UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ROWENA RUBIM SILVA DO COUTO

SUPEREXPRESSÃO DOS miR-125b E miR-132 CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL

Porto Alegre
2021

ROWENA RUBIM SILVA DO COUTO

SUPEREXPRESSÃO DOS miR-125b E miR-132 CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A apresentação desta dissertação é requisito parcial para título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientadora: Professora Sandra Leistner-Segal
Coorientadora: Professora Têmis Maria Félix

Porto Alegre
2021

CIP - Catalogação na Publicação

do Couto, Rowena Rubim Silva
SUPEREXPRESSÃO DOS miR-125b E miR-132 CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL / Rowena Rubim Silva do Couto. -- 2021.
79 f.
Orientadora: Sandra Leistner-Segal.

Coorientadora: Têmis Maria Félix Félix.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Síndrome do X-Frágil . 2. microRNAs. 3. biomarcadores . I. Leistner-Segal, Sandra, orient. II. Félix, Têmis Maria Félix, coorient. III. Título.

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

ROWENA RUBIM SILVA DO COUTO

SUPEREXPRESSÃO DOS miR-125b E miR-132 CIRCULANTES EM SORO DE PACIENTES COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A apresentação desta dissertação é requisito parcial para título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientadora: Professora Sandra Leistner-Segal
Coorientadora: Professora Têmis Maria Félix

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Marina Siebert
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Carlos Eduardo Steiner
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Simone de Menezes Karam
Universidade Federal do Rio Grande

DEDICATÓRIA

A todas as crianças e adolescentes com Síndrome do X-Frágil, especialmente aqueles que participaram desse estudo e seus familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas duas orientadoras, Sandra e Têmis, por terem aceitado me guiar neste caminho. Além disso, por serem exemplos de profissionais fortes e inspiradoras.

Um agradecimento especial a professora Sandra, que me acompanha há quase 8 anos, e que despertou em mim a vontade de ser cientista, e que continua a fazer, sempre de uma forma leve. Serei eternamente grata.

A Francyne Kubaski e a Ana Carolina Brusius, que estiveram junto desde o início deste projeto, me auxiliando e guiando para colocá-lo em prática.

A Aline, bioestatística do HCPA, por ter me ajudado a realizar as análises estatísticas deste estudo.

A toda minha família, em especial aos meu pais, Clarice e José, pelo amor e apoio incondicional que me dão desde que me trouxeram ao mundo, e a minha irmã, Yalis, por se fazer presente mesmo com a distância física, e por ser minha melhor amiga.

Ao meu parceiro, Matheus, por estar comigo durante toda esta caminhada, por sempre estar disposto a me ajudar, me apoiar e me incentivar. Juntos somos melhores.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância”.
Simone de Beauvoir

RESUMO

Introdução: A Síndrome do X-Frágil (SXF) é uma doença monogênica do neurodesenvolvimento, causada pela ausência da proteína *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP). A FMRP é uma proteína de ligação ao RNA, reguladora da tradução e importante no desenvolvimento dos dendritos e conexões sinápticas. Sua ausência é responsável pelas deficiências cognitivas, físicas e comportamentais da SXF. Estudos mostram a interação da FMRP com os microRNAs (miRNAs) miR-125b e miR-132 para regular a plasticidade sináptica no cérebro de modelos experimentais para a SXF, assim como a desregulação de miRNAs relacionados com a fisiopatologia da SXF. Os miRNAs são pequenas moléculas quantificáveis que regulam a expressão gênica e agem no controle de diversos processos biológicos. **Objetivo:** Avaliar a expressão dos miR-125b-5p e miR-132-3p circulantes em indivíduos com Síndrome do X Frágil. **Métodos:** A expressão destes miRNAs foi avaliada através da transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e analisada pela expressão relativa por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em amostra de soro de 10 pacientes com SXF e de 20 jovens sem neuropatologias, comparados à expressão de miR-24 como controle endógeno. **Resultados:** Foi observado o aumento dos níveis de expressão de miR-125b e miR-132 em pacientes com a SXF e seu possível envolvimento com a ausência da proteína FMRP. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar a expressão aumentada desses miRNAs no soro de pacientes com SXF, em comparação com controles cognitivamente saudáveis. Os miRNAs miR-125b e miR-132 apresentam um valor de 0,94 (IC 95% = 0,86-1,0) e 0,89 (IC 95% = 0,77-1,0) respectivamente para a área sob a curva ROC. Bases de dados permitiram a identificação de possíveis genes alvos para miR-125b e miR-132, cujos produtos desempenham um papel importante na regulação da homeostase do sistema nervoso central. **Conclusão:** Estes resultados destacam os miRNAs avaliados como potenciais biomarcadores da SXF.

Palavras chave: Síndrome do X-Frágil, microRNAs, biomarcadores

ABSTRACT

Introduction: Fragile X Syndrome (FXS) is a neurodevelopmental monogenic disorder, caused by the loss of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). FMRP is an RNA binding protein, a regulator of translation that plays important roles in the development of dendritic spines and synaptic plasticity, and its loss causes cognitive and behavioral deficits. Previous studies have shown the interaction of FMRP and microRNAs (miRNAs) miR-125b and miR-132 to regulate the synaptic plasticity in animals models, as well as the role of miRNAs dysregulation in the pathophysiology of FXS. miRNAs are small molecules that regulate gene expression in diverse biological processes. **Objective:** To analyze the expression of circulating miR-125b-5p and miR-132-3p in FXS. **Methods:** The expression of these miRNAs was evaluated by real-time quantitative amplification retrotranscribed (RT-qPCR) and analyzed by relative quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method in serum samples from 10 patients with FXS and 20 young subjects without neuropathology and compared to miR-24 expression, as endogenous control. **Results:** miR-125b and miR-132 were more expressed in serum of patients with FXS and likely involved with FMRP loss. To our knowledge, this is the first study to show increased expression of these miRNAs in the serum of FXS patients compared to cognitively healthy individuals. Those miRNAs presented as good biomarker option for FXS, with a value of 0.94 (IC 95% = 0.86-1.0) and 0.89 (IC 95% = 0.77-1.0) for the area under ROC curve. Databases allowed the identification of possible targets genes for miR-125b and miR-132, whose products play an important role in the homeostasis of the nervous system. **Conclusion:** These results highlight the analysis of miRNAs as potential biomarkers of FXS.

Keywords: Fragile X Syndrome, microRNAs, biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O gene FMR1 e a proteína FMRP 17
Figura 2 - Dendritos de camundongos com SXF e selvagem..... 20
Figura 3 - Função da FMRP nos neurônios 21
Figura 4 - Biogênese dos microRNAs 23
Figura 5 - Estrutura secundária do pre-microRNA do hsa-miR-125b-5p 27
Figura 6 - Estrutura secundária do pre-microRNA do hsa-miR-132-3p 27
Figura 7 - Curvas ROC para teste adequado e para teste inútil 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNPM	Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor
Ago2	proteína Argonauta
caixa RGG	aglomerado de resíduos de arginina e glicina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em pesquisa
CGG	trinucleotídeo citosina-guanina-guanina
CPC	Centro de Pesquisa Clínica
DI	Deficiência Intelectual
FMR1	Fragile X-linked Mental Retardation 1 Gene
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FXPOI	insuficiência ovariana prematura associada ao X Frágil
FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
FXTAS	síndrome de tremor/ataxia associada ao X Frágil
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
KH	ribonucleoproteína heterogênea nuclear K
LGM	Laboratório de Genética Molecular
mGluR	Receptor de Glutamato metabotrópico
miRNA	microRNA
MP	Mutação Plena
mRNA	RNA mensageiro
mRNP	complexo ribonucleoprotéico
NES	Sinal de Exportação Nuclear
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NMDAR	Receptor *N*-metil-D-aspartato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pre-microRNA	microRNA precursor
PM	Pré-mutação
pri-microRNA	microRNA primário
PSD-95	Proteína de densidade sináptica 95
qPCR	PCR quantitativa em tempo real

RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA
RQ	Quantificação Relativa
RT	Transcrição Reversa
SGM	Serviço de Genética Médica
SNC	Sistema Nervoso Central
SXF	Síndrome do X Frágil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCUD	Termo de Compromisso para Utilização de Dados
TEA	Transtornos do Espectro Autista
UTR	Região Não Traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **14**
2 REVISÃO DE LITERATURA **16**
2.1 SÍNDROME DO X-FRÁGIL E O GENE *FMR1* 16
2.2 A PROTEÍNA FMRP 19
2.3 MICRORNAS (MIRNAS) 22
2.4 SXF E MIRNAS 25
2.5 HSA-MIR-125B-5P 26
2.6 HSA-MIR-132-3P 27
3 JUSTIFICATIVA **29**
4 HIPÓTESE **31**
5 OBJETIVOS **32**
5.1 OBJETIVO GERAL 32
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
6 MÉTODOS **33**
6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO 33
6.2 AMOSTRA 33
6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 33
6.3.1 Critérios de inclusão para o grupo de pacientes com Síndrome do X-Frágil **33**
6.3.2 Critérios de inclusão para o grupo de indivíduos controle **34**
6.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 34
6.5 ASPECTOS ÉTICOS 34
6.6 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA E SEPARAÇÃO DO SORO 35
6.7 EXTRAÇÃO DO RNA E ANÁLISE DE QUALIDADE 35
6.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) 36
6.9 MIR-24 COMO CONTROLE ENDÓGENO 36
6.10 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR) 36
6.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS 37
6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 38

6.13 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CURVA ROC 38
6.14 CORRELAÇÃO COM ACHADOS CLÍNICOS/GENÓTIPO 40
6.15 ANÁLISE *IN SILICO* DOS GENES ALVOS DOS MIR-125B-5P E MIR-132-3P 40
REFERÊNCIAS 41
7 RESULTADOS 53
7.1 ARTIGO 53
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 71
APÊNDICE A – TCLE - PACIENTES 72
APÊNDICE B – TCLE - CONTROLES 74
ANEXO 1 – MIRNEASY SERUM/PLASMA 76
ANEXO 2 – TAQMAN™ ADVANCED MICRORNA ASSAYS 78
ANEXO 3 – TCUD 82

1 INTRODUÇÃO

A síndrome do X Frágil (SXF), doença genética monogênica ligada ao cromossomo X, é a causa hereditária mais comum de Deficiência Intelectual (DI) no mundo e a causa genética mais conhecida de Transtornos do Espectro Autista (TEA) (TEO *et al.*, 2012; WANG, T.; BRAY; WARREN, 2012). O gene *Fragile X-linked Mental Retardation 1* (*FMR1,* OMIM 309550*)*, localizado no cromossomo Xq27.3, é silenciado quando há expansão de mais de 200 cópias da repetição do trinucleotídeo citosina-guanina-guanina (CGG) na sua região promotora, o que leva, consequentemente, à ausência da síntese da proteína *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP), que causa a manifestação do fenótipo característico da síndrome (HUNTER *et al.*, 2014; MOR-SHAKED; EIGES, 2018).

A FMRP é necessária para o desenvolvimento e função normal do sistema nervoso central (SNC), executando um papel essencial tanto na função sináptica como na maturação dos dendritos (DARNELL *et al.*, 2001; MALECKI *et al.*, 2020). A FMRP é uma proteína de ligação ao RNA e faz parte do complexo ribonucleoprotéico (mRNP), envolvido no transporte e tradução de RNA mensageiro (mRNA) nos neurônios e, consequentemente, regula a síntese de proteínas localizadas nos dendritos, envolvidas no desenvolvimento da sinapse e na plasticidade neuronal (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011; EDENS *et al.*, 2019). Portanto, a ausência da FMRP prejudica a plasticidade sináptica normal e causa anormalidades do desenvolvimento cerebral e como resultado, os pacientes com SXF são afetados cognitivamente e apresentam problemas comportamentais (HAGERMAN *et al.*, 2009; HUNTER *et al.*, 2014).

A regulação da tradução de mRNAs realizada pela FMRP ocorre pela interação com os microRNAs (miRNAs) (JIN *et al.*, 2004; BARDONI *et al.*, 2006). Os miRNAs são uma classe de RNAs não-codificantes de aproximadamente 22pb que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, através da degradação ou silenciamento de seu mRNA alvo (BARTEL, 2009; PEREIRA, 2015). Os miRNAs possuem papel crucial em vários processos biológicos e sua expressão alterada está fortemente relacionada com a patogênese e processos que afetam o SNC (WANG, W.; KWON; TSAI, 2012; DENK *et al.*, 2018). Os miRNAs são abundantemente

expressos no cérebro e são secretados pelos neurônios através de microvesículas detectáveis de maneira estável no sangue, sendo considerados bons biomarcadores para as neuropatologias (MACIOTTA; MEREGALLI; TORRENTE, 2013; VISWAMBHARAN *et al.*, 2017). Recentemente os miRNAs estão sendo observados como alvos terapêuticos, relacionados a modelos de resistência a alterações neuronais, trazendo melhorias à resposta cognitiva e sensorial (WU; KUO, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SHAO, 2021).

Em trabalhos anteriores, realizados em modelos experimentais para a SXF, foi observado que no desenvolvimento neuronal normal, a FMRP se liga a diversos miRNAs, dentre estes o miR-125b e o miR-132, para regular vias de sinalização neuronal, incluindo a sinalização dos receptores de glutamato metabotrópico (mGluR) e *N*-metil-D-aspartato (NMDAR) e consequentemente influenciando na plasticidade sináptica (JIN; ALISCH; WARREN, 2004; EDBAUER *et al.*, 2010; LIN, 2015; DEMARCO *et al.*, 2019). Além disso, os miR-125b e miR-132 atuam em vias de regulação cerebral e são encontrados desregulados em diversas neuropatologias, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose múltipla (VISWAMBHARAN *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2020; KANACH *et al.*, 2021).

Sendo assim, o objetivo do atual trabalho foi validar, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), a expressão de miR-125b-5p e miR-132-3p, circulantes no soro sanguíneo, de pacientes com SXF, a fim de definir o perfil de expressão e se corrobora com os resultados anteriores de outras neuropatologias. Os resultados podem ajudar a reforçar a possibilidade do uso destes miRNAs como biomarcadores eficientes para a SXF. A técnica de RT-qPCR foi escolhida por ser a melhor e mais econômica técnica para validação de miRNAs diferencialmente expressos já conhecidos (CONDRAT *et al.*, 2020).

