animais, de modo que podem ser utilizados como biomarcadores genéticos para o diagnóstico e prognóstico de várias doenças³³⁻³⁵.

Figura 1: Biogênese e processamento de miRNA



Adaptado de Kim, 2005³⁶; publicado por Ricarte Filho & Kimura, 2006³⁷

Fig.1: O miRNA é transcrito pela RNA polimerase II formando o pri-miRNA que apresenta estrutura hairpin, depois é processado pelo complexo RNase III, Drosha, formando o miRNA precursor (pré-miRNA), a proteína exportina-5 leva esse produto ao citoplasma para ser processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla. Uma das fitas do duplex de miRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional do mRNA alvo.

O miRBase (mirbase.org) é uma base de dados de sequências de miRNA primário (previstos a partir da porção *hairpin*) e de sequência madura do miRNA. É o único banco de dados que possui todos os miRNAs de todas as espécies descobertos até

agora, e fornece nomenclatura para novos miRNAs com base na comparação de semelhança de sequência e de acordo com a localização no genoma da espécie.

Este banco de dados é muito útil para os pesquisadores pois informa todas as sequências de miRNA e previsão de mRNA alvos para todas as espécies. O miRBase fornece uma interface para a busca, download, navegação e apresentação de informações relacionadas com o miRNA, como exemplos: sequências pré-miRNAs, sequências maduras, anotações e expressão em tecidos e em espécies^{38,39}.

1. Alterações de miRNA no Transtorno do Espectro do Autismo

A evidência da desregulação de miRNA no TEA é baseada em uma série de estudos, nos quais têm-se centrado a alteração do perfil de expressão de miRNA em indivíduos com TEA^{16,40}. O perfil de expressão em amostras de cérebro *post-mortem* de indivíduos com TEA têm implicado em descobertas de alterações de miRNA que possuem papéis na neurogênese e na plasticidade neuronal. Como exemplo, em um estudo de caso-controle, Abu-Elneel *et.al*, 2008, rastream a expressão de 466 miRNAs no córtex cerebral *post-mortem* de 13 indivíduos com TEA e em igual número de controles. Um total de 28 miRNAs estavam diferencialmente expressos entre os grupos²³. Avaliando amostras de linhagem de células linfoblásticas, Talebizadeh *et.al*, 2008, encontrou expressão alterada de 6 miRNAs nos 470 miRNAs estudados em 6 indivíduos com TEA em comparação com controles pareados²⁴.

Como já reportado, o TEA pode acompanhar síndromes sendo classificado como uma comorbidade, nestes casos é descrito como TEA sindrômico. Alguns genes alterados nestas síndromes têm ligações diretas com a biogênese de miRNA.

A Síndrome do X frágil, causada por expansões da repetição de trinucleotídeos CGG localizada na porção 5 do gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1), e a Síndrome de Rett, causada por mutações no gene MECP2 (proteína de ligação a metil CpG 2), são exemplos de síndromes com gene único e que podem estar acompanhadas de TEA⁴¹⁻⁴³. É importante ressaltar que os genes FMR1 e MECP2 estão envolvidos com a biogênese de miRNA, a proteína FMR1 interage com o complexo de processamento de miRNA na fase da maturação do mesmo^{44,41}. A proteína traduzida a partir do gene MECP2 tem como função a de repressor transcricional, podendo interferir, portanto, diretamente na montagem do complexo de processamento de miRNA^{45,46}. Mutações de perda de função em MECP2 são as principais causas da Síndrome de Rett, que antigamente fazia parte do TEA como relatado anteriormente, no entanto, duplicações do gene MECP2 foram, também, ligadas ao TEA, mostrando a importância deste gene no fenótipo e características presentes no TEA⁴⁷.

Ambos, FMR1 e MECP2 são intensamente estudados pela comunidade científica no que diz respeito ao TEA, principalmente no envolvimento em vias bioquímicas, na neurogênese e na função sináptica⁴⁸.

miRNAs analisados neste trabalho

Abaixo a tabela contendo as informações sobre os miRNAs analisados na espécie humana neste trabalho. As informações sobre a sequência madura, localização cromossômica e número de acesso foram retiradas da base de dados miRBase. As sequências dos *primers forward* foram desenhadas para o estudo.

Os miRNAs escolhidos para integrarem este painel foram aqueles que estão envolvidos comprovadamente na neurogênese, na regulação da plasticidade sináptica,

em vias de regulação imunológica e com papel importante em outras doenças psiquiátricas como esquizofrenia, Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson^{22,49-51}.

Tabela 1: Informações sobre os miRNAs analisados neste estudo

ID	Cromossomo	Acesso miRBase	Seqüência madura	Primer forward
hsa-miR-19b-1-5p	13	MI0000074	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	AGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGC
hsa-miR-24-2-5p	19	MI0000081	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	TGCCTACTGAGCTGAAACACAG
hsa-miR-25-3p	7	MI0000082	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
hsa-miR-27a-3p	19	MI0000085	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
hsa-miR-29b-2-5p	1	MI0000107	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	CTGGTTTCACATGGTGGCTTAG
hsa-miR-31-5p	9	MI0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
hsa-miR-34a-5p	1	MI0000268	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
hsa-miR-34c-5p	11	MI0000743	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUJGC	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
hsa-miR-92a-2-5p	X	MI0000094	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAC	GGGTGGGGATTGTGCATTAC
hsa-miR-99a-5p	21	MI0000101	AACCCGUAGAUCGGAUCUUGUG	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
hsa-miR-125a-5p	19	MI0000469	UCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	TCCCTGAGACCCTTAACCTGTGA
hsa-miR-125b-1-3p	11	MI0000446	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
hsa-miR-125b-2-3p	21	MI0000470	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	TCACAAGTCAGGCTCTTGGGAC
hsa-miR-145-5p	5	MI0000461	GUCCAGUUUCCCAGGAUCCCU	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
hsa-miR-181b-5p	1	MI0000270	AACAUUCAUJGUCUGUCGGUGGU	AACATTCAUJGCTGTCGGTGGGT
hsa-miR-191-5p	3	MI0000465	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG
hsa-miR-193a-5p	17	MI0000487	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	TGGGTCTTGCGGCGAGATGA
hsa-miR-193b-3p	16	MI0003137	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	AACTGGCCCTCAAAGTCCCGCT
hsa-miR-198	3	MI0000240	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	GGTCCAGAGGGGAGATAGGTTC
hsa-miR-199a-5p	19	MI0000242	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTC
hsa-miR-210-3p	11	MI0000286	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
hsa-miR-214-3p	1	MI0000290	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT
hsa-miR-221-3p	X	MI0000298	AGCUACAUJGUCUGCUGGGUUUC	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
hsa-miR-222-3p	X	MI0000299	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
hsa-miR-339-5p	7	MI0000815	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	TCCCTGTCTCCAGGAGCTCACG
hsa-miR-370-3p	14	MI0000778	GCCUGCUGGGGUGGAACCUUGU	GCCTGCTGGGGTGGAACTGGT

Sirtuína 1

Sirtuína 1 (Sirt1) é uma enzima conhecida por regular diversos processos biológicos. Recentemente vem sendo descrita como uma reguladora de estresse e envelhecimento, além de sua ativação estar envolvida como efeito terapêutico em doenças neurodegenerativas, como na Doença de Alzheimer e na esclerose lateral amiotrófica^{52,53}. Sirt1 é reconhecida por regular negativamente mTOR (mammalian target of rapamycin), promovendo um efeito protetor no envelhecimento, por exemplo, pois a inibição de mTOR confere um efeito benéfico⁵⁴.

A relação inversa entre os papéis de Sirt1 e mTOR sugere uma relação funcional entre essas duas proteínas, a regulação de mTOR é mediada potencialmente através de uma interação de Sirt1 com o complexo TSC1-TSC2 (Tuberous Sclerosis 1 e 2), este complexo está alterado funcionalmente na esclerose tuberosa, síndrome que pode ser acompanhada por sintomas do TEA⁵⁵. A alteração do complexo TSC1-TSC2 promovida por mutações nos genes TSC1 e/ou TSC2 promove uma ativação de mTOR e desencadeia as modificações patológicas da esclerose tuberosa⁵⁶. Abaixo na figura 2 é demonstrado a via de sinalização da Sirt1-complexo TSC-mTOR.

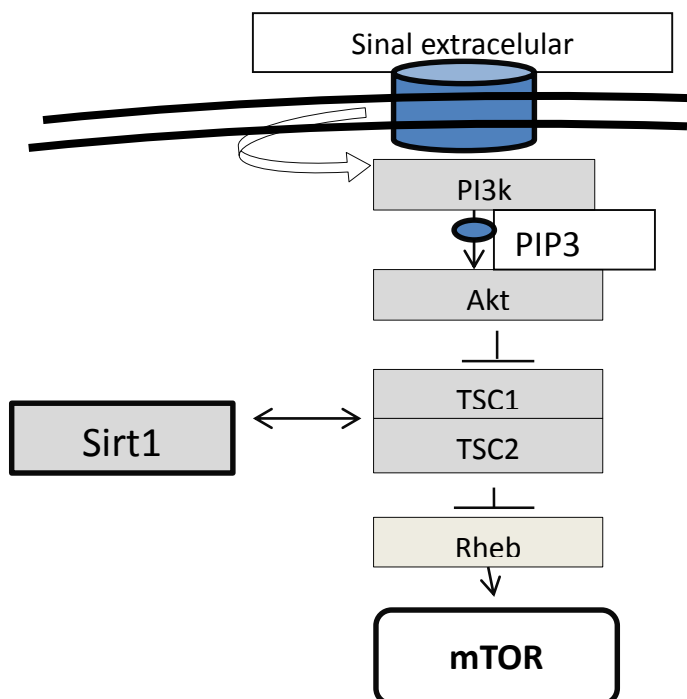


Figura 2: Após sinalização extracelular a via PI3K é ativada até Akt que inibe o complexo TSC, por outra via, Sirt1 pode promover ativação deste complexo e como consequência há a repressão de Rheb e inibição da proteína mTOR

Figura 2: Via de sinalização da Sirt1-complexo TSC-mTOR

Histona desacetilase

O recrutamento de histonas desacetilase (HDACs) é considerado como um elemento-chave na regulação dinâmica de muitos genes, pois exercem um papel importante na proliferação e diferenciação celular^{57,58}. De um modo geral, a hiperacetilação das porções N-terminais das histonas se correlaciona com a ativação da expressão gênica, enquanto que a desacetilação medeia a repressão da transcrição⁵⁹.

Em particular, a função da HDAC leva à repressão da transcrição, os inibidores desta atividade enzimática podem inverter a repressão. Dentre os fármacos utilizados como anti-epilético, o valproato de sódio (VPA) é um inibidor seletivo de classe I de HDAC⁶⁰. Uma vez que o VPA tem sido utilizado clinicamente por mais de três décadas, a farmacologia e os efeitos adversos desta droga foram estudados em detalhe⁶¹.

MeCP2

Mutações no gene MECP2 leva a perda de função da proteína MeCP2, envolvida na repressão gênica. Essas alterações genéticas em MECP2 estão bem descritas e induzem um atraso na maturação neuronal e na sinaptogênese, causando a Síndrome de Rett⁶². A Síndrome de Rett é uma doença progressiva ligada ao cromossomo X, caracterizada por um período normal de desenvolvimento de 6 a 18 meses, seguido de uma subsequente perda de habilidades de fala e motoras adquiridas. Os pacientes também podem desenvolver retardo mental, movimentos estereotipados, ataxia, convulsão, microcefalia, autismo e disfunções respiratórias⁶³.

Um dos mais importantes alvos de MeCP2, para explicar o fenótipo da Síndrome de Rett, no sistema nervoso central, é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)^{64,65,66}.

2. Correlação entre espécies na expressão de microRNA

Modelo animal de TEA

O TEA é um transtorno de comportamento grave, caracterizado por deficiências em interações sociais, déficits de comunicação verbal e não-verbal, e estereotipados, padrões repetitivos de comportamentos e de interesses¹³.

O desenvolvimento de modelo animal de TEA tem como objetivo mimetizar em laboratório a patologia e possíveis semelhanças etiológicas com os dados humanos. Para tanto, no caso do modelo animal utilizado neste trabalho, foi reproduzido um modelo animal de TEA desenvolvido por Schneider e Przewłocki, 2005⁶⁷.

A estratégia criada foi a de submeter fetos de ratos à exposição de VPA no dia 12.5 de gestação. A fim de determinar se os ratos VPA apresentam aberrações comportamentais observadas no TEA, os seus comportamentos foram extensivamente avaliados numa série de testes. Os resultados demonstram que os ratos VPA possuem: (1) uma menor sensibilidade à dor e maior sensibilidade a estímulos não dolorosos, (2) diminuição da inibição de pré-pulso acústico, (3) hiperatividade locomotora e repetitiva/estereotipada combinada com menor atividade exploratória e (4) diminuição do número de comportamentos sociais e aumento da latência para comportamentos sociais⁶⁷. Segundo Schneider e Przewłocki, além disso, os ratos VPA apresentam atraso na maturação, menor peso corporal e desenvolvimento motor atrasado.

O transtorno de ansiedade é muito relatado em pacientes com TEA, muitos pacientes fazem uso de medicamentos psicotrópicos para amenizar esse comportamento alterado. É importante ressaltar que diversos estudos no modelo animal de TEA relatam um comportamento ansioso nos ratos VPA, pela desregulação dos sistemas gabaérgico^{68,69} e dopaminérgico no estriado e na área mesolímbica do cérebro⁶⁸.

microRNA analisados neste trabalho em modelo animal de TEA

Tabela 2: Informações sobre os miRNAs analisados neste estudo

ID	Cromossomo	Acesso miRBase	Sequência madura	Primer forward
rno-miR-25-3p	12	Mi0000856	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
rno-miR-27a-3p	19	Mi0000860	UUCACAGUGGCUAAGUUC CGC	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
rno-miR-29b-5p	1	Mi0000862	CUGGUUUACAUGGUGGUUAG	CTGGTTTCACATGGTGGCTTAG
rno-miR-34a-5p	5	Mi0000877	UGGCAGUGUCUJAGCUGGUUGU	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
rno-miR-34c-5p	8	Mi0000876	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
rno-miR-99a-5p	11	Mi0000883	AACCCGUAGAUC CGAUUCUUGUG	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
rno-miR-125a-5p	1	Mi0000895	UCCCUGAGACCCUUUAACCUUGA	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA
rno-miR-125b-1-3p	8	Mi0000896	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
rno-miR-145-5p	18	Mi0000918	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
rno-miR-181b-5p	13	Mi0000926	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	AACATTCAUUGCTGTCGGTGGGT
rno-miR-191-5p	8	Mi0000934	CAACGGAUCCCAAAGCAGCUG	CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG
rno-miR-193a-5p	10	Mi0000936	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	TGGGTCTTTGCGGGCGAGATGA
rno-miR-199a-5p	13	Mi0000941	CCCAGUGUUCAGACUACCUUGUC	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTC
rno-miR-210-3p	1	Mi0000950	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
rno-miR-221-3p	X	Mi0000961	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	AGCTACATTTGTCTGCTGGGTTTC
rno-miR-222-3p	X	Mi0000962	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
rno-miR-339-5p	12	Mi0000620	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	TCCCTGTCTCCAGGAGCTCACG
rno-miR-370-3p	6	Mi0003486	GCCUGCUGGGUGGAACCUUGU	GCCTGCTGGGGTGGAACTGGT

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a alteração de miRNA em pacientes com Transtorno do Espectro do Autismo e em ratos submetidos ao modelo animal de autismo induzido por Valproato de sódio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o quanto e quais miRNA estão alterados no plasma de pacientes com autismo clássico, agora relatado como transtorno do espectro do autismo, em relação aos indivíduos neurotípicos. Todas as amostras pertencem a crianças do gênero masculino com idade entre 5 e 10 anos, provenientes e pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
2. Verificar o quanto e quais microRNA estão alterados no plasma de ratos submetidos ao modelo animal do Transtorno do Espectro do Autismo com valproato de sódio, em relação aos ratos controle. Todos os ratos são do gênero masculino com idade de 90 dias, provenientes e tratados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
3. Estudar as vias bioquímicas possivelmente alteradas pelos miRNA expressos diferentemente através da pesquisa em bancos de dados de alvos específicos e validados para cada miRNA alterado entre os dois grupos das respectivas espécies.
4. Correlacionar alterações idênticas de miRNA entre espécies com a fisiopatologia do Transtorno do Espectro do Autismo

MATERIAS E MÉTODOS

Os materiais e métodos desta tese estão descritos nos manuscritos

RESULTADOS

1. Alterations in the MicroRNA of the Blood of Autism Spectrum Disorder Patients: Effects on Epigenetic Regulation and Potential Biomarkers

Alterations in the MicroRNA of the Blood of Autism Spectrum Disorder Patients: Effects on Epigenetic Regulation and Potential Biomarkers

Behav. Sci. 2018, 8(8), 75; <https://doi.org/10.3390/bs8080075>

Tamara da Silva Vaccaro ¹, Julia Medeiros Sorrentino ¹, Sócrates Salvador ², Tiago Veit ³, Diogo Onofre Souza ¹ and Roberto Farina de Almeida ^{1,*}

¹ Institute of Health's Basic Science, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil; tamara.genetica@gmail.com (T.d.S.V.); juliamsorrentino@gmail.com (J.M.S.); diogo.bioq@gmail.com (D.O.S.); almeida_rf@yahoo.com.br (R.F.d.A.)

² Pediatric Neurology Center, Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-903, RS, Brazil; socratessalvador@gmail.com (S.S)

³ Institute of Health's Basic Science, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-190, RS, Brazil; tiagoveit@terra.com.br (T.V.)

* Correspondence: almeida_rf@yahoo.com.br

Received: 12 June 2018; Accepted: 11 August 2018; Published: date

Abstract: **Aims:** Autism spectrum disorder (ASD) refers to a group of heterogeneous brain-based neurodevelopmental disorders with different levels of symptom severity. Given the challenges, the clinical diagnosis of ASD is based on information gained from interviews with patients' parents. The heterogeneous pathogenesis of this disorder appears to be driven by genetic and environmental interactions, which also plays a vital role in predisposing individuals to ASD with different commitment levels. In recent years, it has been proposed that epigenetic modifications directly contribute to the pathogenesis of several neurodevelopmental disorders, such as ASD. The microRNAs (miRNAs) comprises a species of short noncoding RNA that regulate gene expression post-transcriptionally and have an essential functional role in the brain, particularly in neuronal plasticity and neuronal development, and could be involved in ASD pathophysiology. The aim of this study is to evaluate the expression of blood miRNA in correlation with clinical findings in patients with ASD, and to find possible biomarkers for the disorder. **Results:** From a total of 26 miRNA studied, seven were significantly altered in ASD patients, when compared to the control group: miR34c-5p, miR92a-2-5p, miR145-5p and miR199a-5p were up-regulated and miR27a-3p, miR19-b-1-5p and miR193a-5p were down-regulated in ASD patients. **Discussion:** The main targets of these miRNAs are involved in immunological developmental, immune response and protein synthesis at transcriptional and translational levels. The up-regulation of both miR199a-5p and miR92a-2a and down-regulation of miR193a and miR27a was observed in ASD patients, and may in turn affect the SIRT1, HDAC2, and PI3K/Akt-TSC:mTOR signaling pathways. Furthermore, MeCP2 is a target of miR199a-5p, and is involved in Rett Syndrome (RTT), which possibly explains the autistic phenotype in male patients with this syndrome.

Keywords: ASD; microRNA; SIRT1; HDAC2; PI3K/Akt-TSC:mTOR; MeCP2

1. Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) refers to a group of heterogeneous brain-based neurodevelopmental disorders with different levels of symptom severity in two core domains: impairment in communication and social interaction; and repetitive and stereotypic patterns of behavior [1]. Given the challenges, the clinical diagnosis of ASD is based on information gained from interviews with patients' parents, in accordance with the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSMV-TR). In April 2018 an important study from the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network was published by the U.S. Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control that estimates the prevalence of ASD among U.S. children aged 8 years old. The results obtained revealed that one in 59 children aged 8 years, from multiple communities, presented ASD [1]. Multiple lines of evidence suggest that ASD is genetic in origin, with most data supporting a polygenic model [2,3]. However, except for the GWAS study [4], which demonstrate that although autism possesses a complex genetic architecture, common variations are found, and other genetic studies have been quite successful in identifying suitable candidate genes for ASD. The heterogeneous pathogenesis of this disorder appears to be driven by genetic and environmental interactions, which also play a vital role in predisposing individuals to ASD with different commitment levels [5]. In recent years, it has been proposed that epigenetic modifications directly contribute to the pathogenesis of several neurodevelopmental disorders, such as ASD [6–8]. Epigenetics modifiers act at the interface of genes targeting different mechanisms: histone modifications, DNA methylation, chromatin remodeling or noncoding RNA (microRNAs); controlling heritable changes in gene expression without changing the DNA sequence [9,10].

It has been proposed that epigenetic machinery was closely related with neuronal development disorders by several pathways influencing cell cycle regulation, development and axon guidance, dendritic spine development and function, actin cytoskeleton regulation and protein synthesis regulation [11]. The microRNAs (miRNAs) comprise a species of short noncoding RNA (approximately 21 nucleotides) that regulate gene expression post-transcriptionally, by interacting with specific mRNAs, usually at the 3' untranslated region (UTR), through partial sequence complementation, resulting in mRNA degradation or repression of translation [12]. In this way, a variety of cellular processes could be affected, as cellular differentiation, metabolism and apoptosis [13]. miRNAs have an essential functional role in the brain, particularly in neuronal plasticity and neuronal development [14]. Each miRNA binds multiple targets in several mature mRNA species, mediating several biological functions, including physiological neuronal gene expression and also several pathological processes, as were previously described in some brain disorders [15,16]. The expression of many miRNAs is dynamically regulated during brain development, neurogenesis, the neuronal maturation mechanism [14], and an important signaling pathway involved in all of these processes is the tuberous sclerosis complex-mammalian target of rapamycin (TSC-mTOR). For example, a significant impairment to this pathway has been observed in some disorders related to autism, including Tuberous Sclerosis, a disease characterized by mutations in tuberous sclerosis proteins (TSC) TSC1 or TSC2 genes [17].

Recently, studies have revealed associations between the immune system and the central nervous system in ASD development, hypothesizing that early neuroimmune disturbances during embryogenesis could persist throughout an individual's lifetime. Considering that miRNAs can pass into the bloodstream from cells or tissues and organs [18], it seems reasonable to suppose that changes in miRNA levels in blood could reflect direct changes occurred in the Central Nervous System and lymphoid organs. Thus, in the present study, we evaluated the expression of miRNA in the blood of ASD patients and analyzed the repression targets of these miRNAs, correlating them with biochemical pathways that may be deregulated in ASD. We

propose that the miRNA expression profile may be used as a clinical marker for the diagnosis or prognosis of the disorder, and that epigenetic changes may help in understanding the disease.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the subjects' parents provided informed consent before inclusion in the study. Eleven patients attending an outpatient clinic of the HCPA were included in the study, following a semi-structured interview. Clinical diagnosis was confirmed by criteria defined by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V and Autism Screening Questionnaire. Seven ASD male patients with a mean age of 7.5 years (sd 2.5) and four non-ASD male controls with a mean age of 7.5 years (sd 2.5) was carried out. The ASD subjects were enrolled in the same autism severity group by two well-validated clinical tests: the Childhood Autism Rating Scale (CARS) [19] and Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic (ADOS-G) [20]. Exclusion criteria were as follows: a) comorbidities such as chromosomal syndromes; b) genetic or metabolic disease. Non-ASD male children were included after clinical diagnosis that excluded: (a) presence of psychiatric disorder, (b) presence of ASD patients in family, (c) presence of chromosomal syndrome, (d) genetic or metabolic disease.

2.2. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

MicroRNA profile evaluations were evaluated from peripheral blood samples were obtained from patient and immediately mixed with a three-fold volume of Trizol (Invitrogen) for total RNA extraction.

Considering some common aspects among the different disorders that affect the Central Nervous System, the 26 candidate miRNAs evaluated in this study, were based in previous studies in the literature conducted with patients with sleep disturbances [21] or who had some neurodegenerative diseases [22,23].

miRNA quantification was carried out by quantitative RT-qPCR using a stem-loop RT-PCR technique, as previously described [24]. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from mature miRNA using a reverse transcriptase reaction containing 2 µg of total RNA, 1 µL of 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 3 µL of stem loop RT primer mix, 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 (Invitrogen, USA), 1.0 µL of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA), and sterile distilled water to a final volume of 20 µL. The synthesis of cDNA was completed after a sequence of four incubations at 16 °C for 30 min, 42 °C for 30 min, 85 °C for 5 min and 4 °C for 10 min.

The quantitative PCR mix was made up with 12 µL of cDNA (1:33), 1.0 µL of specific miRNA forward and universal reverse (10 µM) primers (as detailed in Table 1), 0.5 µL of 10 µM dNTP mix, 2.5 µL of 10X PCR buffer (Invitrogen, USA), 1.5 µL of 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, USA), 2.4 µL of 1X Sybr Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 0.1 µL of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), and sterile distilled 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 (melting temperature) estimation using data obtained from an Applied Biosystems StepOne System (Lincoln Centre Drive Foster City, CA, USA). After the main amplification step, sample fluorescence was measured at temperatures from 55–99°C, with an increasing ramp of 0.1°C, in order to obtain

the denaturing curve of the amplified products and to assure their homogeneity after peak detection and T_m estimation using data obtained from Applied Biosystems StepOne Plus.

The relative expression was obtained in triplicate using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, where the Crossing threshold (C_t) values of the target samples are subtracted from the average C_t values of the standard or control samples. The use of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ is adequate, as the amount of RNA among the different blood samples to produce the cDNAs did not differ significantly and produced similar C_t values among the samples for 4 different miRNA used in the initial screening and evaluated by Genorm software. The Genorm analysis was used to assess the variance in the expression levels among the miRNA and pairwise comparisons. This resulted in 4 control miRNA, the most stable ones, for every pairwise comparison, serving as normalizers to evaluate the relative expression of miRNA. The RT-qPCR results were analyzed by Genorm algorithm to assess the variance in expression levels of the miRNA studied. This program performed a scan of the present miRNA from groups compared two by two each time. Then, the expression stabilities of the set of miRNA were evaluated. All miRNA were ranked according to their stability value. A pairwise variation analysis was performed by Genorm to determine the number of miRNA required for accurate normalization and to identify which miRNA could be used as internal control.

Table 1. Information about miRNA evaluated. ID, Chromosome localization, Accession miRBase (www.mirbase.org), Mature Sequence and Forward Primer.

ID	Chromosome	Accession miRBase	Mature Sequence	Forward Primer
hsa-miR-19b-1-5p	13	MI0000074	AGUUUUGCAGUUUGCAUCCAGC	AGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGC
hsa-miR-24-2-5p	19	MI0000081	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	TGCCTACTGAGCTGAAACACAG
hsa-miR-25-3p	7	MI0000082	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	CATTGCACTGTCTCGGTCTGA
hsa-miR-27a-3p	19	MI0000085	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC
hsa-miR-29b-2-5p	1	MI0000107	CUGGUUUACAUGUGGCUUAG	CTGGTTTACATGGTGGCTTAG
hsa-miR-31-5p	9	MI0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
hsa-miR-34a-5p	1	MI0000268	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTGT
hsa-miR-34c-5p	11	MI0000743	AGGCAGUGUAGUAGCUGAUUGC	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
hsa-miR-92a-2-5p	X	MI0000094	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUAC	GGGTGGGATTGTGCATTAC
hsa-miR-99a-5p	21	MI0000101	AACCCGUAGAUCGCAUCUUGUG	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
hsa-miR-125a-5p	19	MI0000469	UCCUGAGACCCUUUAACCCUGUGA	TCCCTGAGACCCTTAACCTGTGA
hsa-miR-125b-1-3p	11	MI0000446	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
hsa-miR-125b-2-3p	21	MI0000470	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	TCACAAGTCAGGCTCTTGGGAC
hsa-miR-145-5p	5	MI0000461	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTCCAGGAATCCCT
hsa-miR-181b-5p	1	MI0000270	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	AACATTCAUUGCTGTGGTGGGT
hsa-miR-191-5p	3	MI0000465	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	CAACGGAATCCAAAAGCAGCTG
hsa-miR-193a-5p	17	MI0000487	UGGGUCUUUGCGGGCAGAUGA	TGGGTCTTTCGGGCGAGATGA
hsa-miR-193b-3p	16	MI0003137	AACUGGCCCUCAAAGUCCGCU	AACTGGCCCTCAAAGTCCCGCT
hsa-miR-198	3	MI0000240	GGUCCAGAGGGAGAUAGGUUC	GGTCCAGAGGGGAGATAGGTTC
hsa-miR-199a-5p	19	MI0000242	CCCAGUGUUCAGACUACCCUGUUC	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTC
hsa-miR-210-3p	11	MI0000286	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
hsa-miR-214-3p	1	MI0000290	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT
hsa-miR-221-3p	X	MI0000298	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	AGCTACATTGTCTGCTGGTTC
hsa-miR-222-3p	X	MI0000299	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGTACATCTGGCTACTGGGT
hsa-miR-339-5p	7	MI0000815	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	TCCCTGTCTCCAGGAGCTCACG
hsa-miR-370-3p	14	MI0000778	GCCUGCUGGGUGGAACCCUGGU	GCCTGCTGGGTGGAACCTGGT

2.3. Statistical Analysis

To assess whether ASD patients and controls were homogeneous for age and gender the Chi-squared test was used. Statistical analysis of the relative expression values obtained for each miRNA in the experimental group was performed by Student's *t*-test implemented using the SPSS Statistics 17 software. In order to compare the expression levels between the two experimental groups, the Waller–Duncan and Tukey HSD tests were performed with SPSS 17, with identical group discrimination and similar probability values.