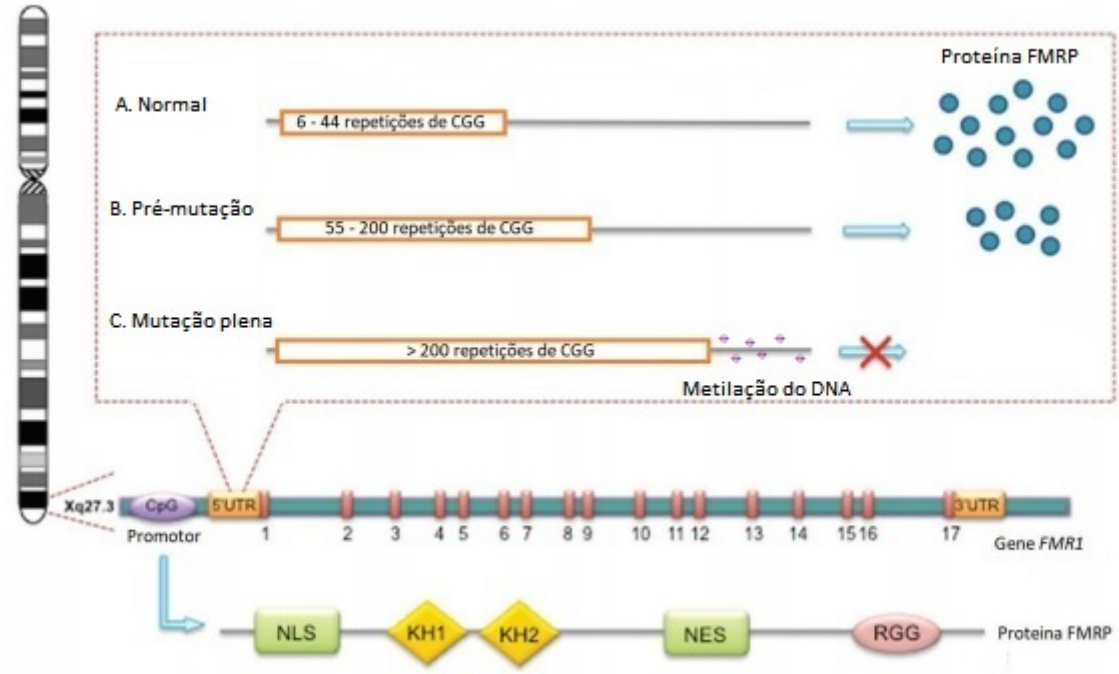
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME DO X-FRÁGIL E O GENE *FMR1*

O gene *FMR1*, localizado no cromossomo X, na região Xq27.3, quando mutado torna-se não funcional, causando a Síndrome do X Frágil (SXF). A SXF é a principal causa hereditária de Deficiência Intelectual (DI) no mundo e a causa genética mais conhecida de Transtornos do Espectro Autista (TEA) (TEO *et al.*, 2012; WANG, T.; BRAY; WARREN, 2012). A síndrome é considerada de importância epidemiológica entre os homens, pois afeta aproximadamente 1 a cada 4.000 homens e 1 a cada 7.000-8.000 mulheres, não havendo prevalência definida da SXF no Brasil (VIVEIROS *et al.*, 2015). Além disso, o quadro clínico dos homens com a SXF é mais grave do que das mulheres, pois eles apresentam a mutação em hemizigose, enquanto as mulheres apresentam um segundo cromossomo X normal, podendo levar a inativação do mutado (SANTORO; BRAY; WARREN, 2012).

Indivíduos com a SXF apresentam amplo espectro clínico, com principais características a DI, TEA, Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM) e alterações comportamentais, como ansiedade, agressividade, hiperatividade, aversão ao contato visual e hábito de morder as mãos. Características físicas como macrocefalia, face dismórfica, orelhas proeminentes e macroorquidismo também são achados comuns em pacientes afetados (SALDARRIAGA *et al.*, 2014; TABOLACCI; NERI, 2016). Este amplo fenótipo característico da síndrome é originado pela ausência da proteína FMRP, resultado do silenciamento do gene *FMR1* que ocorre através da expansão de mais de 200 repetições do trinucleotídeo citosina-guanina-guanina (CGG) na região 5’ não traduzida (UTR) do gene, ocasionado sua hipermetilação, e consequentemente silenciando sua expressão. Quando isso ocorre denomina-se mutação plena (MP) (Figura 1C), que é a causa da SXF (HUNTER *et al.*, 2014; MOR-SHAKED; EIGES, 2018).

Figura 1 - O gene *FMR1* e a proteína FMRP



***FMR1*, localizado no cromossomo X na região Xq27.3, é composto por 17 éxons e é caracterizado pela presença de repetições instáveis da sequência (CGG)n polimórfica na região 5'UTR. A. Normal: alelo não-metilado, possui de 6 a 44 repetições CGG e produção normal da proteína FMRP. B. Pré-mutação: alelo não-metilado, possui 55 a 200 repetições CGG e produção diminuída da proteína FMRP. C. Mutação Plena: alelo metilado, possui mais de 200 repetições CGG e não produz a proteína FMRP. O produto do gene *FMR1*, a proteína FMRP, é composta por um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES), dois domínios de homologia de ribonucleoproteína K (KH1-KH2), um aglomerado de resíduos de arginina e glicina (caixa RGG).**

Fonte: Adaptado e modificado de BASSANI et al., 2013.

O limite normal de repetições na região 5'UTR do gene *FMR1* é de até 44 (CGG)n, indivíduos com 45 a 54 repetições são classificados como intermediários e indivíduos com 55 a 200 repetições possuem a pré-mutação (PM) (TEO *et al.*, 2012). Indivíduos com PM estão propensos a desenvolverem principalmente a síndrome de tremor/ataxia associada ao X Frágil (FXTAS) e a insuficiência ovariana prematura associada ao X Frágil (FXPOI) (HUNTER *et al.*, 2008). Estes e outros quadros clínicos, como déficit de atenção, hiperatividade e fobia social, foram relacionados com a PM devido ao aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) do *FMR1* e a redução dos

níveis da proteína FMRP (Figura 1B), o que leva a distúrbios neurodegenerativos com o passar dos anos (SANTORO; BRAY; WARREN, 2012).

Alguns pacientes possuem células com números variados da repetição (CGG)n, esse fenômeno é bastante comum na SXF e ocorre pela instabilidade somática durante os primeiros estágios da embriogênese (MANDEL; BIANCALANA, 2004). Durante a embriogênese, quando a metilação ainda não foi completamente estabelecida, as repetições (CGG)n podem apresentar instabilidade durante as mitoses e levar ao mosaicismo quanto ao tamanho da expansão da repetição (CGG)n, podendo ser mosaicismo de MP e PM, mosaicismo de MP e alelo normal e mosaicismo de MP, PM e alelo normal. Todos os pacientes mosaicos para o tamanho da repetição (CGG)n são afetados para a SXF (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

As características comportamentais e físicas da SXF contribuem para o diagnóstico da síndrome, que acontece, em média, somente a partir dos três anos de vida dos pacientes (ESCH; ZEIDLER; WILLEMSEN, 2014). O diagnóstico definitivo é realizado através da análise molecular do gene *FMR1*, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a técnica mais utilizada atualmente, que possibilita a visualização de expansões (CGG)n em homens e mulheres (CIACCIO *et al.*, 2017). As recomendações indicam que o diagnóstico molecular seja feito em todos indivíduos que apresentam DI, TEA e ADNPM, devido à alta prevalência desses transtornos em portadores da SXF (SALCEDO-ARELLANO; HAGERMAN; MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2020; TASSANAKIJPANICH; HAGERMAN; WORACHOTEKAMJORN, 2021).

Até o momento não há cura para a síndrome, porém são realizados tratamentos a base de fármacos e intervenções associadas a psicoterapia e a terapia comportamental que visam amenizar a progressão da doença, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e diminuir os sintomas de ansiedade, agressividade, hiperatividade e distúrbios do humor. A existência destes tratamentos aumenta a necessidade de um diagnóstico precoce da SXF, antes que a doença se agrave (HAGERMAN *et al.*, 2009; TASSANAKIJPANICH; HAGERMAN; WORACHOTEKAMJORN, 2021).

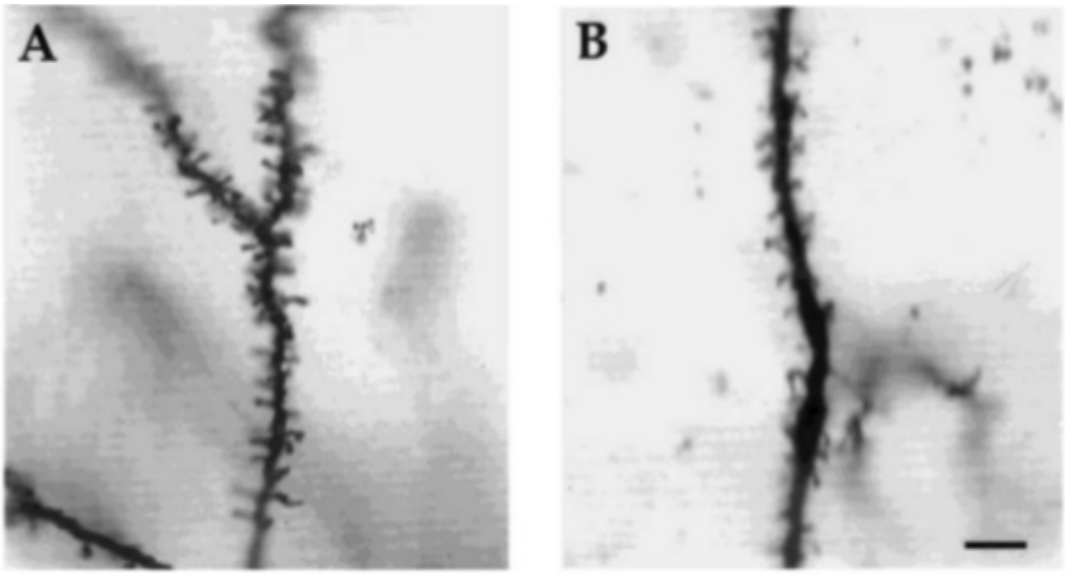
2.2 A PROTEÍNA FMRP

O produto da expressão do gene *FMR1*, a proteína FMRP, pertence à família das ribonucleoproteínas, que são proteínas de ligação ao RNA envolvidas no transporte e tradução de mRNA (BASSANI *et al.*, 2013; MALECKI *et al.*, 2020). Sua capacidade de ligação ao RNA é devido ao domínio caixa-RGG (arginina-glicina-glicina) em sua região C-terminal e aos domínios KH (ribonucleoproteína heterogênea nuclear K), presentes na sua região central, como mostra na Figura 1. Já os sinais de localização nuclear (NLS) e exportação nuclear (NES), permitem que a proteína transite entre o núcleo e o citoplasma, transportando seu mRNAs alvos (BASSANI *et al.*, 2013; EDENS *et al.*, 2019; MALECKI *et al.*, 2020).

A FMRP é expressa em muitos tecidos, mas é mais abundante no cérebro, testículos e ovários (KAUFMANN *et al.*, 2002; MALECKI *et al.*, 2020). Ela é encontrada principalmente no sistema nervoso central (SNC), especialmente nas espinhas dendríticas, que são evaginações da membrana neuronal, responsáveis pelo recebimento e transdução do sinal pré-sináptico, dependentes da síntese protéica (DARNELL *et al.*, 2011; PENZES *et al.*, 2011). Após estimulação do receptor metabotrópico de glutamato (mGluR), ocorre o aumento da síntese de FMRP nos neurônios e nos dendritos, demonstrando a importância da síntese da proteína no SNC em resposta a atividade sináptica (WEILER *et al.*, 2004).

A ausência da FMRP no SNC, tanto de camundongos modelos para a SXF, que possuem o gene *FMR1* deletado (KO), como em pacientes com a SXF, leva a anormalidades do desenvolvimento cerebral, imaturidade neuronal e espinhas dendríticas de morfologia alterada, condensadas e altamente ramificadas (Figura 2) (COMERY *et al.*, 1997; NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001). Essas alterações surgem devido à falta de controle da FMRP na tradução de proteínas nas espinhas dendríticas, o que leva a síntese excessiva de proteínas na região sináptica (NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001; SANTORO; BRAY; WARREN, 2012). Portanto, o controle da FMRP no SNC é importante para o desenvolvimento e maturação normal dos dendritos e conexões sinápticas (NIMCHINSKY; OBERLANDER; SVOBODA, 2001; MALECKI *et al.*, 2020).

Figura 2 - Dendritos de camundongos com SXF e selvagem

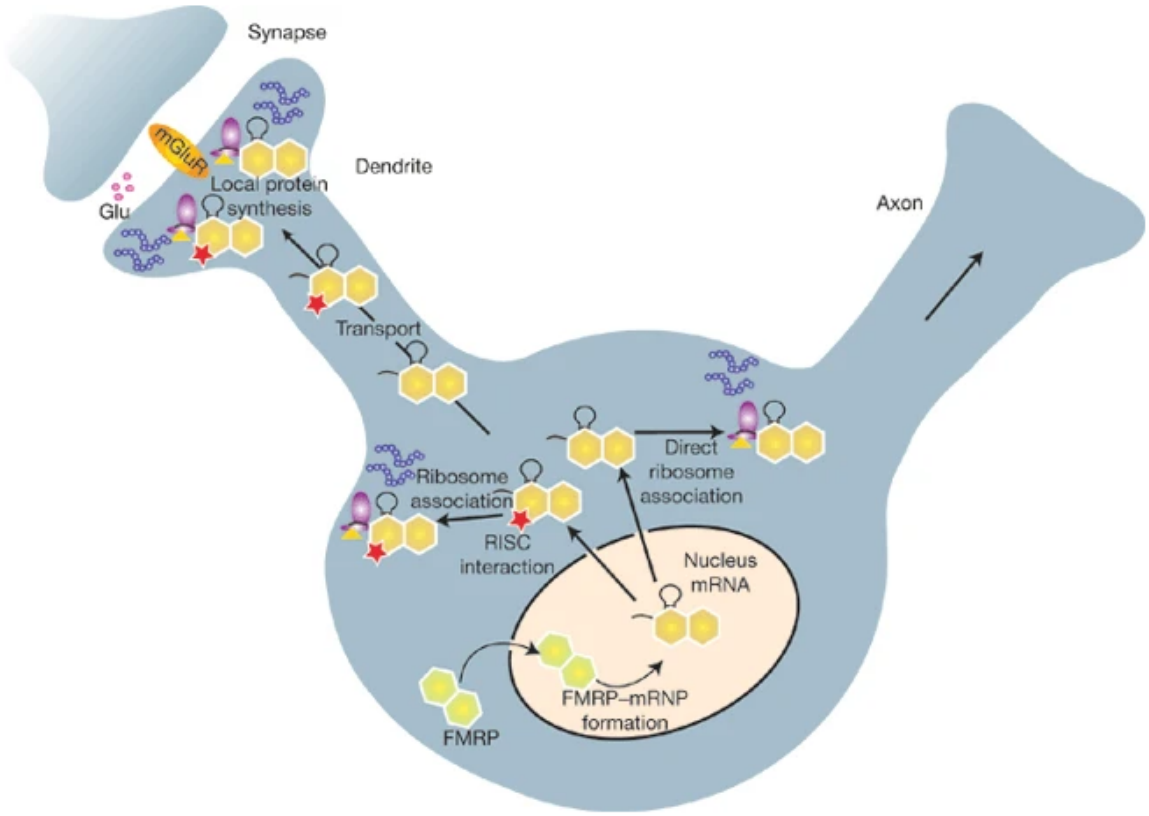


A: Cérebro de camundongo modelo para a SXF, KO *FMR1*, apresenta anormalidades das espinhas dendríticas, que se mostram mais longas, finas, densas e em maior número. B: cérebro de camundongo selvagem com a presença de espinhas dendríticas típicas.

Fonte: Adaptado de COMERY *et al.*, 1997.

Sua função, conforme demonstrado na figura 3, inicia uma vez que a FMRP é sintetizada, quando entra no núcleo, interage com seu mRNA alvo e se associa a outras proteínas para formar o complexo ribonucleoprotéico (mRNP). Este complexo transporta os mRNAs alvos desde o núcleo até o citoplasma dos dendritos, onde se associa com ribossomos. Para a inativação provisória dos mRNAs alvos, a FMRP fosforilada interage com o complexo de silenciamento induzido por microRNA (RISC), permitindo o reconhecimento do mRNA alvo por microRNAs e, consequentemente, reprimindo a tradução do seu mRNA alvo (JIN *et al.*, 2004; BARDONI *et al.*, 2006). Nas espinhas dendríticas, após a recepção de sinais sinápticos apropriados do mGluR, a FMRP é desfosforilada e se desassocia do complexo RISC, permitindo que os ribossomos realizem a síntese protéica do mRNA alvo transportado, traduzindo proteínas chaves da plasticidade sináptica, importantes para o desenvolvimento da sinapse, dos dendritos e da plasticidade neuronal (DARNELL *et al.*, 2011; MUDDASHETTY *et al.*, 2011).

Figura 3 - Função da FMRP nos neurônios



Uma vez sintetizada, no citoplasma, a proteína FMRP entra no núcleo e interage com outras proteínas para formar o complexo ribonucleoprotéico mRNP e pode se ligar a mRNA alvos. Posteriormente, o complexo sai do núcleo, carregando seu mRNA alvo e se associa aos ribossomos. No complexo, os mRNAs podem ser inativados, devido a interação da FMRP com o complexo RISC. O complexo transporta mRNAs ao longo do dendrito até a região sináptica, onde os mRNAs são traduzidos pelos ribossomos, após a sinalização de neurotransmissores que inibem a FMRP por desfosforilação. RISC- Complexo de silenciamento induzido por RNA; mRNA- RNA mensageiro; mRNP- complexo ribonucleoprotéico; mGluR- receptor metabotrópico de glutamato.

Fonte: JIN et al., 2004.

Brown e colaboradores (2001), através de ensaio de *microarray*, identificaram que a FMRP se liga diretamente a aproximadamente 4% dos mRNAs transcritos no cérebro e regula a sua expressão através da interação com os ribossomos e com componentes do complexo RISC (BROWN *et al.*, 2001; MIYASHIRO *et al.*, 2003). No complexo RISC, a FMRP interage especificamente com a proteína Argonauta e com os microRNAs, para regular a expressão de mRNAs cerebrais (JIN *et al.*, 2004).

2.3 MICRORNAS (MIRNAS)

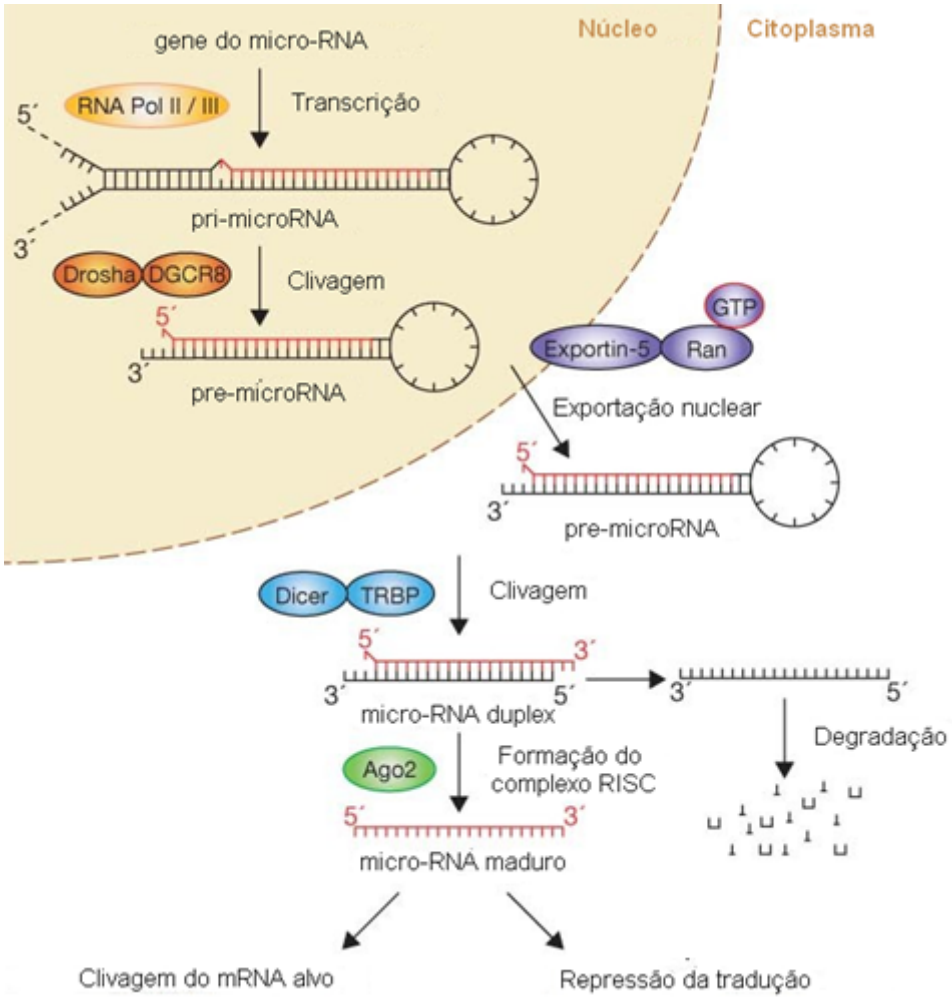
Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes de fita simples de aproximadamente 22 nucleotídeos envolvidos na regulação gênica pós-transcricional (BARTEL, 2009; KROL *et al.*, 2010). Seu papel no processo da regulação gênica ocorre em diferentes processos biológicos importantes das células, incluindo proliferação, diferenciação, desenvolvimento, envelhecimento, apoptose e neurogênese (SASSEN; MISKA; CALDAS, 2008; WANG, W.; KWON; TSAI, 2012; MACIOTTA; MEREGALLI; TORRENTE, 2013; DENK *et al.*, 2018). Esta classe de pequenos RNAs possui alta homologia e conservação entre as espécies, indicando que possivelmente esse mecanismo de regulação é consideravelmente antigo (HU *et al.*, 2014).

Seu processo de biogênese, ilustrado na figura 4, é iniciado no núcleo celular com a transcrição do seu respectivo gene pela RNA polimerase II ou III, dando origem ao microRNA primário (pri-microRNA). Posteriormente, ainda no núcleo, o pri-microRNA sofre clivagem na região 3’ e 5’ pelo complexo enzimático Drosha e seu co-fator DGCR8, transformando-o no miRNA precursor (pre-microRNA), uma molécula menor e mais estável, capaz de ser exportada do núcleo para o citoplasma pelo auxílio do complexo protéico exportina-5 e Ran-GTP. No citoplasma o pré-microRNA é clivado pela enzima Dicer gerando uma fita dupla de apenas 18 a 24 nucleotídeos, o microRNA duplex. O microRNA duplex interage com a proteína Argonauta (Ago2) e uma de suas fitas é solta, podendo ser degradada, enquanto a outra se une a Ago2, formando o Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA, RISC. O complexo RISC direciona o miRNA fita simples até seus mRNAs alvos, impedindo sua síntese de proteína (WINTER *et al.*, 2009; PEREIRA, 2015).

Os miRNAs se ligam aos mRNAs alvo através da região *seed*, que inclui de dois até oito nucleotídeos da sua sequência. Quando há pareamento completo de bases entre a região *seed* do miRNA e sequências complementares da região 3’UTR do mRNA alvo, o mRNA alvo é clivado, porém quando a região *seed* do miRNA se pareia de forma incompleta à essa região do mRNA alvo, ocorre apenas uma repressão da tradução (MELO; MELO, 2014; PEREIRA, 2015). Um único miRNA pode se ligar e regular múltiplos mRNAs alvos, com distintas funções, ou ao contrário, diferentes

miRNAs podem se ligar de forma cooperativa para controlar um único mRNA alvo (BARTEL, 2009; MELO; MELO, 2014).

Figura 4 - Biogênese dos microRNAs



O transcrito pri-microRNA é sintetizado pela RNA polimerase II ou III. Em seguida, o pri-microRNA é processado pela Drosha/DGCR8 para formar o pre-microRNA, que é exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5 Ran-GTP. No citoplasma o pre-microRNA é clivado pela Dicer-TRBP, gerando um micro-RNA duplex que interage com a proteína Ago2, e a fita mais estável forma o complexo RISC. O microRNA maduro de fita simples estará pronto para interagir com o mRNA alvo. Pri-microRNA: microRNA primário; pre-microRNA: microRNA precursor; RNA pol II/III: RNA polimerase II ou III; Drosha/DGCR8: Complexo enzimático de clivagem de pri-microRNA; Exportin-5: Exportina-5; Ran-GTP: Proteína nuclear de ligação a GTP; Dicer: Endoribonuclease Dicer; TRBP: Proteína de resposta de transativação ligada ao RNA; Ago2: proteína Argonauta; RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA.

Fonte: Adaptado de WINTER *et al*., 2009.

A nomenclatura dos miRNAs, de acordo com a miRBase, base de dados criada em 2002 para o registro de miRNAs, sugere que o prefixo inicial de três caracteres dos miRNAs se refere ao nome da espécie, por exemplo no hsa-miR-125b-5p o “hsa” se refere a *Homo sapiens*, o “miR” indica que é uma forma madura do miRNA, e o número 125 segue uma contagem numérica, sendo o 125º miRNA humano a ser descoberto. As letras que sucedem a numeração, como “a”, “b”, “c”, entre outras, indicam sequências similares de miRNAs na posição da fita *sense* ou *antisense*. O sufixo “-5p” ou “-3p” representam a extremidade do pré-microRNA da qual o miRNA maduro se originou (miRBase, 2021).

Os miRNAs são altamente expressos no cérebro e possuem implicação direta na regulação de genes envolvidos no funcionamento normal do SNC, na neurogênese, plasticidade e à resposta neuronal (PRESUTTI *et al.*, 2006; DE PIETRI TONELLI *et al.*, 2008; MACIOTTA; MEREGALLI; TORRENTE, 2013). Mutações em genes que codificam miRNAs que atuam no SNC ou em genes que codificam proteínas de ligação a miRNAs, como no caso da SXF, podem acarretar função neuronal alterada, além de também ter relação com a etiologia de distúrbios cognitivos, como aprendizagem, memória e emoções (WANG, W.; KWON; TSAI, 2012; HU *et al.*, 2014). As células neuronais secretam os miRNAs em fluidos biológicos, através de vesículas extracelulares estáveis, o que está fortemente relacionado à neuroinflamação e à comunicação intercelular, além disso, essa característica torna os miRNAs biomarcadores acessíveis para a avaliação de estados neuropatológicos (BATISTELA *et al.*, 2017; CHA *et al.*, 2019; DENK *et al.*, 2018).

Biomarcadores de uma condição orgânica são parâmetros biológicos quantificáveis e que tem relação com um processo normal ou patogênico (ATKINSON *et al.*, 2001). Os miRNAs têm se mostrado biomarcadores promissores, uma vez que eles são estáveis em diferentes fluidos corporais, resistentes à degradação e são observados envolvidos na patogênese, com níveis alterados em diversas patologias, incluindo as neuropatologias (VISWAMBHARAN *et al.*, 2017). Cada fluido corporal possui sua peculiaridade, sendo os miRNAs obtidos de sangue periférico total, os mais bem caracterizados até o momento, por serem estáveis e de fácil obtenção, menos invasivo de serem obtidos (WANG, Z.; LU; HAN, 2012; DENK *et al.*, 2018).

Diversos miRNAs sanguíneos são observados diferencialmente expressos em neuropatologias e estão sendo estudados como biomarcadores prognósticos, como por exemplo o hsa-miR-501-3p, que foi observado diferencialmente expresso no soro de pacientes com Alzheimer, relacionado com a neuroinflamação, e com especificidade de 100% em diferenciar a doença (HARA *et al.*, 2017; VISWAMBHARAN *et al.*, 2017; KANACH *et al.*, 2021). Como biomarcadores, os miRNAs, podem auxiliar no diagnóstico precoce, no prognóstico, no entendimento do processo patológico complexo e na resposta terapêutica, tanto na definição de um subconjunto de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamento de fármacos específicos, como utilizando os próprios miRNAs como alvos terapêuticos, acarretando mudança na sinalização de processos biológicos (ROY *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021). Recentemente estudos relacionaram os miRNAs a modelos de resistência a resposta inflamatória, ao estresse, e a neurodegeneração, melhorando significativamente a cognição, a mobilidade e a aprendizagem, além de evidenciar ainda mais a importância e a contribuição dessas moléculas (WU; KUO, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SHAO, 2021).

2.4 SXF E MIRNAS

No genoma humano, o gene *FMR1* apresenta homologia com outras espécies, levando a similaridade entre 70 a 90% de proteínas homólogas a FMRP (BARDONI; SCHENCK; MANDEL, 2001). Diversos organismos possuem uma ou mais proteínas homólogas a FMRP humana, entre os que possuem seu genoma sequenciado e depositados no NCBI (GenBank), encontramos homólogos em *Mus musculus* (camundongo), *Rattus norvegicus* (rato), *Danio rerio* (*zebrafish*), Drosophila *melanogaster* (mosca da fruta), entre outros (NCBI, 2021). A existência destas sequências homólogas à FMRP nestes organismos é muito importante para estudos genômicos através da criação de animais modelos para a SXF (BARDONI; SCHENCK; MANDEL, 2001).