Each altered miRNA has a cluster of validated targets, which were predicted for at least two available programs for experimental assays (miRBase).

The protein clusters were formed by the STRING 10 software using an automatic force-directed layout algorithm that orders the nodes in the network. The algorithm works iteratively trying to position the nodes apart from each other with a “preferred distance” proportional to the String global score (<https://string-db.org/>). All nucleotide sequences were screened and evaluated through miRBase and, after the ready profile, miRBase data banks were searched for altered microRNA targets (www.mirbase.org).

3. Results

From a total of 26 miRNAs evaluated (Table 1), seven were statistically altered in ASD patients in comparison with control group. Specifically, miR34c-5p (Figure 1; $p = 0.0068$), miR-145-5p (Figure 2; $p = 0.0099$), miR92a-2-5p (Figure 3; $p = 0.0026$) and miR199a-5p (Figure 4; $p = 0.047$) were up-regulated, while miR19b-1-5p (Figure 5; $p = 0.0184$), miR27a-3p (Figure 6; $p = 0.0001$) and miR193a-5p (Figure 7; $p = 0.001$) were down-regulated comparing the ASD patients with the control group. Additionally, the validated targets of the seven altered miRNA are shown in protein clusters (Figures 1b–7b), except for the miR92a-2-5p, which does not have validated targets in *Homo sapiens*. The results for Genorm revealed ubiquitous and stably expressed normalization by RT-qPCR: miR125a-5p, miR181b-5p, miR125b-2-3p, miR198. Thus, each alerted miRNA was calculated from 4 normalizing miRNA.

Each altered miRNA has a cluster of validated targets, which were predicted for at least two available programs for experimental assays (miRBase). Using the STRING 10 software and information from validated targets for each miRNA available at the miRBase website (mirbase.org), we predicted the pathways that may be involved in ASD.

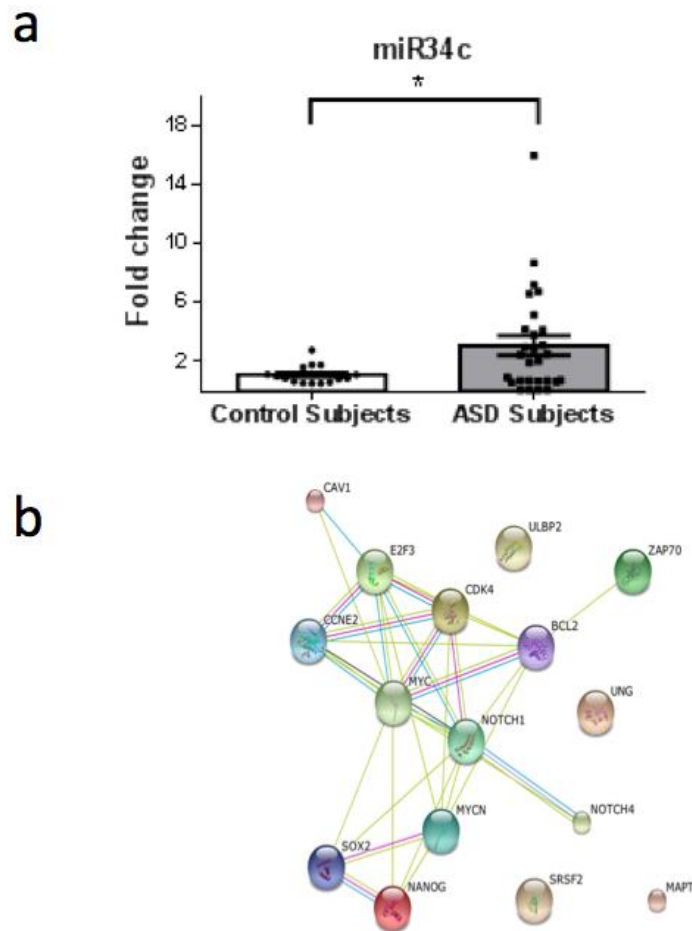


Figure 1. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR34c in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR34c selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Proteins involved in epigenetic regulation: NANOG (Nanog homeobox); NOTCH1 (notch 1); SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2); SRSF2 (serine/arginine-rich splicing factor 2); NOTCH4 (notch 4); E2F3 (E2F transcription factor); MYCN (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived); MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog). Proteins involved in cell cycle: CCNE2 (cyclin E2); BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2). Proteins involved in immunological regulation: ZAP70 (zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa); ULBP2 (UL16 binding protein 2); CDK4 (cyclin-dependent kinase 4); CAV1 (caveolin 1). Protein associated with cytoskeleton stabilization in neuronal cell: MAPT (microtubule-associated protein tau (776 aa)). Protein involved in DNA repair: UNG (uracil-DNA glycosylase).

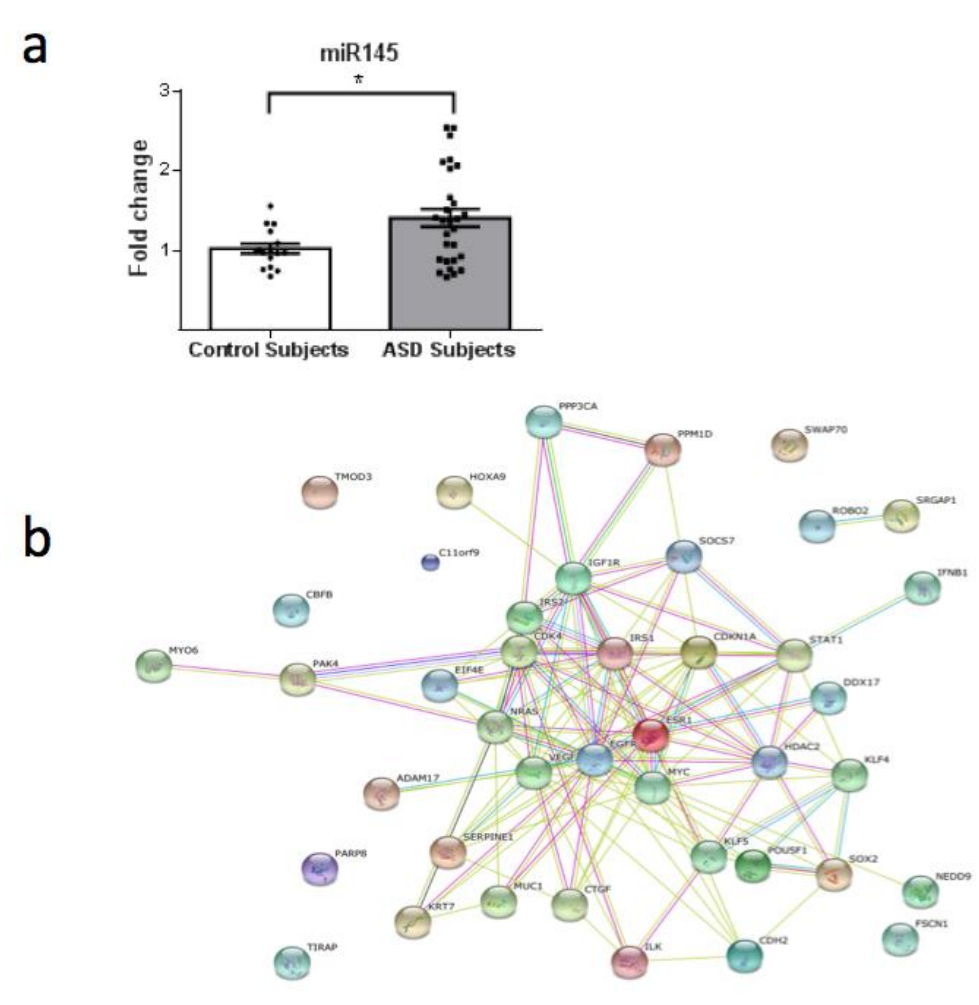


Figure 2. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR145 in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR145 selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Proteins involved in epigenetic regulation: ERS1 (estrogen receptor 1); POU5F1 (POU class 5 homeobox 1 (360 aa)); C11orf9 (chromosome 11 open reading frame 9); PARP8 (poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8 (854 aa)); SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2); HOXA9 (homeobox A9); STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1); KLF4 (Kruppel-like factor 4); KLF5 (Kruppel-like factor 5); NEDD9 (neural precursor cell expressed); DDX17 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17); EIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E); CBF β (core-binding factor, beta subunit); HDAC2 (histone deacetylase 2). Proteins involved in cell cycle: CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)); CDK4 (cyclin-dependent kinase 4); MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog); PPM1D (protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D); KRT7 (keratin 7). Proteins involved in immunological regulation: IFNB1 (interferon beta 1 fibroblast); TIRAP (toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein); SOCS7 (suppressor of cytokine signaling 7); ADAM17 (ADAM metallopeptidase domain 17). Proteins involved in insulin metabolism: IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor), IRS1 (insulin receptor substrate 1); IRS2 (insulin receptor substrate 2). Proteins associated with cytoskeleton and cell migration: SWAP70 (SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit); ILK (integrin-linked kinase); MYO6 (myosin VI); FSCN1 (fascin homolog 1, actin-bundling protein); ROBO2 (roundabout, axon guidance receptor, homolog 2); CDH2 (cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)), TMOD3 (tropomodulin 3 (ubiquitous)); SRGAP1 (SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1); PAK4 (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4). Others: SERPINE1 (serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen

activator inhibitor type 1)); EGFR (epidermal growth factor receptor); NRAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog); VEGFA (vascular endothelial growth factor A); PPP3CA (protein phosphatase 3, catalytic subunit); CTGF (connective tissue growth factor); MUC (mucin 1).

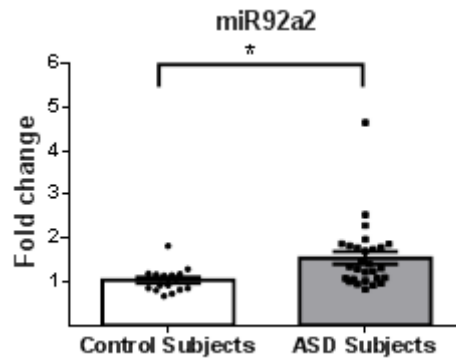


Figure 3. Scatter plot of differential relative expression of miR92a2 in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. miR92a2 does not have validated targets in Homo sapiens.

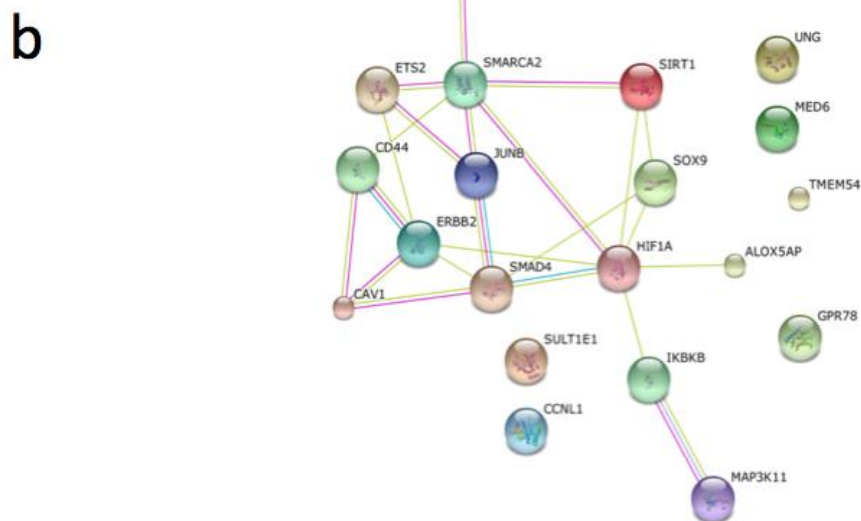
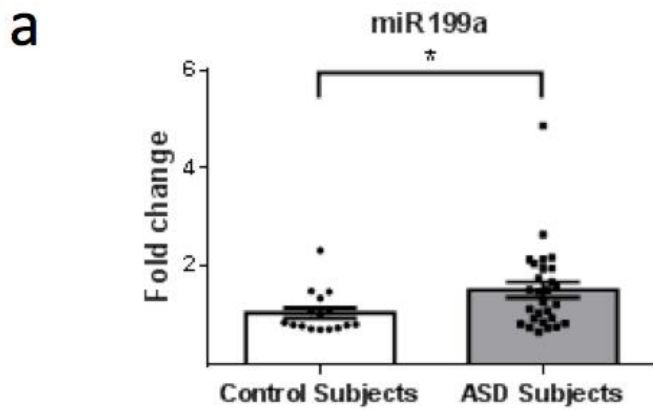
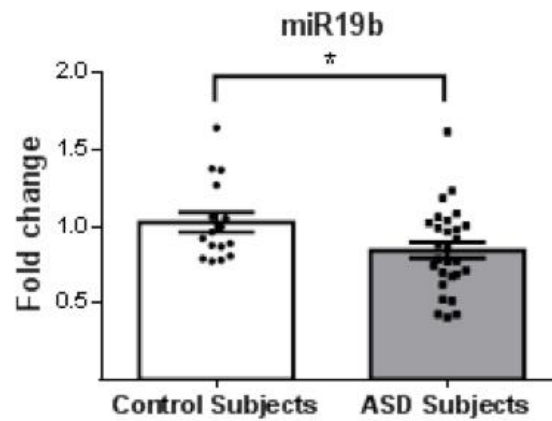


Figure 4. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR199a in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR199a selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Proteins involved in epigenetic regulation: SIRT1 (sirtuin 1); SOX9 (SRY (sex determining region Y)-box 9); MED6 (mediator complex subunit 6); SMARCA2 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2); CCNL1 (cyclin L1); JUNB (jun B proto-oncogene); HIF1A (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit); ETS2 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2); MECP2 (methyl-CpG binding protein 2). Proteins involved in immunological regulation: CAV1 (caveolin 1); SMAD4 (SMAD family member 4); ALOX5AP (arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein); CD44 (CD44 molecule); IKBKB (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells). Protein associated with cytoskeleton and cell migration: ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2). Protein involved in DNA repair: UNG (uracil-DNA glycosylase). Protein involved in strogen metabolim: SULT1E1 (sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1). Others: MAP3K11 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11); TMEM54 (transmembrane protein 54); GPR78 (G protein-coupled receptor 78; Orphan receptor).

a



b

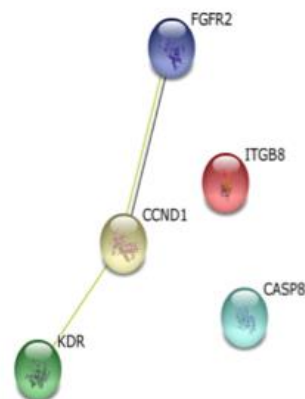


Figure 5. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR19b in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR19b selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Protein involved in cell cycle: CCND1 (cyclin D1). Proteins associated with cytoskeleton: ITGB8 (integrin, beta 8); KDR (kinase insert domain receptor). Others: CASP8 (caspase 8); FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2).