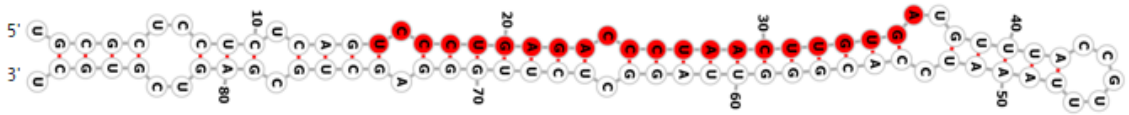
Os primeiros estudos realizados em modelos animais para a SXF observaram que em *Drosophila* a proteína FMRP interage com a proteína eIF2C2, homóloga da proteína Ago2, e através de ensaio de *microarray* foi observado que a proteína se

associa especificamente a 12 miRNAs, incluindo os miRNAs miR-125b e miR-132 durante o desenvolvimento neuronal normal de camundongos, para regular a sinalização dos receptores mGluR e *N*-metil-D-aspartato (NMDAR), envolvidos na plasticidade sináptica, plasticidade neuronal, aprendizado e memória (JIN; ALISCH; WARREN, 2004; EDBAUER *et al.*, 2010). Mais especificamente, foi identificado no cérebro de camundongos a baixa expressão dos miR-125b e miR-132 relacionada com anormalidades na morfologia neuronal e nas espinhas dendríticas (EDBAUER *et al.*, 2010). Recentemente, um estudo realizado por DeMarco *et al* (2019), demonstrou *in vitro* que a FMRP se liga diretamente ao miR-125a e miR-125b fora de suas regiões *seed* (DEMARCO *et al.*, 2019). Além disso, em células neuronais de camundongos foi observado que a FMRP fosforilada se liga ao complexo RISC, através da interação com a proteína Ago2 juntamente com o miR-125 e miR-132, e atuam em conjunto para inibir de forma reversível a tradução da Proteína de densidade sináptica 95 (PSD-95) e, em resposta a estímulos sinápticos do mGluR, a FMRP é desfosforilada e dissocia-se do complexo RISC, permitindo a produção da proteína pós-sináptica PSD-95, essencial para a localização dos receptores mGLUR e NMDAR, e consequentemente função sináptica (MUDDASHETTY *et al.*, 2011; NIE *et al.*, 2020). Ainda mais recente, foi observado que o miR-125a, homólogo ao miR-125b, se encontra superexpresso na urina de pacientes com SXF, demonstrando que os miRNAs da família do miR-125 são potenciais biomarcadores para a SXF (PUTKONEN *et al.*, 2020).

2.5 HSA-MIR-125B-5P

O hsa-miR-125b-5p é um pequeno RNA não codificante de 22 nucleotídeos de comprimento. Sua sequência inicia na posição 15 da fita e termina na posição 36, sendo ela: 15-ucccugagacccuaacuuguga- 36 (Figura 5). O hsa-miR-125b-5p é um dos miRNAs maduros, produto do gene *MIR125B1*, que se encontra localizado no cromossomo 11q24.1 (miRBase, 2021). Até o momento foi encontrado em 97 espécies diferentes e possui 115 genes homólogos, incluindo o miR-125a no *H. Sapiens* (ENSEMBL, 2021; RNAcentral, 2021).

Figura 5 - Estrutura secundária do pre-microRNA do hsa-miR-125b-5p



Em vermelho, a sequência de bases que formam o miRNA maduro.

Fonte: http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/

miR-125b se encontra relacionado a vários genes e vias neurais na espécie humana, que envolvem a regulação de processos metabólicos normais e neuropatológicos (LEE *et al.*, 2005; DIANA-mirpath v.3, 2021). Diferentes estudos mostram a atuação de miR-125b em processos de regulação cerebral em diferentes neuropatologias, como na demência, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e Esclerose Múltipla (SHENG *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2019; ZHUANG *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2021). Além do mais, miR-125b circulante foi descrito como uma boa opção de biomarcador circulante para a doença de Alzheimer, podendo servir como biomarcador prognóstico não invasivo para esta neuropatologia, com alta sensibilidade e especificidade (TAN *et al.*, 2014; ZHUANG *et al.*, 2020).

2.6 HSA-MIR-132-3P

O hsa-miR-132-3p é um pequeno RNA não codificante de 22 nucleotídeos de comprimento. Sua sequência de nucleotídeos 59-uaacagucuacagccauggucg-80 (Figura 6) é produto do gene *MIR132*, localizado no cromossomo 17p13.3. Este miRNA maduro é encontrado em 35 espécies diferentes e possui 96 genes homólogos (ENSEMBL, 2021; miRBase, 2021; NCBI, 2021).

Figura 6 - Estrutura secundária do pre-microRNA do hsa-miR-132-3p

Em vermelho, a sequência de bases que formam o miRNA maduro.

Fonte: http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/

O miR-132 é encontrado de forma abundante no SNC, sendo o miRNA mais estudado relacionado a atividade neuronal (SIM; BAKES; KAANG, 2014; SMITH *et al.*, 2015; JUŹWIK *et al.*, 2019). Em cultura de células neuronais, miR-132 apresenta sua expressão elevada após estímulos neuronais, em contraponto, na redução da atividade neuronal os níveis de expressão dele diminuem, demonstrando sua participação na atividade do SNC (MELLIOS *et al.*, 2011; TOGNINI *et al.*, 2011). Diversos outros estudos demonstram que o miR-132 participa tanto no desenvolvimento, na manutenção e na diferenciação neuronal, como na plasticidade sináptica relacionado a processos de memória e aprendizado, sendo considerado potencial biomarcador para diversas neuropatologias como Alzheimer, Parkinson, Esclerose múltipla e Huntington (WANG, R. Y. *et al.*, 2013; SIM; BAKES; KAANG, 2014; JUŹWIK *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; KANACH *et al.*, 2021; MARTINEZ; PEPLOW, 2021). Recentemente, foi demonstrado em modelos animais que miR-132 pode modular níveis de PSD-95, através da regulação indireta da proteína FMRP e seu homólogo, a *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1* (FXR1), o que demonstra a complexa interação entre FMRP e miR-132 (NIE *et al.*, 2020). Além disso, a expressão de miR-132 foi observada sensível a terapia para Parkinson, associando a melhoria dos pacientes com as alterações deste miRNA, mostrando seu potencial uso para terapia de neuropatologias (ALIEVA *et al.*, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Os miRNAs têm sido detectados de maneira estável em diversos fluidos biológicos, principalmente no sangue, e a desregulação de sua expressão está associada a diversas doenças e a progressão das mesmas (BATISTELA *et al.*, 2017; HARA *et al.*, 2017). Estas características colocam os miRNAs como promissores biomarcadores para diagnóstico e indicadores prognóstico, mais práticos e menos invasivos de diferentes doenças, principalmente das neuropatologias (VISWAMBHARAN *et al.*, 2017; DENK *et al.*, 2018). Além disso, os miRNAs foram relacionados a modelos de resistência a neuroinflamação, colocando-os como possíveis alvos terapêuticos de neuropatologias (WU; KUO, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SHAO, 2021).

A SXF é uma doença do neurodesenvolvimento complexa que possui um fenótipo amplo, além das características físicas, inclui déficits cognitivos e comportamentais, causando comprometimento na aprendizagem, na aquisição da linguagem, no âmbito social e comportamental, justificados principalmente pela DI e TEA, características que nem sempre se manifestam de forma evidente durante a infância, além de possuírem difícil diagnóstico. O diagnóstico tardio da SXF prejudica o tratamento precoce destes sintomas associados a psicoterapia e à terapia comportamental (SALCEDO-ARELLANO; HAGERMAN; MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2020). Tendo em vista a complexidade da SXF e a ausência de cura, torna-se necessário estudos que procurem compreender melhor o processo neuropatológico da síndrome a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (TASSANAKIJPANICH; HAGERMAN; WORACHOTEKAMJORN, 2021).

Em vista dos miRNAs já estudados em modelos experimentais e relatados na literatura, a análise da expressão gênica dos miR-125b e miR-132 associados a patogênese da SXF irá auxiliar em novas descobertas para melhorar a compreensão dos mecanismos patológicos da doença. O estudo da expressão de miRNAs pela técnica de qPCR pode ajudar a identificar um bom biomarcador, além de produzir painéis e bibliotecas de miRNAs envolvidos na SXF (DENK *et al.*, 2018). A técnica de qPCR, escolhida para o atual estudo, é uma técnica de baixo custo, eficiente para a

validação de miRNAs diferencialmente expressos já conhecidos (CONDRAT *et al.*, 2020).

4 HIPÓTESE

A hipótese nula foi de que os pacientes com SXF e os controles apresentariam distribuição normal para valores de quantificação relativa (RQ) dos miR-125 e miR-132, enquanto a hipótese alternativa propunha que os pacientes com SXF apresentariam uma maior expressão dos miRNAs estudados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através da PCR quantitativa em tempo real a partir de RNA retrotranscrito em DNA (RT-qPCR) a expressão de dois microRNAs circulantes (hsa-miR-125b-5p e hsa-miR-132-3p) em soro de pacientes com SXF como opção de biomarcadores para o diagnóstico diferencial da SXF.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o perfil de expressão dos hsa-miR-125b-5p e hsa-miR-132-3p a partir de amostras de soro em pacientes com diagnóstico de SXF;
- Correlacionar os dados de expressão gênica dos microRNAs com os dados clínicos e genotípicos disponíveis dos pacientes com SXF;
- Comparar os resultados encontrados com os achados de outras neuropatologias;
- Realizar uma busca *in silico* por genes alvo (mRNAs-alvo) dos miR-125b-5p e miR-132-3p;

6 MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo Observacional Transversal Comparativo.

6.2 AMOSTRA

Pacientes com diagnóstico da SXF com acompanhamento no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) foram recrutados neste estudo. Além disso, foram incluídos no estudo indivíduos controles, não acometidos com a SXF e neuropatologias, doadores do Banco de Sangue do HCPA. Apenas foram incluídos na amostra indivíduos que preencheram os critérios de inclusão.

O número de amostras analisadas no estudo foi baseado em uma amostra de conveniência de pacientes com SXF. No período que compreende os anos de 2012 a 2017 foram diagnosticados com SXF uma média de 8 pacientes do sexo masculino por ano no HCPA. Estimou-se que a população a ser estudada durante o período do projeto seria de 20 pacientes do sexo masculino com a síndrome e, portanto, 20 indivíduos controles. Devido a pandemia do coronavírus não foi possível coletar os 20 pacientes com SXF, totalizando 10 pacientes com SXF e 20 indivíduos controles.

6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

6.3.1 Critérios de inclusão para o grupo de pacientes com Síndrome do X-Frágil

Foram incluídos no estudo pacientes com SXF, em condições físicas e psicológicas para coleta de sangue venoso, cujos responsáveis legais concordaram com a participação através da assinatura do TCLE.

6.3.2 Critérios de inclusão para o grupo de indivíduos controle

Foram incluídos no estudo indivíduos do sexo masculino não portadores da SXF e neuropatologias, doadores do Banco de Sangue do HCPA, com idade máxima de 25 anos.

6.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para os indivíduos com SXF, o convite para participar do estudo ocorreu no momento das consultas de rotina no ambulatório do Serviço de Genética Médica do HCPA. Na referida ocasião não foram utilizados termos técnicos ao explicar ao responsável legal o motivo do convite para participação no projeto. Foi utilizada uma linguagem simples e acolhedora para que eles pudessem compreender o que seria realizado. Os responsáveis que aceitaram o convite assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), cujo o modelos está disponível no Apêndice A. Após assinado o TCLE, foram encaminhados para a coleta de sangue no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do HCPA. Não foi necessário que os pacientes estivessem em jejum para a realização das coletas. As amostras de sangue foram coletadas por um técnico habilitado do HCPA. Todas coletas foram realizadas através de punção venosa em tubo sem anticoagulante, utilizando seringas e agulhas estéreis descartáveis.

Em relação aos indivíduos do grupo controle, as amostras foram obtidas a partir de doadores do Banco de Sangue do HCPA que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE, encontrado no Apêndice B. Portanto, os indivíduos controles não precisaram ser submetidos a nova punção, não agregando riscos aos indivíduos.

6.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os responsáveis e indivíduos controles assinaram o TCLE. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em pesquisa (CEP-HCPA) sob número: 2018-0264.

6.6 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA E SEPARAÇÃO DO SORO

O sangue dos participantes foi coletado em tubo de coleta de 5 mL sem anticoagulante, seguindo as normas de boas práticas clínicas. Após a coleta, a amostra ficou em repouso por cerca de 30 min à temperatura ambiente a fim de possibilitar a coagulação do sangue. As próximas etapas do estudo foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular (LGM) do SGM-HCPA. Em seguida, foi realizada centrifugação da amostra a 1900 g por 10 min a 4ºC. Após a centrifugação, o soro foi aliquotado e separado em criotubos devidamente identificados e armazenados a -80ºC para posterior extração do RNA total.

6.7 EXTRAÇÃO DO RNA E ANÁLISE DE QUALIDADE

O isolamento do RNA das amostras de soro foi realizado utilizando o kit específico *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen, cat no. 217184), ideal para extração e conservação de microRNAs, conforme as instruções do fabricante (Anexo 1). O kit utiliza o *QIAzol Lysis Reagent* que é uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina, responsável pela lise de proteínas complexas e RNAses, além de remover a maioria dos resíduos de DNA e proteínas. Durante a centrifugação a lise é separada em duas fases: aquosa e orgânica. Porções do RNA vão para o topo na fase aquosa, enquanto porções de DNA vão para a interfase e as proteínas vão mais para baixo, na fase orgânica. A fase superior aquosa foi então extraída, e foi adicionado etanol para prover condições apropriadas para que toda a molécula de microRNA (de aproximadamente 18-22 nucleotídeos) elevasse. A amostra foi então aplicada na *RNeasy MinElute spin column*, onde o microRNA total liga-se à membrana e o fenol e outros contaminantes são eliminados. O RNA ligado a membrana foi então eluído em um pequeno volume de água livre de RNAse.

Após a extração do RNA, foi obtida a concentração em nanogramas e a qualidade, através da razão da absorbância 260/280 das amostras, utilizando o nano espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific™) e, em seguida, foram armazenadas a -80ºC.

6.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) utilizada para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA, foi realizada utilizando o kit *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific™), conforme instruções do fabricante (Anexo 2).

As amostras de RNA foram diluídas com água livre de RNAses para que cada amostra de RNA apresentasse uma concentração final de 10 ng/uL para ser realizada a conversão para cDNA. A síntese foi realizada em 4 passos: Reação da cauda Poly(A), Reação de ligação, Reação de Transcriptase reversa (RT) e Reação da miR-Amp, no termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler. O kit realiza a RT de todos os microRNAs presentes na amostra através de um primer universal de RT que se liga na cauda poly(A) na porção 3' dos miRNAs, adicionado pela enzima poly(A) polimerase.

6.9 MIR-24 COMO CONTROLE ENDÓGENO

Para que os dados encontrados na qPCR sejam confiáveis, é necessário realizar a normalização dos resultados através de um controle endógeno que seja expresso de forma estável em todas as amostras. Esse é atualmente o método mais preciso para corrigir possíveis variações entre as reações que possam ter sido geradas no preparo das amostras e/ou da amplificação (AYAKANNU; TAYLOR; KONJE, 2020). Como controle endógeno, foi escolhido o miR-24, conforme recomendado pelo fabricante e relatado na literatura como um dos miRNAs que apresentam expressão mais estáveis em soro e plasma (MARABITA *et al.*, 2016).

6.10 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR)

A PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) foi realizada no equipamento QuantStudio3 RealTime PCR Systems (Applied Biosystems™) pelo método de detecção com sondas de hidrólise TaqMan®, em placas de 96 poços. O Kit TaqMan™ Advanced MicroRNA Assays (Applied Biosystems™) foi utilizado para o ensaio de

amplificação do cDNA, conforme instruções do fabricante (Anexo 2). Para o preparo do Mix de Reação da PCR foram utilizados os seguintes volumes:

Componente	Volume por reação em placa de 96 poços (0,2 mL)
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	10 uL
Advanced assay - Ensaio	1 uL
Água livre de nuclease	4 uL
Volume total	**15 uL**

Foram preparadas três unidades diferentes do mix, uma para cada miRNA, hsa-miR-125b-5p (ID Assay: 477885_mir), hsa-miR-132-3p (ID Assay: 477900_mir) e um mix para o controle endógeno hsa-miR-24-3p (ID Assay: 477992_mir). Em cada poço da placa foram pipetados, em duplicata:

• 15 uL de Mix de Reação PCR com a sonda adequada;

• 5 uL da amostra de cDNA respectiva;

As amostras em duplicata foram submetidas às seguintes configurações de ciclo de amplificação: 1 ciclo a 95ºC por 20 segundos, 40 ciclos sob uma temperatura de 95ºC por 1 segundo e 40 ciclos a 60ºC por 20 segundos. As etapas referem-se, respectivamente a ativação da enzima, desnaturação, anelamento e extensão.

6.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS

A quantificação da expressão por qPCR, foi feita utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que com os valores de Ct ("*Cycle Threshold*") gerados pelos ciclos de amplificação, determina a expressão do miRNAs, por meio da diferença entre o Ct do controle e do alvo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Conforme a fórmula:

RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔΔCt = (Ct médio do alvo – Ct médio do endógeno) – Ct médio do calibrador.

Para a análise, os pacientes foram estratificados em 2 grupos: Grupo SXF (composto por 10 pacientes com síndrome do X-Frágil) e Grupo CTRL (composto por 20 indivíduos controles).

Após a RT-qPCR, o software do equipamento forneceu os valores de Ct e um gráfico que representa o número de ciclos de amplificação necessários à amostra para atingir o limiar de detecção (*threshold*). A diferença entre o Ct do miRNA das amostras e o Ct médio do Grupo CTRL foi normalizada contra o controle endógeno miR-24 para o cálculo da quantificação relativa (RQ). O cálculo de RQ considerou o grupo CTRL como calibrador para o cálculo de expressão das amostras. O valor final apresentado de RQ se refere a mediana da amostra e indica quantas vezes um determinado miRNA está mais expresso na amostra teste, em relação a amostra com a qual está sendo comparado. RQ >1 indica superexpressão, enquanto RQ <1 menor expressão.

6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas na plataforma R (R Core Team 2020). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição da amostra. Em seguida, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (denominado *Wilcoxon rank sum*, na plataforma R) foi realizado para avaliar as diferenças nos níveis de expressão, admitindo um nível de significância estatística quando $P<0,05$. Esse teste permite comparar duas populações onde as distribuições não são normais, mas têm curvas similares. Ao contrário do teste-t, que compara as médias, o teste de Mann-Whitney compara um valor selecionado aleatoriamente de um grupo a um valor selecionado aleatoriamente de outro grupo, além de ser mais robusto à presença de *outliers* (TORMAN; COSTER; RIBOLDI, 2012). Portanto, amostras consideradas *outliers* foram mantidas na análise. O mesmo teste foi empregado para comparar os achados clínicos entre os grupos.

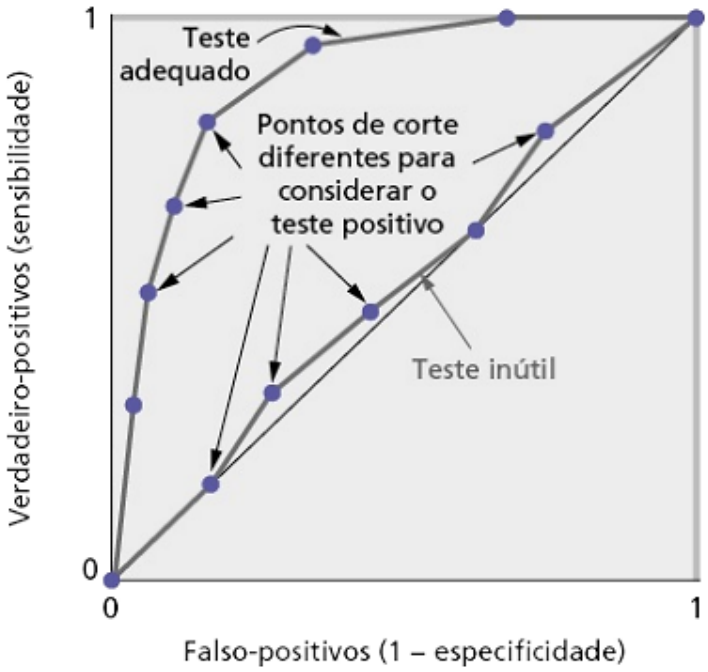
6.13 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CURVA ROC

O teste de sensibilidade e de especificidade realizado pela análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi realizado na plataforma R (versão 4.0.5),

através o uso do pacote pROC, com a finalidade de estabelecer o valor preditivo dos miR-125b e miR-132.

A curva ROC é utilizada para avaliar a sensibilidade (proporção de sujeitos com a doença para os quais o teste fornece resultado positivo, ou seja, índice de verdadeiro-positivos) e para avaliar a especificidade (proporção de sujeitos sem a doença para os quais o teste fornece resultado positivo, ou seja, índice de falsos-positivos) de um potencial biomarcador. Sua medida AUC (área sob a curva ROC) resume a acurácia do teste, como mostra na figura 7, os valores variam de 0,5 para um teste inútil a 1,0 para um teste perfeito, ou seja, quanto mais próximo os valores verdadeiros são de 1.0 (100%), mais confiável é o biomarcador avaliado para predizer o resultado, sendo capaz de diferenciar indivíduos doentes de indivíduos não doentes (HULLEY *et al.*, 2015).

Figura 7 - Curvas ROC para teste adequado e para teste inútil



Fonte: Delineando a pesquisa clínica 4ª ed.

6.14 CORRELAÇÃO COM ACHADOS CLÍNICOS/GENÓTIPO

Os dados clínicos relacionados aos variados fenótipos encontrados na SXF foram coletados dos prontuários médicos, além disso também foi realizada uma busca dos genótipos encontrados em resultados moleculares sendo os casos divididos em 2 grupos (mutação plena (MP) ou mosaico: MP + pré-mutação (PM)). Os dados clínicos pesquisados foram: Idade, DI, TEA, ADNPM, comorbidades e alteração comportamental como: agressividade e hiperatividade. Esses dados foram utilizados para pesquisar uma possível relação dessas variáveis com o genótipo da síndrome e a expressão dos miR-125b e miR-132. Para a utilização de dados do banco assistencial ou prontuário, foi submetido junto ao projeto um Termo de Compromisso para Utilização de Dados (TCUD) assinado por toda equipe da pesquisa (Anexo 3).

6.15 ANÁLISE *IN SILICO* DOS GENES ALVOS DOS MIR-125B-5P E MIR-132-3P

Através da base de dados mirPath que utiliza interações de miRNAs validados experimentalmente, foi possível investigar as principais vias biológicas envolvendo estes miRNAs (VLACHOS *et al.*, 2015). A pesquisa pela interação dos alvos de miR-125b e miR-132 foi realizada através do banco de dados *Human MicroRNA Disease Database* (HMDD V3.2), que busca por genes envolvidos em doenças (HUANG *et al.*, 2019). Através da plataforma R, com o uso do pacote MultimiR, foi possível buscar por genes envolvidos em neuropatologias (R CORE TEAM, 2020). O pacote realiza uma busca baseada em fontes de dados (*Target Scan Human*, *miRBase*, *miRTarBase*, *starBase*, *mirParth v.3* (*Diana Tools*) e *miRecords*) de interações miRNA-mRNA cujos alvos se relacionam com rotas do neurodesenvolvimento com valores de p significativos. Foram escolhidos alvos com validação experimental, através do *miRwalk* e *Tarbase v.8* (*Diana Tools*) (DWEEP; GRETZ, 2015; KARAGKOUNI *et al.*, 2018). Essas plataformas permitem a avaliação dos níveis de evidência experimental sugerindo a interação funcional entre determinado miRNA e mRNA-alvo.

REFERÊNCIAS

ALIEVA, A. K. *et al.* MiRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 21, n. 1, p. 72–74, 2015. Available at: https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2014.10.018

ATKINSON, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001. Available at: https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989

AYAKANNU, T.; TAYLOR, A. H.; KONJE, J. C. Selection of endogenous control reference genes for studies on type 1 or type 2 endometrial cancer. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-020-64663-4

BARDONI, B. *et al.* The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 08, p. 1–16, 2006. Available at: https://doi.org/10.1017/S1462399406010751

BARDONI, B.; SCHENCK, A.; MANDEL, J. L. The Fragile X mental retardation protein. *In*: , 2001. **Brain Research Bulletin**. [*S. l.*]: Brain Res Bull, 2001. p. 375–382. Available at: https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00647-5

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002

BASSANI, S. *et al.* The neurobiology of x-linked intellectual disability. **Neuroscientist**, v. 19, n. 5, p. 541–552, 2013. Available at: https://doi.org/10.1177/1073858413493972

BATISTELA, M. S. *et al.* An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 6, p. 547–558, 2017. Available at: https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1209754

BROWN, V. *et al.* Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 477–487, 2001. Available at: https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00568-2

CHA, D. J. *et al.* miR-212 and miR-132 are downregulated in neurally derived plasma exosomes of Alzheimer's patients. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019. Available at: https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.01208

CHEN, M.-L. *et al.* Inhibition of miR-331-3p and miR-9-5p ameliorates Alzheimer's disease by enhancing autophagy. **Theranostics**, v. 11, n. 5, p. 2395, 2021. Available at: https://doi.org/10.7150/THNO.47408

CIACCIO, C. *et al.* Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 43, n. 1, 2017. Available at: https://doi.org/10.1186/s13052-017-0355-y

COMERY, T. A. *et al.* Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: Maturation and pruning deficits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5401–5404, 1997. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5401

CONDRAT, C. E. *et al.* MiRNAs as biomarkers in disease: Latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. **Cells**, v. 9, n. 2, 2020. Available at: https://doi.org/10.3390/CELLS9020276

DARNELL, J. *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 247–261, 2011. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013

DARNELL, J. *et al.* Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 489–499, 2001. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719189. Acesso em: 27 set. 2017.

DE PIETRI TONELLI, D. *et al.* miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. **Development**, v. 135, n. 23, p. 3911–3921, 2008. Available at: https://doi.org/10.1242/dev.025080

DEMARCO, B. *et al.* FMRP - G-quadruplex mRNA - miR-125a interactions: Implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 2019. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217275

DENK, J. *et al.* Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 2018. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197329

DIANA-MIRPATH V.3. [*S. l.*], 2021. Available at: http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/. Acesso em: 2 ago. 2021.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature Methods 2015 12:8**, v. 12, n. 8, p. 697–697, 2015. Available at: https://doi.org/10.1038/nmeth.3485

EDBAUER, D. *et al.* Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. **Neuron**, v. 65, n. 3, p. 373–384, 2010. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.005

EDENS, B. M. *et al.* FMRP modulates neural differentiation through m6A-dependent mRNA nuclear export. **Cell Reports**, v. 28, n. 4, p. 845-854.e5, 2019. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.072

ENSEMBL. [*S. l.*], 2021. Available at: https://www.ensembl.org/. Acesso em: 2 ago. 2021.

ESCH, C. E. F.; ZEIDLER, S.; WILLEMSEN, R. Translational endpoints in fragile X

syndrome. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P2, p. 256–269, 2014. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.012

HAGERMAN, R. J. *et al.* Advances in the treatment of Fragile X Syndrome. **PEDIATRICS**, v. 123, n. 1, p. 378–390, 2009. Available at: https://doi.org/10.1542/peds.2008-0317

HARA, N. *et al.* Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica communications**, v. 5, n. 1, p. 10, 2017. Available at: https://doi.org/10.1186/s40478-017-0414-z

HU, J. *et al.* Characterization of conserved microRNAs from five different cucurbit species using computational and experimental analysis. **Biochimie**, v. 102, n. 1, p. 137–144, 2014. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.002

HUANG, Z. *et al.* HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA–disease associations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. Database issue, p. D1013, 2019. Available at: https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1010

HULLEY, S. B. *et al.* **Delineando a Pesquisa Clínica - 4ed** . [*S. l.*], 2015.

HUNTER, J. *et al.* Epidemiology of Fragile X Syndrome: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 164, n. 7, p. 1648–1658, 2014. Available at: https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36511

HUNTER *et al.* Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: Evidence for additional genetic contributions to severity. **Genetic Epidemiology**, v. 32, n. 6, p. 553–559, 2008. Available at: https://doi.org/10.1002/gepi.20329

JIN, P. *et al.* Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein 3nd the microRNA pathway. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 113–117, 2004. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1174

JIN, P.; ALISCH, R. S.; WARREN, S. T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1048–1053, 2004. Available at: https://doi.org/10.1038/ncb1104-1048

JUŹWIK, C. A. *et al.* MicroRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. **Progress in Neurobiology**, v. 182, p. 101664, 2019. Available at: https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2019.101664

KANACH, C. *et al.* MicroRNAs as candidate biomarkers for Alzheimer's disease. **Non-Coding RNA**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2021. Available at: https://doi.org/10.3390/NCRNA7010008

KARAGKOUNI, D. *et al.* DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. Database issue, p. D239, 2018. Available at: https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1141

KAUFMANN, W. E. *et al.* Molecular phenotype of fragile X syndrome: FMRP, FXRPs, and protein targets. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 3, p. 135–144, 2002. Available at: https://doi.org/10.1002/jemt.10066

KROL, J. *et al.* Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 618–631, 2010. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.039

LEE, Y. S. *et al.* Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the ddown-regulation of putative targets during differentiation *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16635–16641, 2005. Available at: https://doi.org/10.1074/JBC.M412247200

LIN, S.-L. MicroRNAs and Fragile X Syndrome. *In*: Advances in experimental medicine and biology. [*S. l.: s. n.*], 2015. v. 888, p. 107–121. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_7

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Available at: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

MACIOTTA, S.; MEREGALLI, M.; TORRENTE, Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 265, 2013. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00265

MALECKI, C. *et al.* The RNA-binding fragile-X mental retardation protein and its role beyond the brain. **Biophysical Reviews**, v. 12, n. 4, p. 903–916, 2020. Available at: https://doi.org/10.1007/s12551-020-00730-4

MANDEL, J. L.; BIANCALANA, V. Fragile X mental retardation syndrome: From pathogenesis to diagnostic issues. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 14, n. SUPPL. A, 2004. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ghir.2004.03.034

MARABITA, F. *et al.* Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 2, p. 204, 2016. Available at: https://doi.org/10.1093/BIB/BBV056

MARTINEZ; PEPLOW, P. V. Altered microRNA expression in animal models of Huntington's disease and potential therapeutic strategies. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 11, p. 2159, 2021. Available at: https://doi.org/10.4103/1673-5374.310673

MELLIOS, N. *et al.* MiR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1240–1242, 2011. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.2909

MELO, C. A.; MELO, S. A. Biogenesis and physiology of microRNAs. **Non-Coding RNAs and Cancer**, p. 5–24, 2014. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8444-8_2

MIRBASE. **MiRBase**. [*S. l.*], 2021. Available at: http://www.mirbase.org/. Acesso em: 14 jul. 2021.