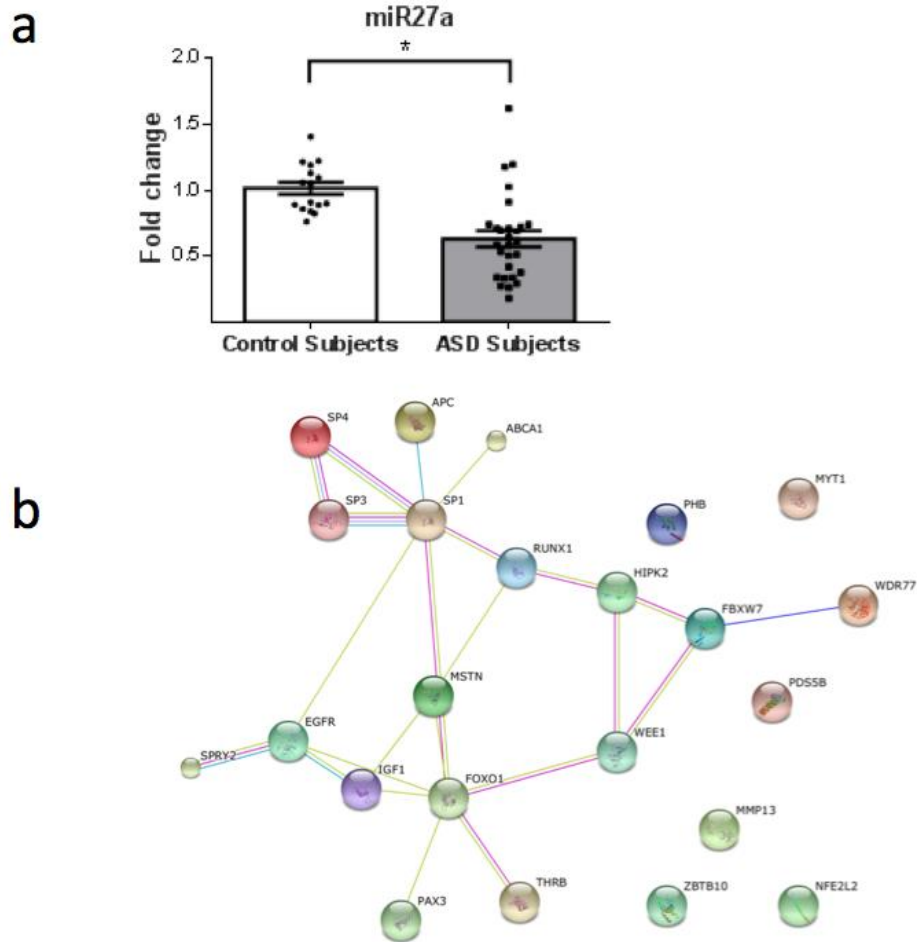


Figure 6. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR27a in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR27a selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Proteins involved in epigenetic regulation: SP4 (Sp4 transcription factor); SP3 (Sp3 transcription factor); WDR77 (WD repeat domain 77); RUNX1 (runt-related transcription factor 1); MYT1 (myelin transcription factor 1); SP1 (Sp1 transcription factor); FOXO1 (forkhead box O1); PAX3 (paired box 3); NFE2L2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2); HIPK2 (homeodomain interacting protein kinase 2); ZBTB10 (zinc finger and BTB domain containing 10). Proteins involved in cell cycle: PHB (prohibitin), WEE1 (WEE1 homolog). Others: APC (adenomatous polyposis coli), MMP13 (matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)); MSTN (myostatin); EGFR (epidermal growth factor receptor); FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing 7); IGF1 (insulin-like growth factor 1); PDS5B (regulator of cohesion maintenance, homolog B); THR (thyroid hormone receptor, beta); ABCA1 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1); SPRY2 (sprouty homolog 2).

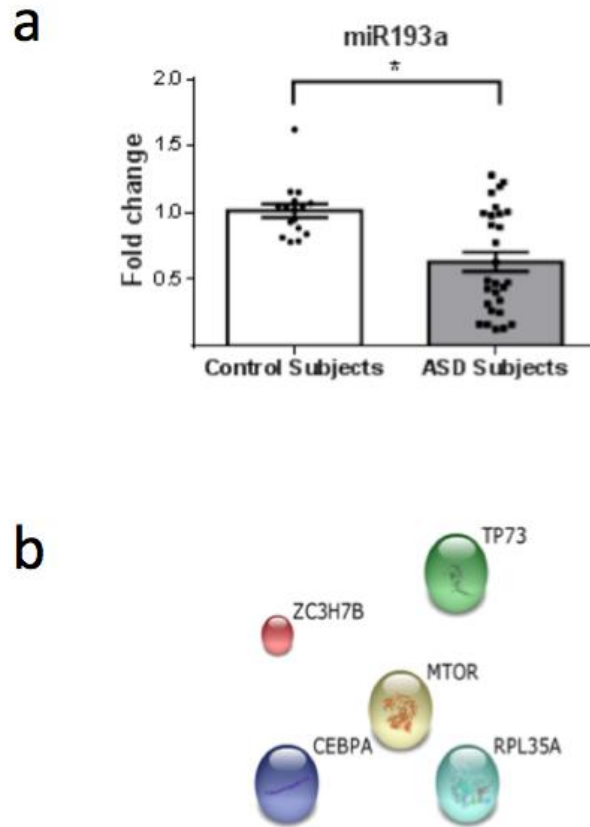


Figure 7. (a) Scatter plot of differential relative expression of miR193a in peripheral blood of ASD subjects compared to control subjects. Results expressed as mean \pm standard error. *t*-Test analysis; * $p < 0.05$. (b) mRNA validates targets for miR193a selected in miRBase and respective proteins clusters that can be involved in ASD. Protein associated with central regulation of cellular metabolism, growth and survival in response to hormones, growth factors, nutrients, energy and stress signals: MTOR (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase). Protein involved in cell cycle: TP73 (tumor protein p73). Others: ZC3H7B (zinc finger CCCH-type containing 7B); RPL35A (ribosomal protein L35a); CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha).

4. Discussion

ASD is characterized by tremendous phenotypic heterogeneity and the individuals affected demonstrate different levels of behavioral commitment. Considering the differences among ASD individuals, our study aimed to evaluate only one level in the autism spectrum, since the samples tested were only boys that had been clinically diagnosed with classical autism as well established by CARS [19] and (ADOS-G) [20]. As ASD has no biological marker and its etiology is unknown, our research may open new perspectives for investigating cellular processes that occur in affected individuals. The understanding of epigenetic alterations, such as miRNA modifications, could help in elucidate some relevant aspects of ASD, especially in classic autism. Immunological differences could explain the neuro-immunoregulation observed in ASD patients and based in the results shown here, we identified targets that could potentially be affected by altered miRNAs using the miRBase database. The influence of decreased levels of miRNA in ASD patients should be discussed given the fact that the miRNA targets identified are involved in several biological functions that have been previously reported to be dysregulated in ASD, such as cell cycle regulation, axon development and guidance, dendritic spine development and function, protein synthesis regulation and immune response. In

addition, it should be taken into account that the intracellular targets for these altered miRNA might also be altered in autistic patients and that this data opens an interesting area of investigation, particularly in blood cell signaling and profiling. Besides the possibility of using this set of miRNA biomarkers for the diagnosis and prognosis of ASD, it is important to understand the pathways that are involved in the regulation of those molecules. Immune aberrations consistent with dysregulated immune responses have been reported in autistic children, including skewed TH1/TH2 cytokine profiles [25], low natural killer (NK) cell activity [26] and an imbalance in serum immunoglobulin levels [27]. In addition, ASD has been linked to autoimmunity and chronic neuroinflammation caused by glutamatergic excitotoxicity and diminished GABAergic signals [28].

The majority of the target proteins of miR34c-5p (Figure 1b)—which is up-regulated in ASD patients—are involved in cell cycle control, such as MYC and MYB. The most important target of miR34c-5p is ZAP70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70), a signaling protein involved in immunological development and response. ZAP70 is one of the main proteins involved in lymphocyte activation and function and is also important for NK activity [29]. Additionally, cell-mediated immunity was impaired in ASD patients, as observed by low numbers of CD4⁺ cells and a concomitant T-cell polarity with an imbalance of Th1/Th2 subsets towards Th2 and the presence of autoantibodies against brain proteins [30]. Inhibition of ZAP70 protein expression could modify the adaptive response and the development of thymocytes. In a study involving 1027 blood samples from autistic children, 45% of a subgroup of children with autism suffered from low NK cell activity [27]. In another study, the cytotoxicity of NK cells was significantly reduced in ASD, as compared with controls [31]. Furthermore, under similar conditions, the presence of perforin, granzyme B, and interferon-gamma (IFN- γ) in NK cells from ASD children was significantly lower in comparison to controls [31]. Similarly, it is sustained that lower levels in CD57⁺CD3⁻ lymphocyte, a subset of NK cells, could be a possible link to a subgroup of ASD [26]. These findings suggest a possible dysfunction of NK cells in children with ASD. Therefore, during critical periods of development, abnormalities in NK cells could represent a susceptibility factor in ASD, that predispose to the development of autoimmunity and/or adverse neuroimmune interactions as already reported [31].

Furthermore, ASD is a neurodevelopmental disorder associated with abnormal neuroplasticity in early development [32]. Another target of miR34c-5p (Figure 1b) is a protein associated with cytoskeleton stabilization in neuronal cell: MAPT (microtubule-associated protein tau with 776 amino acids). The mRNA that encodes MAPT is regulated by alternative splicing, giving rise to several mRNA species [33]. MAPT transcripts are differentially expressed in the nervous system, depending on the stage of neuronal maturation and neuron type [34]. Additionally, mutations in this gene are also associated with neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Pick's disease, frontotemporal dementia, cortico-basal degeneration and progressive supranuclear palsy [35]. Our findings suggest that by epigenetic modifications a negative regulation occurs in the MAPT protein, since changes in neuronal maturation have been widely reported in patients with ASD [33,34]. With regard to epigenetic regulation, the recruitment of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) is considered a key element in the dynamic regulation of many genes playing important roles in cellular proliferation and differentiation. The recruitment of HDACs leads to transcriptional repression and inhibitors of this enzymatic activity could reverse aberrant repression and lead to re-expression of genes inducing cell differentiation. In consonance with this hypothesis, the use of Valproic Acid (VPA), a widely used antiepileptic drug, which induces proteasomal degradation of HDAC2 and also inhibits selectively the catalytic activity of class I HDACs [36], during pregnancy is a risk factor associated with the increased incidence of ASD [37]. In this study, we observed that miR145-5p (Figure 2) is up-regulated in ASD patients and could promote mRNA degradation of HDAC2, thus inducing suppression of protein

synthesis, since HDAC2 is a validated target of miR145-5p. Therefore, an autistic phenotype could be linked to HDAC2 deregulation due to mir145 up-regulation in our patients.

Considering that SIRT1 enzyme is a NAD⁺ dependent deacetylase involved in a wide range of cellular processes, it was already shown that SIRT1 negatively regulates the mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling, potentially through the TSC1/2 complex [38]. The TSC1/2-mTOR signaling pathway is reported to have a crucial role in mRNA translation during brain development and thus could serve as a crucial pathogenic mechanism in ASD. Furthermore, the up-regulation of miR-199a-5p (Figure 4) may induce a down-regulation of SIRT1 in ASD patients (Figure 8). Additionally, mTOR is a target of miR-193a, another miRNA found to be down-regulated in our study (Figure 7a). TSC1 is a predictive target of miR92a-2a (Figure 3), which was up-regulated in our ASD patients, possibly demonstrating and supporting epigenetic regulation in ASD patients, due to alterations in miRNA in this pathway.

On the other hand, this study demonstrated that the expression of miR-27a-3p (Figure 6) was significantly decreased in ASD patients. Therefore, its mRNA targets could reduce the repression of mRNA translation. An example of a target of miR-27a-3p is insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which acts through IGF-1 receptor (IGF-1R, a tyrosine-kinase receptor) [39] and plays a pivotal role in several cellular responses (Figure 8). IGF-1 is a pleiotropic signal in the developing cerebellum, regulating proliferation, neurite outgrowth and survival [40]. The activated IGF-1R activates several phosphorylation cascades being one of the most commonly, the phospho-tidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway. PI3K can induce activation of phosphokinase B/Akt (Akt), leading to inhibition of glycogen synthase-kinase-3-beta (GSK3 β), and could promote proliferation and survival [41]. The Akt-mTOR pathway is dysregulated in multiple animal models of monogenic causes of ASD, including fragile X mental retardation [42], Rett Syndrome [43] and tuberous sclerosis [44], whereas IGF-1 ligands may improve neurodevelopmental symptoms in Rett Syndrome [45]. In addition, our results show down-regulation of miR-27a (Figure 6) in ASD patients and this could facilitate PI3K activation, indicating that the PI3K/Akt pathway could be up-regulated, which could be involved in the cellular growth, proliferation, migration and adhesion [46].

Remarkably, we found that MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2), which is involved in Rett Syndrome (RTT), is a target of miR-199a. RTT is an X-linked postnatal neurodevelopmental disorder, which is primarily caused by mutations in the gene encoding MeCP2 [47]. A number of MeCP2 target genes have been identified, including the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [48]. Several RTT mutations have been described that render MeCP2 incapable of binding to methylated DNA and/or repressing gene transcription. This protein dysfunction has also been shown to cause abnormalities in RNA splicing, suggesting a complex molecular pathogenesis [49]. The loss of the function of the MeCP2 protein leads to autistic behaviors in RTT syndrome. As such, as MeCP2 is a known target of a miRNA found to be altered in our patients with classic autism, we suggest that the MeCP2 protein is decreased by epigenetic inhibition, leading to autistic behavior similar to that observed in patients affected by a mutation in the MeCP2 gene.