MIYASHIRO, K. Y. *et al.* RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 417–431, 2003. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12575950. Acesso em: 27 set. 2017.

MOR-SHAKED, H.; EIGES, R. Reevaluation of FMR1 hypermethylation timing in fragile X syndrome. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2018. Available at: https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00031

MUDDASHETTY, R. S. *et al.* Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. **Molecular Cell**, v. 42, n. 5, p. 673–688, 2011. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.006

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. [*S. l.*], 2021. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 14 jul. 2021.

NIE, P.-Y. *et al.* miR-132 regulates PTSD-like behaviors in rats following single-prolonged stress through Fragile X-Related Protein 1. **Cellular and Molecular Neurobiology 2020 41:2**, v. 41, n. 2, p. 327–340, 2020. Available at: https://doi.org/10.1007/S10571-020-00854-X

NIMCHINSKY, E. A.; OBERLANDER, A. M.; SVOBODA, K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 Knock-Out mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5139, 2001. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-14-05139.2001

NUSSBAUM, R. L. *et al.* **Thompson & Thompson - Genética Médica** . 7. ed. Rio de Janeiro: [*s. n.*], 2008. *E-book*.

PENZES, P. *et al.* Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 285–293, 2011. Available at:

https://doi.org/10.1038/nn.2741

PEREIRA, T. C. **Introdução ao Mundo dos MicroRNAs**. 1. ed. São Paulo: [*s. n.*], 2015. *E-book*.

PRESUTTI, C. *et al.* Non coding RNA and brain. **BMC Neuroscience 2006 7:1**, v. 7, n. 1, p. S5, 2006. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-s1-s5

PUTKONEN, N. *et al.* Urine microRNA profiling displays miR-125a dysregulation in children with Fragile X Syndrome. **Cells**, v. 9, n. 2, 2020. Available at: https://doi.org/10.3390/cells9020289

R CORE TEAM. **R Core Team (2020). — A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. [*S. l.: s. n.*], 2020. Available at: http://www.r-project.org/index.html. Acesso em: 19 set. 2021.

REN, H. *et al.* Potential contribution of microRNA-125b targeting p38MAPK to relieving intermittent hypoxia-induced dementia of rat models. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 64, p. 234–241, 2019. Available at: https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2019.03.002

RNACENTRAL. [*S. l.*], 2021. Available at: https://rnacentral.org/. Acesso em: 2 ago. 2021.

ROY, B. *et al.* Exploiting circulating microRNAs as biomarkers in psychiatric disorders. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 24, n. 3, p. 279–298, 2020. Available at: https://doi.org/10.1007/S40291-020-00464-9

SALCEDO-ARELLANO, M. J.; HAGERMAN, R. J.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. Fragile x syndrome: Clinical presentation, pathology and treatment. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 156, n. 1, p. 58–64, 2020. Available at: https://doi.org/10.24875/GMM.M19000322

SALDARRIAGA, W. *et al.* Fragile X syndrome. **Colombia medica (Cali, Colombia)**, v. 45, n. 4, p. 190–198, 2014. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25767309. Acesso em: 27 set. 2017.

SANTORO, M. R.; BRAY, S. M.; WARREN, S. T. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: A twenty-year perspective. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 219–245, 2012. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132457

SASSEN, S.; MISKA, E. A.; CALDAS, C. MicroRNA: implications for cancer. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 452, n. 1, p. 1–10, 2008. Available at: https://doi.org/10.1007/s00428-007-0532-2

SHAO, P. MiR-216a-5p ameliorates learning-memory deficits and neuroinflammatory response of Alzheimer's disease mice via regulation of HMGB1/NF-κB signaling. **Brain Research**, v. 1766, p. 147511, 2021. Available at: https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147511

SHENG, W. *et al.* Identifying the biomarkers of multiple sclerosis based on non-coding RNA signature. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 19, p. 3635–3642, 2015. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26502853/. Acesso em: 20 ago. 2021.

SIM, S. E.; BAKES, J.; KAANG, B. K. Neuronal activity-dependent regulation of MicroRNAs. **Molecules and cells**, v. 37, n. 7, p. 511–517, 2014. Available at: https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0132

SMITH, P. Y. *et al.* miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 23, p. 6721, 2015. Available at: https://doi.org/10.1093/HMG/DDV377

TABOLACCI, E.; NERI, G. What mechanisms induce methylation of FMR1 gene full

mutation? A still unanswered question. *In*: EPIGENETICS AND HUMAN HEALTH. [*S. l.*]: Springer Verlag, 2016. p. 145–173. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27186-6_8

TAN, L. *et al.* Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 336, n. 1, p. 52–56, 2014. Available at: https://doi.org/10.1016/J.JNS.2013.10.002

TASSANAKIJPANICH, N.; HAGERMAN, R. J.; WORACHOTEKAMJORN, J. Fragile X premutation and associated health conditions: A review. **Clinical Genetics**, v. 99, n. 6, p. 751–760, 2021. Available at: https://doi.org/10.1111/cge.13924

TEO, C. R. L. *et al.* Screening for CGG repeat expansion in the FMR1 gene by melting curve analysis of combined 5' and 3' direct triplet-primed PCRs. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 568–579, 2012. Available at: https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.174615

TOGNINI, P. *et al.* Experience-dependent expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1237–1239, 2011. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.2920

TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul**, p. 227–237, 2012. Available at: http://www.seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/download/29874/19186. Acesso em: 2 ago. 2021.

VISWAMBHARAN, V. *et al.* MiRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 2, 2017. Available at: https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0242

VIVEIROS, M. *et al.* Screening for fragile X syndrome in males from specialized institutions in the northeast region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.

14, n. 2, p. 6897–6905, 2015. Available at: https://doi.org/10.4238/2015.June.18.32

VLACHOS, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Web Server issue, p. W460, 2015. Available at: https://doi.org/10.1093/NAR/GKV403

WANG, R. Y. *et al.* In vivo knockdown of hippocampal miR-132 expression impairs memory acquisition of trace fear conditioning. **Hippocampus**, v. 23, n. 7, p. 625–633, 2013. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22123

WANG, T.; BRAY, S. M.; WARREN, S. T. New perspectives on the biology of fragile X syndrome. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 22, n. 3, p. 256–263, 2012. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.002

WANG, W.; KWON, E. J.; TSAI, L. H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. **Learning and Memory**, v. 19, n. 9, p. 359–368, 2012. Available at: https://doi.org/10.1101/lm.026492.112

WANG, Z.; LU, Y.; HAN, J. Peripheral blood MicroRNAs: A novel tool for diagnosing disease? **Intractable and Rare Diseases Research**, v. 1, n. 3, p. 98–102, 2012. Available at: https://doi.org/10.5582/irdr.2012.v1.3.98

WEILER, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter- activated protein translation at synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 50, p. 17504–17509, 2004. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0407533101

WINTER, J. *et al.* Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, ano 11, n. 3, 2009. p. 228–234. Available at: https://doi.org/10.1038/ncb0309-228

WU, Y.-Y.; KUO, H.-C. Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27,

n. 1, 2020. Available at: https://doi.org/10.1186/S12929-020-00636-Z

XIAO, X. *et al.* Long noncoding RNA SNHG1 knockdown ameliorates apoptosis, oxidative stress and inflammation in models of Parkinson's disease by inhibiting the miR-125b-5p/MAPK1 axis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 17, p. 1153, 2021. Available at: https://doi.org/10.2147/NDT.S286778

YANG, Z. *et al.* Altered expression levels of microRNA-132 and Nurr1 in peripheral blood of Parkinson's disease: Potential disease biomarkers. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 2243–2249, 2019. Available at: https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.8B00460

ZHUANG, J. *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 and its target microRNA-125b are potential biomarkers for Alzheimer's disease management via interactions with FOXQ1, PTGS2 and CDK5. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 9, p. 5940, 2020. Available at: /pmc/articles/PMC7540111/. Acesso em: 20 ago. 2021.

7 RESULTADOS

7.1 ARTIGO

Este Artigo será submetido para a revista Neurology Genetics

Title

Serum-based miR-125b and miR-132 as Biomarker for Fragile X Syndrome

Abstract

Background and Objectives: Fragile X syndrome (FXS) is a neurodevelopmental disorder, identified as the most common cause of hereditary intellectual disability (ID) and monogenic cause of autism spectrum disorders (ASD), caused by loss of fragile X mental retardation protein (FMRP). FMRP is an RNA binding protein, a regulator of translation that plays important role in neurodevelopment, and its loss causes cognitive and behavioral deficits. microRNAs (miRNAs) are small molecules that regulate gene expression in diverse biological processes. Previous studies found the interaction of FMRP with miR-125b and miR-132 to regulate the maturation and synaptic plasticity in animal models, as well as miRNAs dysregulation implicates in the pathophysiology in FXS. The present study aimed to analyze the expression of miR-125b-5p and miR-132-3p in the serum of FXS patients.

Methods: The expressions of circulating miRNAs were studied in serum of 10 subjects with FXS and 20 controls using real-time quantitative retrotranscribed (RT-qPCR) method analyzed by relative quantification. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were generated to assess the diagnostic values of the miRNAs.

Results: We found both miR-125b and miR-132 were increased in serum of FXS subjects compared with controls and likely involved with FMRP loss. The AUC (95% CI) of miR-125b and miR-132 was 0.94 (0.86-1.0) and 0.89 (0.77-1.0), respectively. Databases allowed the identification of possible target genes for miR-125b and miR-132, whose products play an important role in the homeostasis of the nervous system.

Discussion: Our results indicate that serum miR-125b and miR-132 may serve as potential biomarkers for FXS. The increased expression of circulating miR-125b and miR-132 seems to be associated with the genotype of FXS. Predicted gene targets of the differentially regulated miRNAs are involved in cognitive performance and ASD phenotype.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are short (~22 nucleotides) non-coding RNAs involved in post-transcriptional gene regulation by promoting messenger RNA (mRNA) silencing and influencing protein translation[1,2]. Several studies have provided evidence that miRNAs are involved in the pathogenesis of different disorders, and disease-specific miRNA profiles have been identified isolated from bodily fluids (circulating miRNAs), including those selectively expressed in the brain[3,4]. miRNAs play a role during neurodevelopment to regulate essential biological processes, in the functioning of the central nervous system (CNS). The deregulation expression of miRNAs has been found to play a major role in the pathogenesis of neurodisorders[5,6]. The accessibility and stability of circulating miRNAs support their use as diagnostic and prognostic biomarkers for patient stratification and to improve the efficacy of targeted treatments for neurodisorders such as Fragile X syndrome (FXS)[3,7].

FXS is the most common cause of inherited intellectual disability (ID) and the most prevalent monogenic cause of autism spectrum disorders (ASD)[8,9]. FXS has an estimated incidence of 1 in 4,000 men and 1 in 8,000 women without known incidence in Brazil[10]. This neurodevelopmental disorder is characterized by a broad spectrum of behaviors, such as developmental delay (DD), anxiety, aggression, self-injury, attention deficit disorder, social withdrawal, and physical comorbidities as facial dysmorphisms, macroorchidism, otitis, and seizures, resulting in a large phenotypic heterogeneity across FXS population[11]. The syndrome is caused by loss of fragile X mental retardation protein (FMRP), a consequence of the full mutation (FM), more than 200 CGG repeats in the 5' untranslated region of the fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene (OMIM# 309550) that leads to hypermethylation of the promoter region and consequently the absence of the FMRP[12]. FXS mosaicism has been described as the coexistence of the FM and the premutation (CGG repeats between 55–200), and the clinical manifestations of FXS mosaicism may vary according to the presence of different methylation levels of the FM allele leading to differential FMRP expression within tissues[13].

FMRP is an RNA binding protein highly expressed in the CNS with essential functions for normal development and maintenance of neuronal synaptic function and plasticity, through the role as a regulator of translation of neuronal mRNAs in response to the synaptic activity[8,14]. Reduced expression of FMRP leads to abnormalities in neurodevelopmental spines and disturbed neuronal processes, observed in FXS[15,16]. The RNA binding capacity of FMRP is central to its molecular function, it has two K homology domains (KH) and one arginine–

glycine–glycine box (RGG box), also both nuclear localization and exportation signals for transport target RNA between the nucleus and cytoplasm[17,18]. FMRP is associated with polyribosomes to form ribonucleoprotein (RNP) complexes that regulate translation of certain proteins involved in neuronal development and plasticity, and FMRP functions as a translation repressor at synapsis due to its binding to miRNAs and interactions with proteins, including Argonaute (Ago2), incorporated into a multiprotein complex called an RNA-induced silencing complex (RISC), resulting in the regulation of synaptic structure and plasticity[18,19].

Studies have provided evidence of miRNA involvement in the pathogenesis of FXS by identifying and isolating several r(CGG)-derived miRNAs, as miR-125b and miR-132, required for maintaining neuronal connectivity and synaptic plasticity, in the zebrafish FXS model[20,21]. Further, microarray analyses of miRNAs associated with FMRP in the mouse brain identified miR-125b and miR-132, and the dysregulation of both miRNA-mediated protein translation resulting in early neural development and synaptic physiology[14,22]. A recent study showed that FMRP binds with some miRNAs, specifically miR-125-family, in regions outside of the seed sequence to modulate the RISC complex through specific interaction with Ago2 protein[23]. In addition, a recent miRNA profiling performed in the urine of FXS boys has identified an increase of miR-125a and its potential as an FXS biomarker[24]. In this study, these miRNAs were chosen and analyzed in the serum samples of FXS patients compared to healthy controls with the aim of investigating whether FXS pathogenesis is associated with miR-125b-5p and miR-132-3p and if those could be used as diagnostic and prognostic biomarkers of FXS patients.

Material and Methods

Clinical samples

Samples were collected from patients with FXS from the Medical Genetics Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), between March 2018 and September 2019. In total, 10 FXS and 20 controls from blood donors at HCPA were collected, which included 30 males with ages ranging from 9 to 26 years old. This study was approved by the Ethics Committee of the HCPA (project number 20180264) and informed written consent was previously obtained from all subjects or guardians at the clinical setting.

Collection of serum and miRNA extraction

Blood samples were collected in the serum separator tube and used to derive serum samples. Within 30 minutes after blood collection, samples were centrifuged at 1,900xg for 10 minutes at 4ºC. After centrifugation, serum was separated and stored at -80ºC immediately until RNA isolation. microRNA was extracted from 200 µl of serum in each sample using the miRNeasy™ Serum/Plasma Kit (Qiagen Cat. No. 217184), according to the manufacturer's instructions. Extracted and purified miRNA was eluted into 12 µL of RNase-free water per sample. The purity of RNA was detected by measuring its absorbance at 260-280nm using the NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific). The miRNA was stored at −80°C until use.

Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) and microRNA expression analysis

The reverse transcription into cDNA was performed using StepOne™ (Thermo Fisher Scientific) and the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Cat. No. A28007) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed using the Applied Biosystems QuantStudio™ 3 PCR system (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and all miR-specific primers and universal adaptor PCR miRNAs primers were purchased from commercial TaqMan microRNA assays (Life Technologies; miR-24-3p (ID 477992_mir), miR-132-3p (477900_mir), miR-125-5p (477885_mir)). The TaqMan Fast Advanced Master Mix (Cat. No. 4444605) was used for the qPCR, all reactions were performed in duplicates, incubated in a 96-well plate at 95°C for 20 seconds, followed by 40 cycles at 95°C for 1 sec and 60°C for 20 sec, fluorescent signals were measured during the extension phase.

The relative expression levels were calculated using the comparative Ct method (ΔΔCt) with mean values of controls set as a calibrator. The Ct values of miRNAs were standardized and calculated utilizing the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method for the fold change between FXS patients and controls. For normalization, miR-24-3p was used as an endogenous control for further statistical analysis.

Statistical analysis

All analyses were performed by the R software version 4.0.5 (R Core Team 2020)[25]. As data were not normally distributed, nonparametric statistical tests were used. miRNA expression levels between the patients and controls were analyzed using a two-sided Mann–

Whitney test. Differences in the miRNA expressions between the groups were studied using the same test to study the association between miRNA expressions and clinical parameters (genotypes, age, ID, ASD, comorbidities and behavioral alterations). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was constructed and the area under the ROC curve (AUC) was generated to assess its diagnostic values for evaluating the diagnostic accuracy of circulating miRNAs. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Pathway analysis and target genes of investigated miRNAs

The mirPath database, which utilizes experimentally validated miRNA interactions derived from Diana Tools mirPath v.3 was used in order to investigate in which pathways the miRNAs of this study are already determined to be involved[26]. Using Human MicroRNA Disease Database (HMDD V3.0) we have searched for interaction targets involved in human diseases[27]. We also used the R platform, MultimiR package, (Rcore team)[25] and we searched for interaction targets of miR-125b-5p and miR-132-3p involving neurodevelopmental diseases. Targets with experimental validation were chosen through miRwalk[28] and Diana Tools Tarbase v.8[29].

Results

Circulating miRNA expression in serum of FXS patients and HC

We analyzed the expression of circulating miR-125b-5p and miR-132-3p in serum obtained from 10 FXS patients and 20 healthy controls (HC). miR-125b-5p and miR-132-3p were identified by qRT-PCR. Analysis of the miRNA expressions between the groups revealed overexpression in FXS patients of miR-125b-5p and miR-132-3p (fold change, FC > 1.5; $P < 0.05$) (Table 1) in comparison to controls. miR-125b-5p ($P = 1.79 \times 10\text{-}5$) (Fig. 1a) and miR-132-3p ($P = 2.58 \times 10\text{-}4$) (Fig. 1b) were increased in FXS serum.

Table 1. Mean and interval ranges of circulating miRNA expression levels in FXS and healthy controls.

miRNAs	FXS (n=10)	HC (n=20)	P value	Fold Change
miR-125b-5p	2.86 (1.46-6.66)	1.12 (0.34-2.392)	**<0.001**	2.55
miR-132-3p	2.17 (1.18-3.49)	1.09 (0.37-2.03)	**<0.001**	2.0

miRNAs, microRNAs; FXS, Fragile X syndrome; HC, Healthy controls;

P values: Comparison between FXS and controls using the Mann Whitney test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Fold Changes: Were calculated by comparing miRNA expression values between FXS and controls.

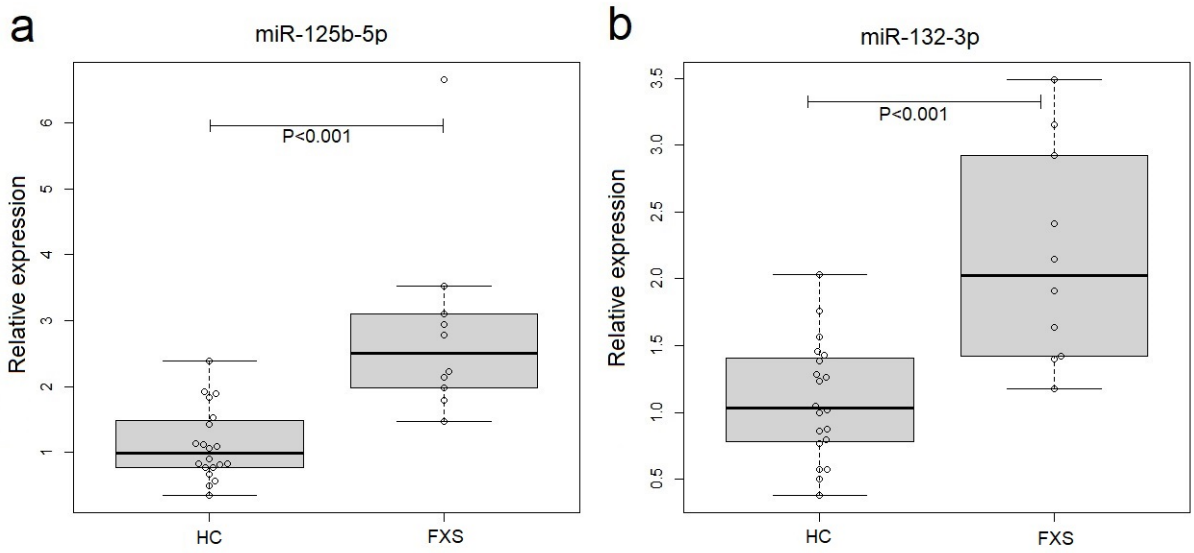


Figure 1. Circulating miRNAs expression levels

Box and whiskers plot of the distribution of (a) miR-125b-5p and (b) miR-132-3p, in serum obtained from Fragile X syndrome (FXS) patients and healthy controls (HC). Box indicates median with interquartile range and whiskers indicate the 10-90 percentile range. Dots represent independent values. P -values < 0.05 were considered significant and are shown.

ROC curves were constructed and the AUC was generated to assess the diagnostic values of both selected miRNAs. As shown in Figure 2, ROC analysis revealed that the AUC of miR-125b and miR-132 was 0.94 (0.86 - 1), and 0.89 (0.77 - 1.0), respectively. The detailed information about the ability of both miRNAs to diagnose the FXS in patients is revealed in Table 2. High values for sensitivity and specificity were observed, for miR-125b-5p 90% and

80%, for miR-132-3p 90% and 75%, respectively, suggesting them as potential predictors of FXS.

Table 2. Receiver operating characteristic (ROC) analysis of miRNAs in FXS patients

miRNAs	AUC	95% CI	P value	Sensitivity	Specificity
miR-125b-5p	0.94	0.86-1	<0.05	90%	80%
miR-132-3p	0.89	0.77-1	<0.05	90%	75%

AUC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval; P-value, compared with AUC of 0.5.

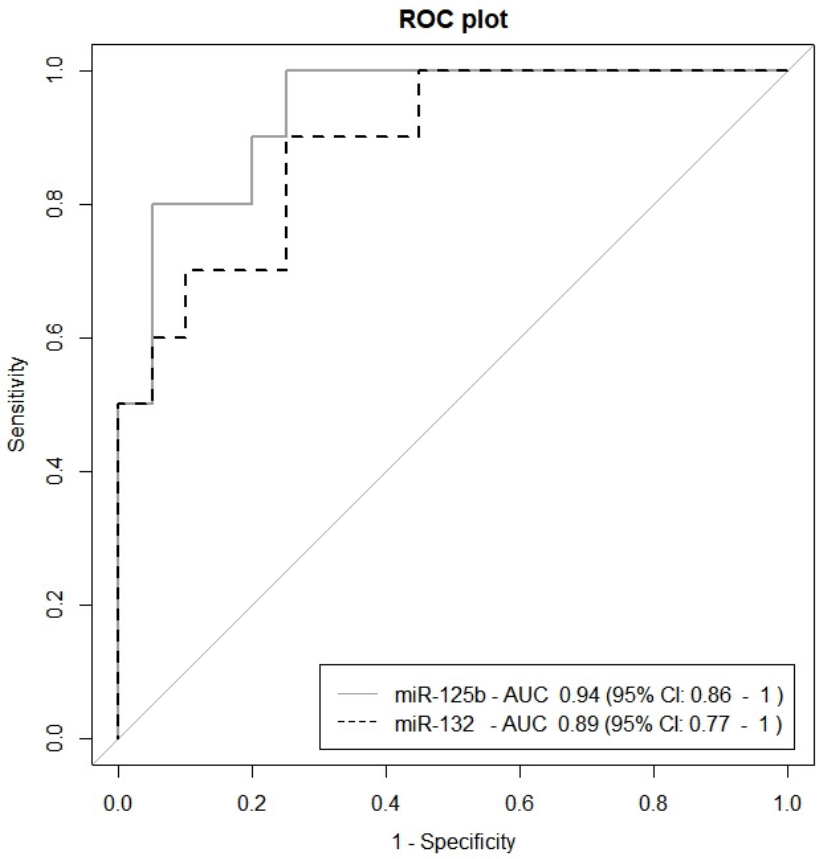


Figure 2. miR-125b and miR-132 receiver operating characteristic (ROC) curve

Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses of hsa-miR-125b-5p and hsa-miR-132-3p, straight line depicts hsa-miR-125b-5p (AUC 0.94, 95% CI 0.86–1), and dotted line depicts hsa-miR-132-3p (AUC 0.89, 95% CI 0.77–1). AUC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval;

Association of miRNAs with clinical parameters

Patient characteristics are summarized in Table 3 according to their genotype. Differences between clinical characteristics were not detected in FM and mosaic patients. Significant differences were not found between ages.

Table 3. Clinical characteristics of patients with different genotypes and healthy controls.

	Full Mutation (n=5)	Mosaic premutation/ full mutation (n=5)	Healthy controls (n=20)
Age (years), Mean ± SD (min- max)	15 ± 3.9	17 ± 3.3	21± 3.9
ID, n (%)	5 (100)	3 (60)	-
ASD, n (%)	1 (20)	-	-
DD, n (%)	2 (40)	4 (80)	-
Aggressivity, n (%)	-	2 (40)	-
Hyperactivity, n (%)	4 (80)	2 (40)	-
Hypothyroidism, n (%)	-	1 (20)	-
Obesity, n (%)	1 (20)	1 (20)	-

ID, intellectual disability; ASD, autism spectrum disorders; DD, developmental delay;

In the whole FM group, the expression of miR-125b-5p and miR-132-3p was strongly increased (Fig. 3a and Fig. 3b). The FM group showed significant overexpression of miR-125b-5p (P = 1.5 x 10-4) and of miR-132-3p (P = 7.15 x 10-4) in comparison with controls, as well as mosaic patients showed significant overexpression of miR-125b-5p (P = 4.25 x 10-3) and of miR-132-3p (P = 2.36 x 10-2) in comparison with controls. The expression of miR-125b-5p and miR-132-3p in FM genotype was upregulated in comparison with mosaic patients, but statistical significance was not observed (miR-125b-5p, P = 0.0952; miR-132-3p, P = 0.1508).

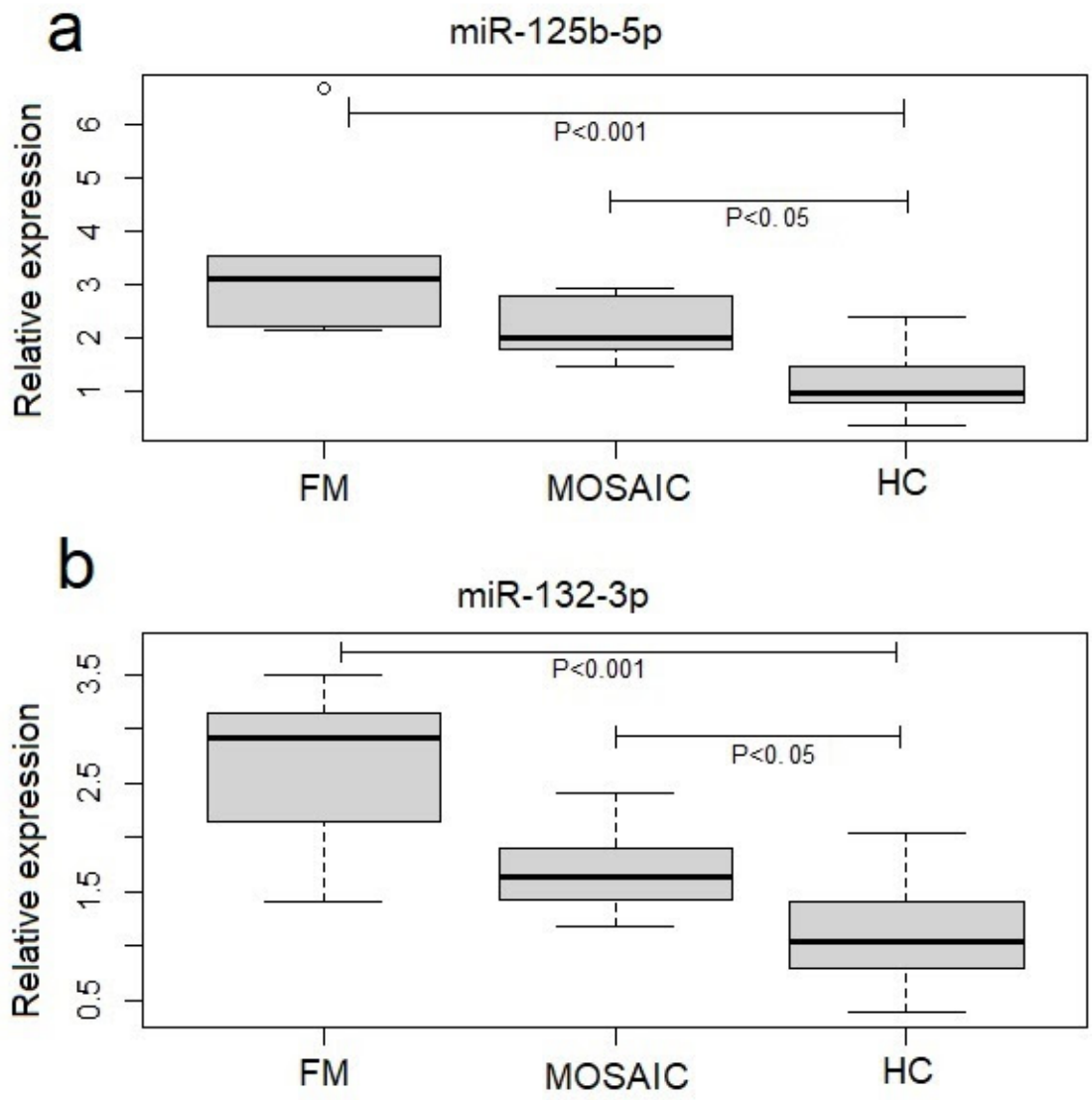


Figure 3. Circulating miRNAs expression levels by genotypes.