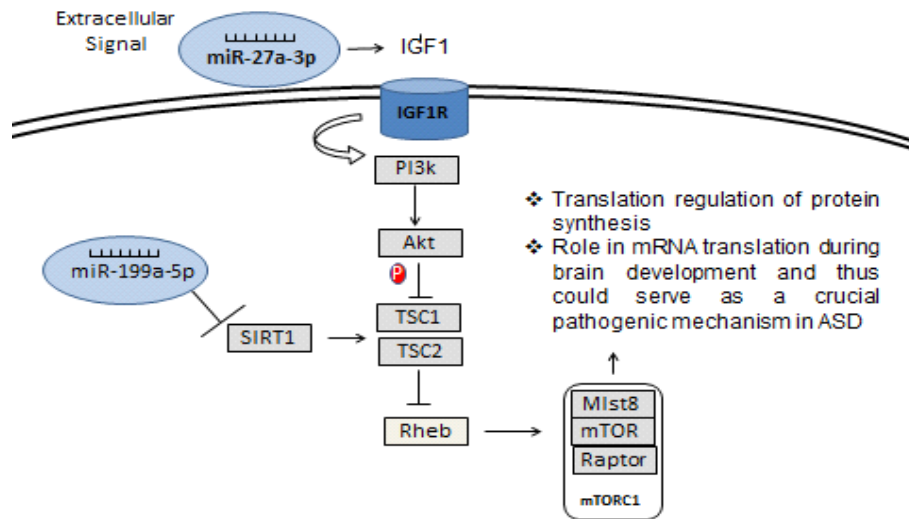


Figure 8. miRNA regulatory pathway in the control of the protein synthesis through SIRT1 – TSC:mTOR.

5. Conclusions

Despite the intense investigation of the genetic factors involved in ASD, there is still no consensus as to the main causative candidate genes. Therefore, studies of epigenetic regulation could identify altered mechanisms and elucidate the etiology of this disorder. This study shows changes in miRNA levels in patients that could explain many phenotypic features in the spectrum. The investigation of the modulation of proteins that regulate gene expression seems to be a correct path to follow, since the heterogeneity of the disease is an important factor and could be explained by the different levels of regulation. Although the small number of subjects enrolled in our study limits our data, we believe that the results presented here are innovative and important to increase the knowledge in the ASD field. Furthermore, it is important to highlight that the ASD subjects presented the same autism severity, and considering the accuracy and strength of the methodology used, this study produce important hypotheses that should be better explored in future studies. The alterations surveyed in the blood can be seen as permanent changes and correlate from the embryonic development of affected individuals. In addition, the altered miRNA set found in this study may be analyzed in a future molecular diagnosis of the disorder, since the alterations found corroborate with clinical and biochemical situations. The quantification of altered miRNA expression may be used for the prognosis of ASD, as scales of impairment may be made, since this disorder presents a spectrum of severity levels.

Author Contributions: Conceptualization, T.d.S.V.; Methodology, T.d.S.V. and J.M.S.; Software, T.d.S.V. and T.V.; Validation, T.d.S.V., J.M.S and T.V.; Formal Analysis, T.d.S.V. and T.V; Investigation, T.d.S.V., J.M.S. and S.S.; Resources, T.d.S.V., J.M.S., S.S., T.V., D.O.S. and R.F.d.A.; Data Curation, T.d.S.V., J.M.S. and S.S.; Writing-Original Draft Preparation, T.d.S.V.; Writing-Review & Editing, T.V., D.O.S. and R.F.d.A; Visualization, D.O.S.; Supervision, T.V. and R.F.d.A; Project Administration, D.O.S. and R.F.d.A.; Funding Acquisition, D.O.S.

Funding: This work was supported by CAPES, CNPq and FIPE-HCPA.

Acknowledgments: We would like to thank the individuals who contributed their time and dedication to this study: patients, control children, their parents and the professionals of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, without whom the study would not have been possible.

Conflicts of Interest: Authors declare no actual or potential conflicts of interest. No competing financial interests exist.

References

1. Baio, J.; Wiggins, L.; Christensen, D.L.; Maenner, M.J.; Daniels, J.; Warren, Z.; Kurzius-Spencer, M.; Zahorodny, W.; Robinson Rosenberg, C.; White, T.; et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.* **2018**, *67*, 1–23.
2. Persico, A.M.; Napolioni, V. Autism Genetics. *Behav. Brain Res.* **2013**, *251*, 95–112.
3. Cristino, A.S.; Williams, S.M.; Hawi, Z.; An, J.Y.; Bellgrove, M.A.; Schwartz, C.E.; Costa Lda, F.; Claudianos, C. Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders Represent an Interconnected Molecular System. *Mol. Psychiatry* **2014**, *19*, 294–301.
4. Glessner, J.T.; Connolly, J.J.; Hakonarson, H. Genome-Wide Association Studies of Autism. *Curr. Behav. Neurosci. Rep.* **2014**, *1*, 234–241.
5. Meek, S.E.; Lemery-Chalfant, K.; Jahromi, L.B.; Valiente, C. A Review of Gene-environment Correlations and Their Implications for Autism: A Conceptual Model. *Psychol. Rev.* **2013**, *120*, 497–521.
6. Grafodatskaya, D.; Brian C.; Szatmari, P.; Weksberg, R. Autism Spectrum Disorders and Epigenetics. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2010**, *49*, 794–809.
7. Siniscalco, D.; Cirillo, A.; Bradstreet, A.J.; Antonucci, A. Epigenetic Findings in Autism: New Perspectives for Therapy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 4261–4273.

8. Huang, F.; Long, Z.; Chen, Z.; Li, J.; Hu, Z.; Qiu, R.; Zhuang, W.; Tang, B.; Xia, K.; Jiang, H. Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. *PLoS ONE* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0129052.
9. Delcuve, G.P.; Mojgan, R.; Davie, J.R. Epigenetic Control. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *219*, 243–250.
10. Abdul, Q.A.; Yu, B.P.; Chung, H.Y.; Jung, H.A.; Choi, J.S. Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Arch. Pharm. Res.* **2017**, doi:10.1007/s12272-017-0973-3.
11. Lv, J.; Yongjuan, X.; Wenhao, Z.; Zilong, Q. The Epigenetic Switches for Neural Development and Psychiatric Disorders. *J. Genet. Genom.* **2013**, *40*, 339–346.
12. Kim, V.N. MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 376–385.
13. Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
14. Kapsimali, M.; Kloosterman, W.P.; de Bruijn, E.; Rosa, F.; Plasterk, R.H.; Wilson, S.W. MicroRNAs Show a Wide Diversity of Expression Profiles in the Developing and Mature Central Nervous System. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R173.
15. Lai, C.Y.; Yu, S.L.; Hsieh, M.H.; Chen, C.H.; Chen, H.Y.; Wen, C.C.; Huang, Y.H.; Hsiao, P.C.; Hsiao, C.K.; Liu, C.M.; et al. MicroRNA Expression Aberration as Potential Peripheral Blood Biomarkers for Schizophrenia. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0021635.
16. Zovoilis, A.; Agbemenyah, H.Y.; Agis-Balboa, R.C.; Stilling, R.M.; Edbauer, D.; Rao, P.; Farinelli, L.; Delalle, I.; Schmitt, A.; Falkai, P.; et al. microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J.* **2011**, *30*, 4299–4308.
17. Hunt, A.; Shepherd, C. A Prevalence Study of Autism in Tuberous Sclerosis. *J. Autism Dev. Disord.* **1993**, *23*, 323–339.
18. Creemers, E.E.; Tijssen, A.J.; Pinto, Y.M. Circulating microRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ. Res.* **2012**, *110*, 483–495.
19. Schopler, E.; Reichler, R.J.; DeVellis, R.F.; Daly, K. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J. Autism Dev. Disord.* **1980**, *10*, 91–103.
20. Lord, C.; Rutter, M.; Dilavore, P.; Risi, S. *Autism Diagnostic Observation Schedule*; Western Psychological Services: Los Angeles, CA, USA, 1999.
21. Davis, C.J.; Bohnet, S.J.; Meyerson, J.M.; Krueger, J.M. Sleep loss changes microRNA levels in the brain: A possible mechanism for state-dependent translational regulation. *Neurosci. Lett.* **2007**, *422*, 68–73.
22. Barbato, C.; Ruberti, F.; Cogoni, C. Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, doi:10.1155/2009/871313.
23. Eacker, S.M.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Understanding microRNAs in neurodegeneration *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, doi:10.1038/nrn2726.
24. Chen, C.; Ridzon, D.A.; Broomer, A.J.; Zhou, Z.; Lee, D.H.; Nguyen, J.T.; Barbisin, M.; Xu, N.L.; Mahuvakar, V.R.; Andersen, M.R.; et al. Real-Time Quantification of microRNAs by Stem-Loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e179.
25. Gupta, S.; Aggarwal, S.; Roshanravan, B.; Lee, T. Th1- and Th2-like Cytokines in CD4+ and CD8+ T Cells in Autism. *J. Neuroimmunol.* **1998**, *85*, 106–109.
26. Siniscalco, D.; Mijatovic, T.; Bosmans, E.; Cirillo, A.; Kruzliak, P.; Lombardi, V.C.; Meirleir, K.; Antonucci, N. Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. *In Vivo* **2016**, *30*, 83–89.
27. Vojdani, A.; Mumper, E.; Granpeesheh, D.; Mielke, L.; Traver, D.; Bock, K.; Hirani, K.; Neubrandner, J.; Woeller, K.N.; O'Hara, N.; et al. Low Natural Killer Cell Cytotoxic Activity in Autism: The Role of Glutathione, IL-2 and IL-15. *J. Neuroimmunol.* **2008**, *205*, 148–154.
28. Zantomio, D.; Chana, G.; Laskaris, L.; Testa, R.; Everall, I.; Pantelis, C.; Skafidas, E. Convergent Evidence for mGluR5 in Synaptic and Neuroinflammatory Pathways Implicated in ASD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2015**, *52*, 172–177.
29. Fischer, A.; Picard, C.; Chemin, K.; Dogniaux, S.; le Deist, F.; Hivroz, C. ZAP70: A Master Regulator of Adaptive Immunity. *Semin. Immunopathol.* **2010**, *32*, 107–116.

30. Castellani, M.L.; Conti, C.M.; Kempuraj, D.J.; Salini, V.; Vecchiet, J.; Tete, S.; Ciampoli, C.; Conti, F.; Cerulli, G.; Caraffa, A.; et al. Autism and Immunity: Revisited Study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2009**, *22*, 15–19.
31. Enstrom, A.M.; Lit, L.; Onore, C.E.; Gregg, J.P.; Hansen, R.L.; Pessah, I.N.; Hertz-Picciotto, I.; Van de Water, J.A.; Sharp, F.R.; Ashwood, P. Altered Gene Expression and Function of Peripheral Blood Natural Killer Cells in Children with Autism. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 124–133.
32. Kwan, K.Y. Transcriptional Dysregulation of Neocortical Circuit Assembly in ASD. *Int. Rev. Neurobiol.* **2013**, *113*, 167–205.
33. Caillet-Boudin, M.L.; Buée, L.; Sergeant, N.; Lefebvre, B. Regulation of Human MAPT Gene Expression. *Mol. Neurodegener.* **2015**, *10*, 28.
34. Iovino, M.; Agathou, S.; González-Rueda, A.; Del Castillo Velasco-Herrera, M.; Borroni, B.; Alberici, A.; Lynch, T.; O'Dowd, S.; Geti, I.; Gaffney, D.; et al. Early Maturation and Distinct Tau Pathology in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with MAPT Mutations. *Brain* **2015**, doi:10.1093/brain/awv222.
35. Wang, J.Z.; Gao, X.; Wang, Z.H. The Physiology and Pathology of Microtubule-Associated Protein Tau. *Essays Biochem.* **2014**, *56*, 111–123.
36. Krämer, O.H.; Zhu, P.; Ostendorff, H.P.; Golebiewski, M.; Tiefenbach, J.; Peters, M.A.; Brill, B.; Groner, B.; Bach, I.; Heinzl, T.; et al. The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Selectively Induces Proteasomal Degradation of HDAC2. *EMBO J.* **2003**, *22*, 3411–3420.
37. Gardener, H.; Spiegelman, D.; Buka, S.L. Prenatal Risk Factors for Autism: Comprehensive Meta-Analysis. *Br. J. Psychiatry* **2009**, *195*, 7–14.
38. Ghosh, H.S.; McBurney, M.; Robbins, P.D. SIRT1 Negatively Regulates the Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9199.
39. Bondy, C.A.; Cheng, C.M. Signaling by Insulin-like Growth Factor 1 in Brain. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *490*, 25–31.
40. Lin, X.; Bulleit, R.F. Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Is a Critical Trophic Factor for Developing Cerebellar Granule Cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1997**, *99*, 234–242.
41. Chin, P.C.; D'Mello, S.R. Survival of Cultured Cerebellar Granule Neurons Can Be Maintained by Akt-Dependent and Akt-Independent Signaling Pathways. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2004**, *127*, 140–145.
42. Hoeffler, C.A.; Sanchez, E.; Hagerman, R.J.; Mu, Y.; Nguyen, D.V.; Wong, H.; Whelan, A.M.; Zukin, R.S.; Klann, E.; Tassone, F. Altered mTOR Signaling and Enhanced CYFIP2 Expression Levels in Subjects with Fragile X Syndrome. *Genes Brain Behav.* **2012**, *11*, 332–341.
43. Ricciardi, S.; Boggio, E.M.; Grosso, S.; Lonetti, G.; Forlani, G.; Stefanelli, G.; Calcagno, E.; Morello, N.; Landsberger, N.; Biffo, S.; et al. Reduced AKT/mTOR Signaling and Protein Synthesis Dysregulation in a Rett Syndrome Animal Model. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1182–1196.
44. Pollizzi, K.; Malinowska-Kolodziej, I.; Stumm, M.; Lane, H.; Kwiatkowski, D. Equivalent Benefit of mTORC1 Blockade and Combined PI3K-mTOR Blockade in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 38.
45. Tropea, D.; Giacometti, E.; Wilson, N.R.; Beard, C.; McCurry, C.; Fu, D.D.; Flannery, R.; Jaenisch, R.; Sur, M. Partial Reversal of Rett Syndrome-like Symptoms in MeCP2 Mutant Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2029–2034.
46. Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S.N.; Sonenberg, N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114.
47. Díaz de León-Guerrero, S.; Pedraza-Alva, G.; Pérez-Martínez, L. In Sickness and in Health: The Role of Methyl-CpG Binding Protein 2 in the Central Nervous System. *Eur. J. Neurosci.* **2011**, *33*, 1563–1574.
48. Sun, Y.E.; Wu, H. The Ups and Downs of BDNF in Rett Syndrome. *Neuron* **2006**, *49*, 321–323.
49. Cheng, T.L.; Zilong, Q. MeCP2: Multifaceted Roles in Gene Regulation and Neural Development. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30*, 601–609.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2. Correlation between species in microRNA regulation: A study in ASD patients and ASD animal model

Tamara da Silva Vaccaro¹, Julia Medeiros Sorrentino¹, Sócrates Salvador², Tiago Veit³, Diogo Onofre Souza¹ and Roberto Farina de Almeida^{1,*}

¹ Institute of Health's Basic Science, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil; tamara.genetica@gmail.com (T.d.S.V.); juliamsorrentino@gmail.com (J.M.S.); diogo.bioq@gmail.com (D.O.S.); almeida_rf@yahoo.com.br (R.F.d.A.)