Box and whiskers plot of the distribution of (a) miR-125b-5p and (b) miR-132-3p, in serum from fragile X syndrome patients with full mutation (FM), mosaic genotype and healthy controls (HC). Box indicates median with interquartile range and whiskers indicate the 10-90 percentile range. P values lower than 0.05 were considered significant and are shown.

Pathway and target genes Analysis of Investigated miRNAs

Using the miRsystem tool more than 600 pathways were found. The miRNAs were involved separately, such as MAPK signaling pathway, pathways in cancer, neurotrophic signaling, and immune adaptive system[30]. The pathway ranking summary revealed that both miRNAs were involved in thirteen pathways: signaling by TGF-beta signaling pathway, regulation of actin cytoskeleton, bacterial invasion of epithelial cells, hippo signaling pathway, proteoglycans in cancer, other types of O-glycan biosynthesis, adherens junction, cell cycle,

arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), biosynthesis of unsaturated fatty acids, fatty acid biosynthesis, fatty acid metabolism. Figure 4 represents a heatmap of union pathways of both miRNAs derived from experimentally validated data using miRPath v.3, Diana Tools Database[26].

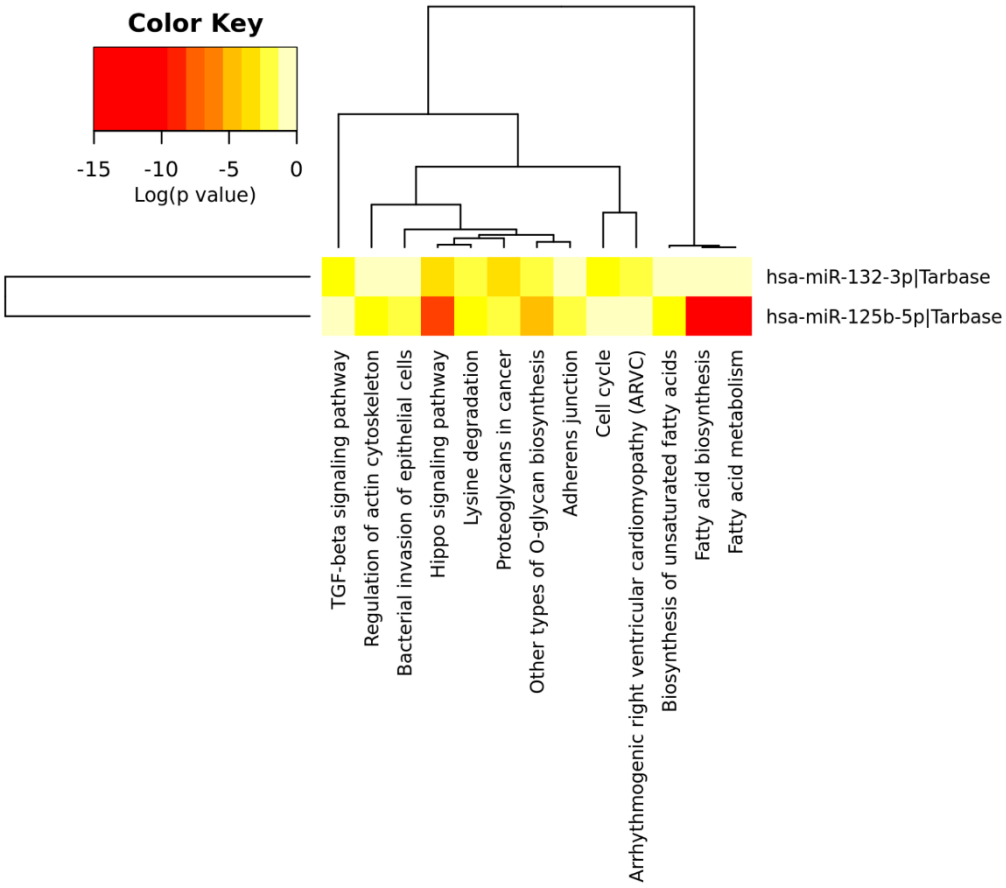


Figure 4. Heatmap of experimentally validated union pathways of miR-125b-5p and miR-132-3p using miRPath Database.

Union pathways with enrichment analysis performed and significance levels (p-values) calculated between each miRNA and every pathway. For each pathway a merged p-value is extracted using Fisher's meta-analysis method, which signifies if a particular pathway is targeted by at least one miRNA[26]. Different colors of cells mean different levels of significance (log (p-value) in Color Key).

There are 925 predicted targets for hsa-miR-125b-5p and 673 predicted targets for hsa-miR-132-3p in miRDB[31]. Using HMDD we found that for both miRNAs investigated there are at least four confirmed target genes in humans. Using the multimiR platform it was possible to generate a list of target genes for miR-125b-5p and miR-132-3p that are related to neurodevelopmental diseases. We identified four possible target genes by miR-125b-5p

including insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), tumor protein p53 (*TP53*), glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A (*GRIN2A*), and single-minded 1(*SIM1*), and five genes targeted by miR-132-3p including SRY-box 5 (*SOX5*), SRY-box 6 (*SOX6*), mitogen-activated protein kinase 1 (*MAPK1*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), and phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) (Table 3).

Table 3. List of validated target genes of miR-125b-5p and miR-132-3p according to Human MicroRNA Disease Database and multimiR package (R platform), validated by miRwalk and DIANA tools Tarbase v8.

miRNA	Target genes
miR-125b-5p	*IGF1R* *TP53* *GRIN2A* *SIM1*
miR-132-3p	*SOX5* *SOX6* *MAPK1* *BDNF* *PTEN*

Discussion

The search for non-invasive biomarkers for neuronal prognosis is currently one of the most rapidly growing areas in neurodevelopmental research. In the serum of patients with FXS, circulating miRNAs could be used as prognostic neuropathological biomarkers[32]. Recently, blood serum was found to contain circulating miRNAs which are stable, reproducible, and have already been proposed as novel noninvasive biomarkers for the diagnosis and prognosis of many neurodisorders[3,4,7]. In this study, FXS specific changes in serum miRNAs was identified. The levels of miR-125b and miR-132 were found increased in FXS serum, when compared to serum samples of healthy controls (Figure 1), suggesting an important role of these miRNAs in the pathophysiology of FXS.

Previous studies have demonstrated that miR-125b and miR-132 are associated with FMRP in the mouse brain, and this association is necessary to affect dendritic spine morphology. Also, miR-125b and miR-132 regulation is affected in the absence of the FMRP, which is in agreement with our results[22]. Through the phosphorylation state of FMRP, influenced by mGluR, when phosphorylated, FMRP is associated with miR-125b and miR-132

to form the RISC complex which, when induced by those miRNAs, regulates PSD-95 translation, that is critical for synaptic function[23,33]. In the brain of the *FMR1* KO mouse, were the levels of miR-125 and miR-132 were reduced explaining the inability of miR-125 and miR-132 guided RISC complex to regulate PSD-95 mRNA, resulting in dendritic abnormalities[14,22]. PSD-95 is a postsynaptic scaffolding protein that modulates the synaptic formation, maintenance, and localization by forming related signals with NMDA receptor, which plays an important role in synaptic transmission[34]. The mGluR5 receptor binds to the NMDA receptor through PSD-95, which directly affects synaptic plasticity[35]. It was demonstrated that miRNA-125b targets the NR2A subunit of the NDMAR that influences synaptic plasticity and memory consolidation[22], and the association between miR-125-family and mGluR5 signaling to the inhibitory complex on PSD-95 mRNA[14]. miR-132 is also linked to NMDA receptors, pharmacological studies showed that miR-132 induction requires the NMDA receptor activation[36], and recently miR-132 was shown to participate in regulating the expression of PSD-95 through target genes[37]. Possibly miR-125b and miR-132 interact with FMRP by sequential other signaling pathways, as mGluR and NMDA receptors signaling to mediate the PSD-95 translation. Thus, any destabilization of these molecules may lead to abnormal synaptic plasticity, but the molecular mechanisms by which this regulation is accomplished are still not clear.

A detailed analysis of miR-125b and miR-132 levels in FXS serum revealed a genotype-associated regulation, whereas FM patient samples showed higher serum expression levels of miR-125b and miR-132, which underline the absence of FMRP protein may further directly influence the gene expression of these miRNAs, since mosaic patients express low levels of FMRP[13]. Previously, miR-125b and miR-132 were reported to be severely decreased in the mouse brain, FMRP *knockdown*[22]. Recently, miR-125a was increased in the urine of 9 patients with FXS, compared with healthy controls[24]. The FM genotype patients with higher levels of miR-125b and miR-132 in serum may present a subgroup whose cellular homeostasis differs from the mosaic genotype subgroup, with lower levels of miR-125b and miR-132. The higher serum miR-125b and miR-132 levels in FM patients could be a consequence of the lack of FMRP interaction and may reflect increased production and/or brain secretion of these miRNAs in corporal fluids, while the expression of FMRP could decrease the serum high levels of miR-125b and miR-132, however, it is not possible to make any specific directly correlation between the expression of circulating miRNAs in human fluids and previous findings in mouse brain miRNAs levels[24]. Thus, it becomes necessary to invest in further studies that seek to better understand the deregulation of the levels of these miRNAs

observed in FXS. Moreover, these miRNAs are found related to different neuropathologies which demonstrates their involvement with several pathways' regulation.

Previously, serum miR-125b was found to be increased in patients with Multiple Sclerosis[38] and Alzheimer[39], associated with severe cognitive decline, and described as a potential biomarker for these neuropathologies. miR-125b transfection into neuronal cells caused hyperphosphorylation of tau, induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and inhibited cell proliferation, exemplifying how the dysregulation of this miRNA can affect the biochemistry of the brain, contributing to the onset of neuropathologies[40]. Interestingly, a study described the inhibitory effect of miR-125b results in the upregulation of multiple miR-125b target genes, including *IGF1R*[41]. *IGF1R* is a transmembrane tyrosine kinase receptor essential for neuronal development and has been found to regulate changes in neuronal polarity[42], and has neuroprotective effects after brain injury[43]. miR-132 is the most studied miRNA linked to brain function, predominantly observed dysregulated in neuropathologies, and regulated in response to neuronal activity[44]. Many studies have shown miR-132 increased in the blood components of neuropathologies, as Alzheimer's[45], Parkinson's[46], Spinocerebellar Ataxia[47], Age-related Macular Degeneration[48], Multiple Sclerosis[49], and Amyotrophic Lateral Sclerosis[50], which is in accordance with the higher levels found in our study and it highlights its overexpression related to neuropathological processes and its potential as a biomarker of neuropathologies.

The experimentally Heatmap showed miR-125b-5p and miR-132-3p connected to cancers and cycle cellular pathways (Figure 4). Both miRNAs are involved with oncogenic aspects demonstrating the potential of biomarkers for the screening of different types of cancer. miR-132-3p for hepatocellular carcinoma and malignant mesothelioma[51,52]. While miR-125b-5p could be a novel biomarker for screening of lung cancer[53] and breast cancer[54]. The validated target *TP53* gene for miR-125b, plays a key role in cell death, DNA repair and cell proliferation, and the overexpression of miR-125b represses the endogenous level of the P53 protein[55]. A *TP53* review highlighted a key role for the gene in the regulation of neurons, which highlights the complexity of this target in neuropathologies[56]. miR-125b-5p and miR-132-3p are related to signaling pathways of fatty acid biosynthesis and fatty acid metabolism, circulating levels of both miRNAs are related to body weight[57,58]. Obesity has already been demonstrated to affect gene expression and was associated with cognitive decline and dementia[59]. Another related pathway between the miR-125b-5p and miR-132-3p is the TGF-beta signaling, which play essential roles in every stage of neural development, showing the importance of both miRNAs in the pathways of TGF-beta members in the CNS at various

developmental stages[60]. In fact, miRNAs can regulate hundreds of different targets involved in different pathways and these are just some routes involving both miRNAs.

The experimentally validated gene targets showed the miRNAs have been connected to genes involved in cognitive performance and ASD (Table 3). miR-125b is involved with *GRIN2A* downregulation, this gene encodes an important subunit of NR2A, a subunit of NMDA receptor[22]. Variants of *GRIN2A* have been described as associated with several neurodevelopmental disorders, including epilepsy and ASD[61]. Another target gene for miR-125b is *SIM1*, involved with behavioral disorders, ASD, and obesity in humans[62,63]. miR-132 was found to reduce *SOX5* mRNA and protein expression[64]. Subsequent to this finding, *SOX5* had been identified as a novel candidate gene for ASD[65]. Further, miR-132-3p was found to target *SOX6* and down-regulated its protein expression[66]. *SOX6* variants have been reported to cause a neurodevelopmental syndrome associated with attention-deficit and hyperactivity disorder[67]. Another gene target and downregulated by miR-132 is *MAPK1*[68]. MAPK signaling regulates intracellular functions and perturbations to MAPK signaling are related to contribute to the pathogenesis of ASD[69]. Therefore, miR-132 was found to improve the cognitive function of rats by directly inhibiting *MAPK1* expression[68]. Whereas *BDNF* is indirectly targeted by miR-132 through Methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2), a known regulator of neuronal maturation and synapse formation, which triggers the induction of *BDNF*[37]. A *BDNF* meta-analysis study has written detailed the effects of gene expression in ASD. Higher peripheral *BDNF* in ASD is concordant with several neurological and psychological causes and symptoms of this condition, and the lower levels of *BDNF* were found in schizophrenia, bipolar disorder, and depression[70]. Recently miR-132 overexpression demonstrated their downregulated expression of *PTEN*[71]. PTEN protein is involved in the regulation of the cell cycle and is important in synaptic plasticity, neuronal function, and development[71]. *PTEN* variants have been associated with ASD phenotypes[71], and PTEN-KO mice models showed macrocephaly, loss of neuronal polarity, and behavioral anomalies associated with ASD such as anxiety, convulsions, and decreased social interest[73].

The AUC results of miR-125b and miR-132-3p in discrimination FXS patients from healthy controls were 0.94 and 0.89, respectively, which demonstrate the ideal diagnostic value to distinguish FXS patients from healthy individuals. The increased levels may indicate the severity of FXS patients, which helps in contributing to clinical diagnosis and further patients' prognosis, since FXS still have no prognostic tools and it is a need, since the neurodevelopmental disorder is accompanied by uncertain wide-ranging comorbidities[74]. Although the present study still