² Pediatric Neurology Center, Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-903, RS, Brazil; socratessalvador@gmail.com (S.S)

³ Institute of Health's Basic Science, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-190, RS, Brazil; tiagoveit@terra.com.br (T.V.)

* Correspondence: almeida_rf@yahoo.com.br

Background

Autism spectrum disorders (ASDs) are complex, pervasive neurodevelopmental disorders that are characterized by dysfunctions in social interactions and communications and restricted interests or repetitive behavior that manifest in early childhood [1]. The physiopathology of ASD is unknown but genetic, immunological and environmental factors must be involved and recently a lot of studies have demonstrated that deregulation in epigenetic factors can be associated with the disorder course[2–5]. MicroRNA (miRNA) function as 21–24 nucleotide guide RNAs that use partial base-pairing to recognize target messenger RNA and repress their expression. As a large fraction of protein-coding genes are under miRNA control, production of the appropriate level of specific miRNAs at the right time and in the right place is integral to most gene regulatory pathways.[6]. There is an effort in science to describe common features and biological markers that may show evidence of disease, both for to understand the pathophysiology and to discover a effective treatment.

Valproate sodium (VPA) is classically known as deacetylase inhibitor[7] and is commonly used as an anticonvulsant and mood stabilizer, this drug is used in the animal model for this and other features and furthermore is associated with a high incidence of ASD in humans when used during pregnancy[8].

Among the animal models that mimic human disease, an animal model in wistar rat exists based on induction during pregnancy with VPA. The offspring is born with autism like behavior with several characteristics similar to those of ASD patients.

The aim of this study was to compare the microRNA expression profile in plasma of ASD patients and rats subjected to induction by VPA animal model.

Methods

For evaluation of microRNA profile were included seven ASD boys patients with a mean age of 7.5 years (sd 2.5) and four no-ASD boys with a mean age of 7.5 years (sd 2.5). For evaluation of microRNA profile were included three plasma samples of animal model and three plasma samples of animal control, both groups with 90 days of age. Peripheral blood samples were obtained and immediately mixed with a three-fold volume of Trizol (Invitrogen) for total RNA extraction.

Quantification was evaluated by quantitative real time PCR (RT-qPCR) of microRNAs by stem-loop RT-PCR, as described by [9]. Mature miRNA cDNA (table 1 for ASD patients and table 2 for ASD animal model) was synthesized according to the following: 100 ng of total RNA (1:20); 4ul of stem loop primer mix (0.4uM each); 0.4ul of M-MLV reverse transcriptase (Promega) 200 U/ul; 4ul M-MLV reverse transcriptase 5X reaction buffer (Promega) and 2ul of 5mM dNTP in a final volume of 20ul. The synthesis of the cDNA was completed after a series of three incubations: 16°C for 30 min, 42°C for 30 min and 85 °C for 5min.

The RT-qPCR mix: 10ul of cDNA (1:30); 0.4ul of specific miRNA forward primer (20uM) and universal reverse primer (10uM) primer; 0.4ul of 5mM dNTPs; 2ul of 10X PCR buffer; 1.2ul of 50mM MgCl₂; 2ul of 1X SYBR Green® (Molecular probes); 0.05ul of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) to a final volume of 20ul. SYBR-Green® was used to detect amplification, estimate CT values and to determine specificity after melting curve analysis. The PCR cycling conditions were standardized to: 94°C for 5min followed by 40 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 10 s and 72°C for 15

s. After the main amplification, sample fluorescence were measured at temperatures from 55 to 99°C with an increasing ramp of 0.1°C in order to obtain the denaturing curve of the amplified products and assure their homogeneity after peak detection and T_m (melting temperature) estimation using data obtained from an Applied Biosystems StepOne Plus. As an initial step of this study, a PCR array was performed with microRNA previously reported as potentially associated with both sleep deprivation and neurodegenerative disorders. The relative expression was obtained using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method where the Crossing threshold (C_t) values of the target samples are subtracted from the average C_t values of the standard or control samples. The use of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ is adequate, as the amount of RNA among the different blood samples to produce the cDNAs did not differ significantly and produced similar C_t values among samples for 4 different miRNA used in the initial screening.

Statistical analysis of the relative expression values obtained for each miRNA in the experimental group was performed by Student's t-test implemented in SPSS Statistics 17 software. In order to compare the expression levels among the two experimental groups, the Waller–Duncan and Tukey HSD tests were performed with SPSS 17, with identical group discrimination and similar probability values.

Results

miRNA panel studied was different in number of miRNA for the species because in Wistar rat, *Rattus norvegicus*, some kind miRNA have not yet been described by miRBase. Therefore the total miRNA studied in species was twenty-six in human and in eighteen rat. According to the results described in Figures 1 and 2, there is a profile correlation of 4 miRNA expression that are similarly expressed in both groups (patients and ASD animal model). This similarity is important because it is based on comparison with the controls. The results show that both in ASD patients and ASD animal model miR34c, miR145 and miR199a are upregulated and miR193a is downregulated.

Conclusion

This work behind some similarities in the altered miRNA expression between two species. The ASD animal model is a reproduction laboratory for the study of this

disorder, wherein the drug (VPA) used for induction model in rats is closely linked to ASD in humans. The results of this study show that epigenetic re-arranging still occurred during pregnancy can remain for a long time and can show some ways to the understanding this disorder. In addition to the 4 miRNA also changed between the species, it is important that the miR34c is closely linked to anxiety and was described as a mediator of the same.

ASD patient respond disproportionally to stress and are also affected by food and skin allergies. Corticotropin-releasing hormone (CRH) is secreted under stress and together with neurotensin (NT) stimulates mast cells and microglia resulting in focal brain inflammation and neurotoxicity. The etiology and pathophysiology of anxiety and mood disorders is linked to inappropriate regulation of the central stress response. One of the prominent stress-induced miRNA is miR-34c confirmed to be upregulated after acute and chronic stressful[10]. This suggests not only that their highly specific gene expression patterns are controlled by the same upstream transcriptional regulators in the two species, but also that their functions during neocortical development are shared.

Declarations

Acknowledgements

We would like to thank the individuals who contributed their time and dedication to this study: patients, control children and their parents and to the professionals of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre which made the work feasible.

This work was supported by CAPES, CNPq and FINEP-HCPA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors contributed to the development of the study concept

1. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association; 2013.
2. Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T: **Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases**. *Adv Exp Med Biol* 2012, **724**:91–8.
3. Persico AM, Napolioni V: **Autism genetics**. *Behav Brain Res* 2013, **251**:95–112.
4. Ashwood P, Wills S, Van de Water J: **The immune response in autism: a new frontier for autism research**. *J Leukoc Biol* 2006, **80**:1–15.
5. Meek SE, Lemery-Chalfant K, Jahromi LB, Valiente C: **A review of gene–environment correlations and their implications for autism: A conceptual model** .
6. Finnegan EF, Pasquinelli AE: **MicroRNA biogenesis: regulating the regulators**. *Crit Rev Biochem Mol Biol* , **48**:51–68.
7. Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M: **The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2**. *EMBO J* 2003, **22**:3411–20.
8. Schneider T, Przewłocki R: **Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism**. *Neuropsychopharmacology* 2005, **30**:80–89.
9. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ: **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR**. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:e179.
10. Haramati S, Navon I, Issler O, Ezra-Nevo G, Gil S, Zwang R, Hornstein E, Chen A: **microRNA as Repressors of Stress-Induced Anxiety: The Case of Amygdalar miR-34**. *J Neurosci* 2011, **31**:14191–14203.

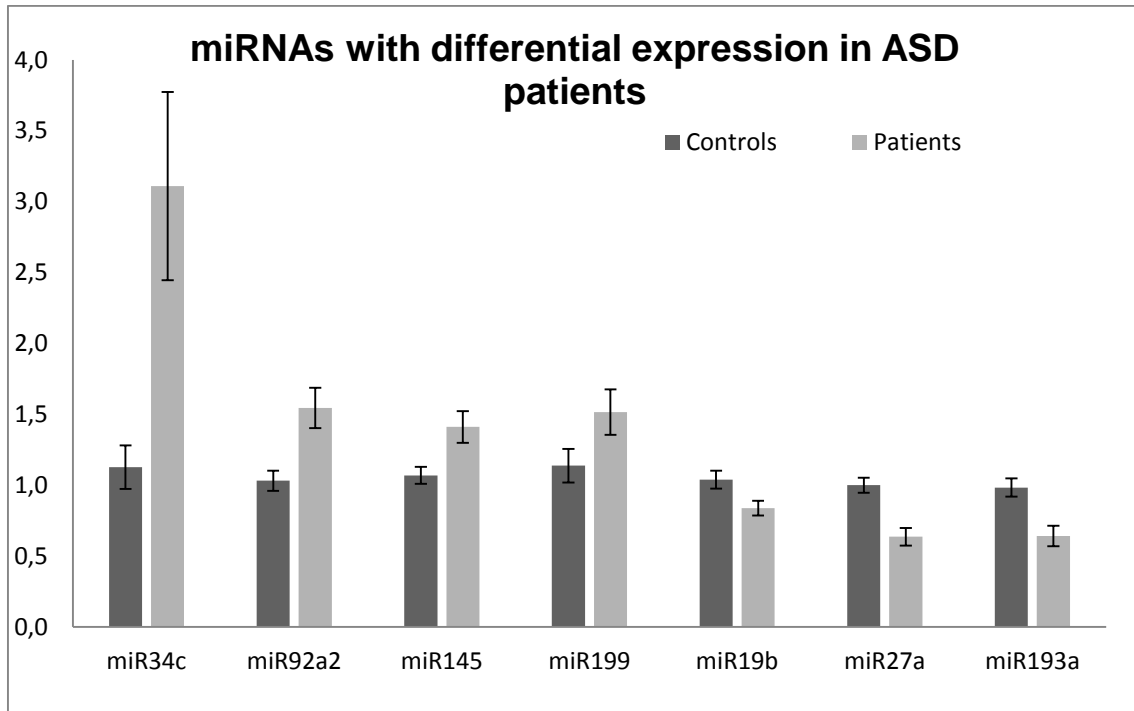


Figure 1: miRNAs with differential expression in ASD patients. $P < 0.05$

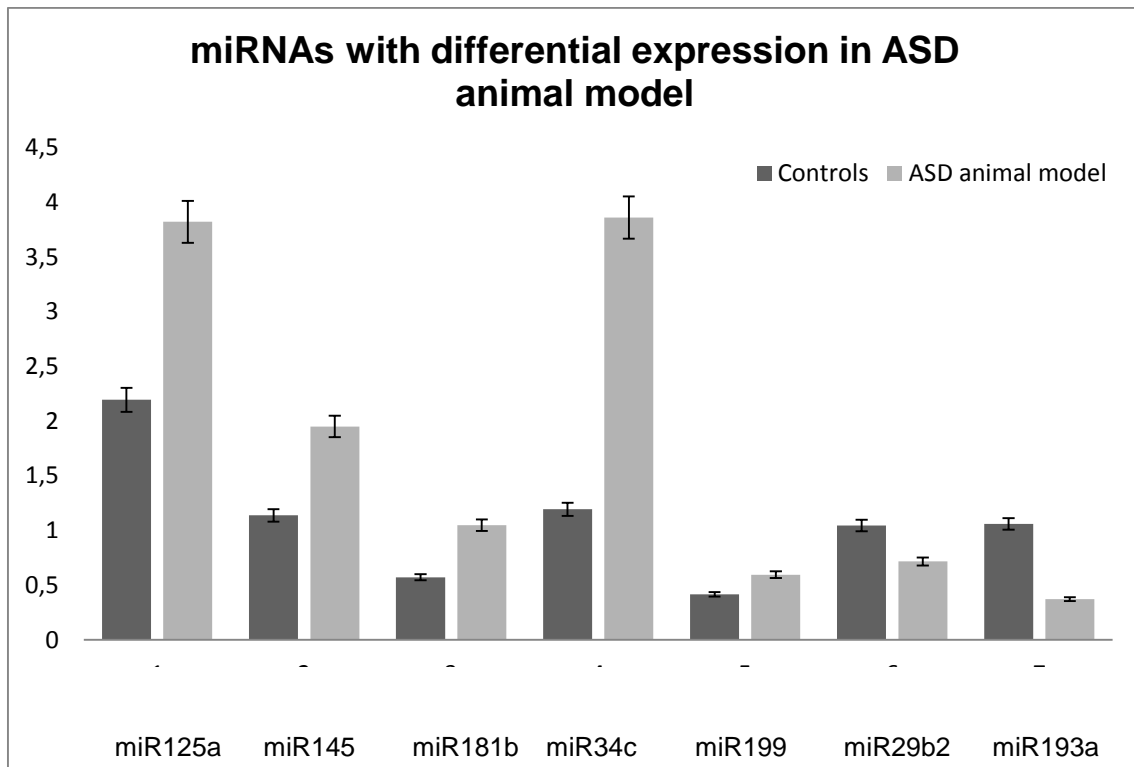


Figure 2: miRNAs with differential expression in ASD animal model. $P < 0.05$

Table 1: miRNA studied in *Homo sapiens*

ID	Chromosome	Mature Sequence	Forward Primer
hsa-miR-19b-1-5p	13	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	AGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGC
hsa-miR-24-2-5p	19	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	TGCCTACTGAGCTGAAACACAG
hsa-miR-25-3p	7	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
hsa-miR-27a-3p	19	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
hsa-miR-29b-2-5p	1	CUGGUUUACAUGGUGGCUUAG	CTGGTTTACATGGTGGCTTAG
hsa-miR-31-5p	9	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
hsa-miR-34a-5p	1	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
hsa-miR-34c-5p	11	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
hsa-miR-92a-2-5p	X	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAC	GGGTGGGGATTTGTTGCATTAC
hsa-miR-99a-5p	21	AACCCGUAGAUCGUAUCUUGUG	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
hsa-miR-125a-5p	19	UCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	TCCCTGAGACCCTTAACTGTGA
hsa-miR-125b-1-3p	11	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
hsa-miR-125b-2-3p	21	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	TCACAAGTCAGGCTCTTGGGAC
hsa-miR-145-5p	5	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
hsa-miR-181b-5p	1	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	AACATTCAUUGCTGTCCGTGGGT
hsa-miR-191-5p	3	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	CAACGGAATCCAAAAGCAGCTG
hsa-miR-193a-5p	17	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	TGGGTCTTTCGGGGCGAGATGA
hsa-miR-193b-3p	16	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	AACTGGCCCTCAAAGTCCCGCT
hsa-miR-198	3	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	GGTCCAGAGGGGAGATAGGTTC
hsa-miR-199a-5p	19	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	CCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTC
hsa-miR-210-3p	11	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
hsa-miR-214-3p	1	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT
hsa-miR-221-3p	X	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
hsa-miR-222-3p	X	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
hsa-miR-339-5p	7	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCACG
hsa-miR-370-3p	14	GCCUGCUGGGGUGGAACCUUGU	GCCTGCTGGGGTGAACCTGTT

Table 2: miRNA studied in *Rattus norvegicus*

ID	Chromosome	Mature Sequence	Forward Primer
rno-miR-25-3p	12	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
rno-miR-27a-3p	19	UUCACAGUGGCCUAAGUCCGC	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
rno-miR-29b-5p	1	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	CTGGTTTCACATGGTGGCTTAG
rno-miR-34a-5p	5	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
rno-miR-34c-5p	8	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC
rno-miR-99a-5p	11	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
rno-miR-125a-5p	1	UCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGA	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA
rno-miR-125b-1-3p	8	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT
rno-miR-145-5p	18	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT
rno-miR-181b-5p	13	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	AACATTCAUUGCTGTGCGGTGGGT
rno-miR-191-5p	8	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG
rno-miR-193a-5p	10	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	TGGGTCTTTGCGGGCGAGATGA
rno-miR-199a-5p	13	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	CCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTC
rno-miR-210-3p	1	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
rno-miR-221-3p	X	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
rno-miR-222-3p	X	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
rno-miR-339-5p	12	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCACG
rno-miR-370-3p	6	GCCUGCUGGGGUGGAACCUUGU	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT

DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a identidade fenotípica das classes neuronais em regiões definidas dentro do sistema nervoso central constitui uma questão amplamente relevante na neurociência do desenvolvimento. A diferenciação neuronal engloba um programa de desenvolvimento elaborado no qual os sinais neurogênicos e o controle de redes bioquímicas complexas e de fatores de transcrição trabalham em conjunto para assegurar o estado diferenciado dentro do tempo e espaço no desenvolvimento neuronal⁷⁰.

A discussão deste trabalho começa pela específica regulação bioquímica no neurodesenvolvimento fetal, pois o TEA é um transtorno psiquiátrico, desenvolvido durante a gestação do feto, e o mais importante, não se adquire o TEA, ele é apenas diagnosticado tardiamente⁴².

Modificações nas vias de sinalização neuronais e das células da glia estão envolvidas com o fenótipo do TEA^{49,66}, por ser um transtorno sem etiologia definida e sem gene marcador são necessários estudos que permitam a análise de outros fatores envolvidos na fisiopatologia do TEA.

As alterações epigenéticas estão intimamente ligadas à diversas doenças de natureza multifatorial e psiquiátricas⁷¹. Dentro da regulação epigenética, os miRNAs têm papel fundamental na repressão gênica e proteica⁷². Alguns estudos mostram que a análise de miRNAs no soro ou plasma sanguíneo tem valor preditivo para o diagnóstico e prognóstico de diversas doenças³³⁻³⁵.

O objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar no mesmo tipo de amostra (plasma), o perfil de expressão de alguns miRNAs (Tabela 1 e Tabela 2) em pacientes com TEA e em ratos submetidos ao modelo animal com exposição ao VPA. Os resultados mostram uma similaridade na expressão alterada de 4 miRNAs entre as duas

espécies: miR34c, miR145 e miR199a estão com aumento na expressão em relação a ambos os controles e miR193a está diminuído. Esses dados corroboram a ideia de que a alteração epigenética está presente no TEA e induz, possivelmente, o comportamento fenotípico do transtorno.

Não é possível relacionar essas alterações epigenéticas com a etiologia do transtorno, pois apesar de termos um modelo animal controlado em condições experimentais, os pacientes fazem parte do espectro na subdivisão de Autismo Clássico (diagnóstico clínico), sem alteração genética ou cromossômica diagnosticadas (dentro do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e sem relato, pela entrevista dos pais, sobre o uso de VPA durante a gestação. Em anexo, o exemplar do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I) aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e assinado pelos pais ou responsáveis pelos pacientes (com TEA ou com neurodesenvolvimento típico), e o exemplar da entrevista realizada com os pais ou responsáveis dos pacientes incluídos neste estudo (ANEXO II).

Entretanto, é possível relacionar os miRNAs encontrados alterados neste estudo com vias bioquímicas e importantes proteínas, possivelmente, envolvidas no transtorno em humanos. É importante ressaltar que poucos mRNAs alvos já foram confirmados na espécie *Rattus norvegicus* em publicações científicas. Portanto, em humanos, as proteínas Sirt1, HDAC e MeCP2 têm seus mRNA como alvos de miRNAs que estão com aumento na expressão em pacientes com TEA, possivelmente a expressão proteica das mesmas está alterada nestes pacientes.

Sirt1 está relacionada com a via bioquímica da doença conhecida como Esclerose Tuberosa, Sirt1 ativa o complexo TSC1-TSC2 e este, uma vez ativo, reprime a atividade de mTOR. Na Esclerose Tuberosa, mutações nos genes TSC1 e/ou TSC2

são responsáveis pelo desenvolvimento desta doença através de uma não repressão de mTOR. Portanto, em nossos pacientes, Sirt1 pode estar diminuída e com isso diminuindo a atividade do complexo TSC1-TSC2^{43,55} levando aos sintomas “like-autism” que os pacientes com Esclerose Tuberosa demonstram.

O VPA é um fármaco largamente empregado⁶⁸ e é utilizado para a indução do modelo animal utilizado nesse trabalho, sendo que um dos seus efeitos farmacológicos é o de inibidor da desacetilação de histonas⁶¹. Portanto, se no modelo animal, o VPA pôde produzir seus efeitos e provavelmente esses efeitos tenham um papel primordial na etiologia do TEA, nos pacientes foi verificada uma inibição da HDAC através de repressão da expressão proteica a partir de miRNA, este fenômeno mostra que pode existir alteração epigenética regulando modificações epigenéticas.

Desde o início deste estudo, a ideia principal era a de analisar, separadamente, apenas o gênero masculino, pois é amplamente sabido que o TEA afeta principalmente o sexo masculino e que o TEA no gênero feminino possui diferenças de sintomas em comparação ao mesmo. A Síndrome de Rett, que antigamente fazia parte do TEA, afeta majoritariamente o gênero feminino por ter uma alteração genética ligada ao cromossomo X, alteração esta que é diagnosticada no gene MECP2. Porém, dentro dos mRNAs alvos encontrados neste estudo, temos também o mRNA de MECP2 que pode estar reprimido por um dos miRNAs com expressão aumentada nos pacientes com TEA. Portanto, se no gênero feminino existe diminuição da atividade de MeCP2 por mutação gênica e as pacientes, na grande maioria, possuem muita similaridade nos sintomas ‘*like-autism*’, no gênero masculino, no caso nossos pacientes, neste trabalho, um miRNA alterado pode estar reprimindo a expressão proteica de MeCP2, novamente mostrando que as alterações epigenéticas com miRNA podem estar envolvidas no comportamento dos pacientes com TEA.

Transtorno de Ansiedade acompanha o Transtorno do Espectro do Autismo?

Recentemente, de forma sistemática, tem sido relatado o importante papel da família miR34 em transtornos psiquiátricos⁷³⁻⁷⁶. Em um estudo de caso-controle da esquizofrenia, o miR34a está diferencialmente expresso, aumentado, em amostras de leucócitos dos pacientes⁷⁷. O miR34c já foi ligado a uma limitação negativa de consolidação da memória que mostra que os níveis de miR34c estão elevados no hipocampo de pacientes com Doença de Alzheimer e nos modelos animais correspondentes⁷³.

A indução, ou seja, aumento na expressão, de miR34c foi observada na amígdala após o estresse agudo em roedores⁷⁸. Adicionalmente, o aumento da expressão de miR34c levou ao aparecimento de comportamento de ansiedade no mesmo modelo. Juntos, os membros da família miR34 podem ser considerados como reguladores importantes do desenvolvimento neuronal, da plasticidade sináptica, e de doenças psiquiátricas⁴⁸.

Em relação ao TEA e às síndromes que podem estar acompanhadas por ele, já foi relatado que miR34a, miR34b e miR34c também estão regulados positivamente em modelo animal da Síndrome do X-Frágil⁷⁹. E em uma revisão recente, Banerjee-Basu *et al.*, 2014 indicam o miR34c como o potencial gene candidato para o TEA, além do possível papel na indução à ansiedade.

Neste trabalho, apresentamos que o miR34c tem sua expressão alterada positivamente tanto em pacientes com TEA quanto no modelo animal submetido à exposição de VPA, importante ratificar que o miR199a, que tem aumento na expressão nos pacientes deste trabalho, é responsável pela repressão proteica de Sirt1, uma proteína envolvida

bioquimicamente na Esclerose Tuberosa. É importante destacar que em condições de estresse, há uma sinalização para regular negativamente mTOR através de Sirt1.⁵⁴

E, com relação ao Transtorno de Ansiedade, um dos alvos de miR34c é o mRNA do receptor do fator de liberação de corticotropina 1. Estudos, *in vitro*, demonstraram que o miR34c reduz a capacidade de resposta das células ao fator de liberação da corticotropina em células neuronais⁷⁸.

Por tudo apresentado, é possível relacionar o miR34c como uma alteração epigenética importante dentro do TEA. E, além disso, é possível direcionar a análise do miR34c tanto no diagnóstico de TEA quanto no prognóstico durante terapias farmacológicas contra o Transtorno de Ansiedade que acompanha a maioria dos pacientes com TEA. Este trabalho analisou amostras sanguíneas coletadas durante a vida dos pacientes e dos ratos submetidos ao modelo animal e indica um marcador de Transtorno de Ansiedade em ambos os grupos, e é importante lembrar que Schneider *et al*, 2007 mostra que ratos submetidos à exposição pré-natal com VPA têm comportamento ansioso e modificações na sinalização neuronal gabaérgica e dopaminérgica⁶⁸.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu analisar e entender algumas alterações persistentes e conservadas entre espécies no que diz respeito ao comportamento identificado no Transtorno do Espectro do Autismo. Foi possível, também, relacionar algumas proteínas envolvidas em outras doenças ou síndromes que podem ter ou que são acompanhadas por sintomas relatados como básicos no Transtorno do Espectro do Autismo.

Além de um painel de miRNAs, alterados em humanos e no modelo animal, que pode ser utilizado para a possibilidade de um teste diagnóstico e de prognóstico, é possível correlacionar a alteração do miR34c, per se, como um marcador de Transtorno de Ansiedade presente nos pacientes com Transtorno do Espectro do Autismo. E, futuramente, direcionar estudos neste miRNA para que se torne alvo de terapias farmacológicas contra o Transtorno de Ansiedade, auxiliando com uma melhor terapia ansiolítica para os pacientes com o Transtorno do Espectro do Autismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stam J, Vermeulen M. Eugen Bleuler (1857-1939), an early pioneer of evidence based medicine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(6):594-595. doi:10.1136/jnnp-2012-303715.
2. Martin A. Leo Kanner and Hans Asperger: Setting the Historical Record Straight. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2016;55(8):728. doi:10.1016/j.jaac.2016.05.006.
3. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM Library. <http://dsm.psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596>. Accessed August 13, 2015.
4. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009;195(1):7-14. doi:10.1192/bjp.bp.108.051672.
5. Meek SE, Lemery-Chalfant K, Jahromi LB, Valiente C. A review of gene–environment correlations and their implications for autism: A conceptual model.
6. CAGLAYAN AO. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev Med Child Neurol*. 2010;52(2):130-138. doi:10.1111/j.1469-8749.2009.03523.x.
7. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *Behav Brain Res*. 2013;251:95-112. doi:10.1016/j.bbr.2013.06.012.
8. Ashwood P, Wills S, Van de Water J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol*. 2006;80(1):1-15. doi:10.1189/jlb.1205707.
9. Sarachana T, Hu VW. Differential recruitment of coregulators to the RORA promoter adds another layer of complexity to gene (dys) regulation by sex

- hormones in autism. *Mol Autism*. 2013;4(1):39. doi:10.1186/2040-2392-4-39.
10. Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS, et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics*. 2008;9(3):153-161. doi:10.1007/s10048-008-0133-5.
 11. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011;70(5):863-885. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.002.
 12. Levy D, Ronemus M, Yamrom B, et al. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*. 2011;70(5):886-897. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.015.
 13. Manning-Courtney P, Murray D, Currans K, et al. Autism spectrum disorders. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2013;43(1):2-11. doi:10.1016/j.cppeds.2012.08.001.
 14. Gilbert SF. Commentary: “The epigenotype” by C.H. Waddington. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):20-23. doi:10.1093/ije/dyr186.
 15. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):243-250. doi:10.1002/jcp.21678.
 16. Grafodatskaya D, Chung B, Szatmari P, Weksberg R. Autism Spectrum Disorders and Epigenetics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010;49(8):794-809. doi:10.1016/j.jaac.2010.05.005.
 17. Angata T, Fujinawa R, Kurimoto A, et al. Integrated approach toward the discovery of glyco-biomarkers of inflammation-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253(1):159-169. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06469.x.
 18. Hu VW. The expanding genomic landscape of autism: discovering the “forest”

- beyond the “trees.” *Future Neurol.* 2013;8(1):29-42. doi:10.2217/fnl.12.83.
19. Nelson, David L., M. Cox M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6ª Ed. 2014.* <http://www.saraiva.com.br/principios-de-bioquimica-de-lehninger-6-ed-2014-7732917.html>.
 20. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>. Accessed July 17, 2014.
 21. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature.* 2005;435(7043):745-746. doi:10.1038/435745a.
 22. Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer’s disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(1):27-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525125>. Accessed August 10, 2016.
 23. Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS, et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics.* 2008;9(3):153-161. doi:10.1007/s10048-008-0133-5.
 24. Talebizadeh Z, Butler MG, Theodoro MF. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res.* 2008;1(4):240-250. doi:10.1002/aur.33.
 25. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385.
 26. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-419. doi:10.1038/nature01957.
 27. Wang X, Xu X, Ma Z, et al. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA.* 2011;17(8):1511-1528. doi:10.1261/rna.2732611.

28. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-366. doi:10.1038/35053110.
29. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. - PubMed - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Asymmetry+in+the+assembly+of+the+RNAi+enzyme+complex>.
30. Sun G, Yan J, Noltner K, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*. 2009;15(9):1640-1651. doi:10.1261/rna.1560209.
31. Vaishnavi V, Manikandan M, Munirajan AK. Mining the 3'UTR of autism-implicated genes for SNPs perturbing microRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014;12(2):92-104. doi:10.1016/j.gpb.2014.01.003.
32. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-114. doi:10.1038/nrg2290.
33. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110(3):483-495. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247452.
34. Wang F, Long G, Zhao C, et al. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9(9):e105734. doi:10.1371/journal.pone.0105734.
35. Sayed ASM, Xia K, Yang T-L, Peng J. Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Dis Markers*. 2013;35(5):561-566. doi:10.1155/2013/217948.
36. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-385. doi:10.1038/nrm1644.

37. Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(6):1102-1107. doi:10.1590/S0004-27302006000600018.
38. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140-D144. doi:10.1093/nar/gkj112.
39. Singh NK. microRNAs Databases: Developmental Methodologies, Structural and Functional Annotations. *Interdiscip Sci Comput Life Sci.* March 2016:1-21. doi:10.1007/s12539-016-0166-7.
40. Siniscalco D, Cirillo A, Bradstreet JJ, Antonucci N. Epigenetic findings in autism: new perspectives for therapy. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):4261-4273. doi:10.3390/ijerph10094261.
41. Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci.* 2004;7(2):113-117. doi:10.1038/nn1174.
42. Loke YJ, Hannan AJ, Craig JM. The Role of Epigenetic Change in Autism Spectrum Disorders. *Front Neurol.* 2015;6:107. doi:10.3389/fneur.2015.00107.
43. Hunt A, Shepherd C. A prevalence study of autism in tuberous sclerosis. *J Autism Dev Disord.* 1993;23(2):323-339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8331050>. Accessed August 13, 2015.
44. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell.* 2011;146(2):247-261. doi:10.1016/j.cell.2011.06.013.
45. Woo J-S, Kim VN. MeCP2 caught moonlighting as a suppressor of MicroRNA processing. *Dev Cell.* 2014;28(5):477-478. doi:10.1016/j.devcel.2014.02.015.

46. Cheng T-L, Wang Z, Liao Q, et al. MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. *Dev Cell*. 2014;28(5):547-560. doi:10.1016/j.devcel.2014.01.032.
47. Ramocki MB, Peters SU, Tavyev YJ, et al. Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MeCP2 duplication syndrome. *Ann Neurol*. 2009;66(6):771-782. doi:10.1002/ana.21715.
48. Banerjee-Basu S, Larsen E, Muend S. Common microRNAs Target Established ASD Genes. *Front Neurol*. 2014;5:205. doi:10.3389/fneur.2014.00205.
49. Ding B. Gene expression in maturing neurons: regulatory mechanisms and related neurodevelopmental disorders. *Sheng Li Xue Bao*. 2015;67(2):113-133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896042>. Accessed June 22, 2015.
50. Fiorenza A, Barco A. Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol Learn Mem*. May 2016. doi:10.1016/j.nlm.2016.05.001.
51. Margis R, Margis R, Rieder CRM. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J Biotechnol*. 2011;152(3):96-101. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.01.023.
52. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J-W, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90. doi:10.1016/j.abb.2010.05.003.
53. Kong S, McBurney MW, Fang D. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(1):6-13. doi:10.1038/icb.2011.102.
54. Ghosh HS, McBurney M, Robbins PD. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*. 2010;5(2):e9199. doi:10.1371/journal.pone.0009199.

55. Wataya-Kaneda M. Mammalian target of rapamycin and tuberous sclerosis complex. *J Dermatol Sci*. April 2015. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.04.005.
56. Huang J, Wu S, Wu C-L, Manning BD. Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res*. 2009;69(15):6107-6114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0975.
57. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000;14(2):121-141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652267>. Accessed August 19, 2016.
58. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*. 2000;19(6):1176-1179. doi:10.1093/emboj/19.6.1176.
59. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45. doi:10.1038/47412.
60. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001;20(24):6969-6978. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.
61. Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J*. 2003;22(13):3411-3420. doi:10.1093/emboj/cdg315.
62. Cheng T-L, Qiu Z. MeCP2: multifaceted roles in gene regulation and neural development. *Neurosci Bull*. 2014;30(4):601-609. doi:10.1007/s12264-014-1452-6.
63. Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol*. 1983;14(4):471-479. doi:10.1002/ana.410140412.

64. Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*. 2006;49(3):341-348. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.027.
65. Sun YE, Wu H. The ups and downs of BDNF in Rett syndrome. *Neuron*. 2006;49(3):321-323. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.014.
66. Díaz de León-Guerrero S, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system. *Eur J Neurosci*. 2011;33(9):1563-1574. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07658.x.
67. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-89. doi:10.1038/sj.npp.1300518.
68. Schneider T, Ziolkowska B, Gieryk A, Tyminska A, Przewłocki R. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;193(4):547-555. doi:10.1007/s00213-007-0795-y.
69. Olexová L, Štefánik P, Kršková L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats - An animal model of autism. *Neurosci Lett*. 2016;629:9-14. doi:10.1016/j.neulet.2016.06.035.
70. Vogel-Ciernia A, Wood MA. Neuron-specific chromatin remodeling: a missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology*. 2014;80:18-27. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.002.
71. Lv J, Xin Y, Zhou W, Qiu Z. The epigenetic switches for neural development

- and psychiatric disorders. *J Genet Genomics*. 2013;40(7):339-346. doi:10.1016/j.jgg.2013.04.007.
72. Zhong X, Liao Y, Chen L, et al. The microRNAs in the pathogenesis of metabolic memory. *Endocrinology*. June 2015:en20151063. doi:10.1210/en.2015-1063.
73. Zovoillis A, Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, et al. microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J*. 2011;30(20):4299-4308. doi:10.1038/emboj.2011.327.
74. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c Are Targets of p53 and Cooperate in Control of Cell Proliferation and Adhesion-Independent Growth. *Cancer Res*. 2007;67(18):8433-8438. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1585.
75. Huang F, Long Z, Chen Z, et al. Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129052. doi:10.1371/journal.pone.0129052.
76. Vaishnavi V, Manikandan M, Tiwary BK, Munirajan AK. Insights on the functional impact of microRNAs present in autism-associated copy number variants. *PLoS One*. 2013;8(2):e56781. doi:10.1371/journal.pone.0056781.
77. Lai C-Y, Yu S-L, Hsieh MH, et al. MicroRNA Expression Aberration as Potential Peripheral Blood Biomarkers for Schizophrenia. Uddin M, ed. *PLoS One*. 2011;6(6):e21635. doi:10.1371/journal.pone.0021635.
78. Haramati S, Navon I, Issler O, et al. microRNA as Repressors of Stress-Induced Anxiety: The Case of Amygdalar miR-34. *J Neurosci*. 2011;31(40):14191-14203. doi:10.1523/JNEUROSCI.1673-11.2011.
79. Liu T, Wan R-P, Tang L-J, et al. A MicroRNA Profile in Fmr1 Knockout Mice

Reveals MicroRNA Expression Alterations with Possible Roles in Fragile X Syndrome. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1053-1063. doi:10.1007/s12035-014-8770-1.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (RESOLUÇÃO Nº 196/96 - CNS)

A proposta deste trabalho é sistematizar o atendimento, o diagnóstico e o estabelecimento de estratégias de intervenção para os transtornos invasivos do desenvolvimento, em especial para os casos compatíveis com autismo infantil.

Caso eu aceite que meu dependente participe deste protocolo, estou ciente de que terei que responder a uma entrevista semi-estruturada e escalas de avaliação que podem durar de 30 min. a 1 hora para seu total preenchimento. Estou ciente que será necessária a coleta de material sanguíneo, desde que não estejam envolvidos riscos para a saúde de meu filho(a). Eu entendo que nenhum procedimento é isento de riscos, e estou consciente de que a punção para a coleta da amostra poderá ser dolorida e apresentar hematoma que desaparecerá em três ou quatro dias, se isso ocorrer. O material poderá ser congelado por até 5 anos, para eventuais análises em projetos futuros. Caso a utilização desse material seja enquadrada em algum novo projeto, sei que o novo projeto deverá passar novamente por análise da Instituição adequada (Conselho de Ensino e Pesquisa), para receber aprovação específica. Também estou ciente de que poderei ser novamente contatado para dar meu novo consentimento.

Estou ciente de que esta pesquisa vai avaliar a imunidade de meu filho(a), eles irão estudar as células sanguíneas e também o DNA de meu filho(a).

O benefício para a sociedade é que este estudo pode melhorar o conhecimento sobre o autismo. Também meu filho(a) estará recebendo uma detalhada avaliação neuropsiquiátrica que poderá ser útil na clarificação de seu diagnóstico.

Eu entendo que a participação do meu dependente é voluntária e ligada ao meu consentimento. Ele continuará recebendo atendimento neste mesmo hospital ou na rede de saúde da comunidade, caso eu decida não participar.

Eu entendo que células, tecidos, sangue e outros materiais, colhidos de meu dependente, durante o curso da pesquisa, podem ser utilizados para avaliações científicas, pesquisa e ensino.

Eu entendo que os resultados dessa pesquisa serão mantidos em lugar seguro, codificados e a identificação só poderá ser realizada pelo pessoal envolvido diretamente com o projeto.

Caso o material venha a ser utilizado para publicação científica ou atividades didáticas, não serão utilizados nomes que possam vir a identificar meu dependente.

Eu entendo que poderei obter mais informações com o Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo, pelo telefone 3359-8293, que está apto a solucionar minhas dúvidas. Aceito que serei informado de qualquer conhecimento significativo descoberto durante este projeto o qual poderá influenciar a minha participação na sua continuidade.

Eu compreendo que poderei solicitar desligamento de meu dependente do presente projeto a qualquer momento.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20 ____ .

Responsável pelo Paciente Autista
Nome do paciente

Pesquisador que obteve o consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(RESOLUÇÃO Nº 196/96 - CNS)

A proposta deste trabalho é sistematizar o atendimento, o diagnóstico e o estabelecimento de estratégias de intervenção para os transtornos invasivos do desenvolvimento, em especial para os casos compatíveis com autismo infantil.

Caso eu aceite que meu dependente participe deste protocolo, estou ciente de que terei que responder a uma entrevista semi-estruturada e escalas de avaliação que podem durar de 30 min. a 1 hora para seu total preenchimento. Estou ciente que será necessária a coleta de material sanguíneo, desde que não estejam envolvidos riscos para a saúde de meu filho(a). Eu entendo que nenhum procedimento é isento de riscos, e estou consciente de que a punção para a coleta da amostra poderá ser dolorida e apresentar hematoma que desaparecerá em três ou quatro dias, se isso ocorrer. O material poderá ser congelado por até 5 anos, para eventuais análises em projetos futuros. Caso a utilização desse material seja enquadrada em algum novo projeto, sei que o novo projeto deverá passar novamente por análise da Instituição adequada (Conselho de Ensino e Pesquisa), para receber aprovação específica. Também estou ciente de que poderei ser novamente contatado para dar meu novo consentimento.

Estou ciente de que esta pesquisa vai avaliar a imunidade de meu filho(a), eles irão estudar as células sanguíneas e também o DNA de meu filho(a) para comparar com crianças que tem autismo.

O benefício para a sociedade é que este estudo pode melhorar o conhecimento sobre o autismo. Também meu filho(a) estará recebendo uma detalhada avaliação neuropsiquiátrica

Eu entendo que a participação do meu dependente é voluntária e ligada ao meu consentimento. Ele continuará recebendo atendimento neste mesmo hospital ou na rede de saúde da comunidade, caso eu decida não participar.

Eu entendo que células, tecidos, sangue e outros materiais, colhidos de meu dependente, durante o curso da pesquisa, podem ser utilizados para avaliações científicas, pesquisa e ensino.

Eu entendo que os resultados dessa pesquisa serão mantidos em lugar seguro, codificados e a identificação só poderá ser realizada pelo pessoal envolvido diretamente com o projeto.

Caso o material venha a ser utilizado para publicação científica ou atividades didáticas, não serão utilizados nomes que possam vir a identificar meu dependente.

Eu entendo que poderei obter mais informações com o Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo, pelo telefone 3359-8293, que está apto a solucionar minhas dúvidas. Aceito que serei informado de qualquer conhecimento significativo descoberto durante este projeto o qual poderá influenciar a minha participação na sua continuidade.

Eu compreendo que poderei solicitar desligamento de meu dependente do presente projeto a qualquer momento.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20____ .

Responsável pelo Paciente
Nome do paciente

Pesquisador que obteve o consentimento

ANEXO II

Questionário de avaliação de pacientes com Transtorno do Espectro do Autismo e crianças com desenvolvimento normal.

IDENTIFICAÇÃO

Nome _____ _____	NÚMERO _____
Residência _____ nº _____ apt° _____ Bairro _____	REG _____ _____
Cidade _____ UF _____ CEP _____ Fone _____ _____	FC _____ _____
Sexo: () M () F Id 1ª _____ a _____ m Idade _____ _____	
Nome do pai _____ DN _____ ____ / ____ / ____	IDADE _____
Nome da mãe _____ DN _____ ____ / ____ / ____	IDADE _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRÍCIOS

Pré-natal: () S () N () Não sabe Uso medicação: () S () N () Não sabe

Gestação: () <37sem () 37-41sem () >41sem () Não sabe

Parto: () Normal () Cesárea

PN: _____ g C: _____ cm PC: _____ , _____ cm Apgar 5' _____

Intercorrências peri-natais: () S () N () Não sabe

PATOLOGIAS DURANTE A GESTAÇÃO

	Patologias	Especificação Período de ocorrência na gravidez (semanas/meses)	Medicamentos utilizados
()	caxumba		
()	varicela		

<input type="checkbox"/>	toxoplasmose		
<input type="checkbox"/>	citomegalovírus		
<input type="checkbox"/>	sarampo		
<input type="checkbox"/>	Doença crônica		
<input type="checkbox"/>	Doença aguda		
<input type="checkbox"/>	Sangramento vaginal		
<input type="checkbox"/>	Outras		

SUBSTÂNCIAS USADAS DURANTE A GESTAÇÃO

	Substâncias	Especificação Período de uso na gravidez (semanas/meses)	Quantidade
<input type="checkbox"/>	bebidas alcoólicas		
<input type="checkbox"/>	Cigarro		
<input type="checkbox"/>	Drogas de uso social		
<input type="checkbox"/>	Substância abortiva		
<input type="checkbox"/>	Outras		

HISTÓRIA FAMILIAR

Consangüinidade: S Especifique: _____ N Não sabe

Outros casos na família: S N Não sabe

Especifique Parente afetado: (1) 1º grau: gêmeo MZ, DZ, irmão, pai, mãe

(2) 2º grau: tios e tias

(3) 3º grau: primos

(4) Outro: _____

Doenças auto-imunes relatadas na família: Especifique parente afetado

Miastenia gravis
Tireoidite de Hashimoto
Artrite Reumatóide
Vitiligo
Psoríase
Doenças Auto-imunes do Sistema Nervoso
Diabetes Mellitus do tipo 1
Lúpus Eritematoso Sistêmico
Sarcoidose
Doença de Addison
Anemia Hemolítica

Esclerose Múltipla
Doença Celíaca
Hepatite auto-imune
Doença de Crohn

Outras:

Apresenta quadro de alergias? _____

Intervenção Medicamentosa atual:
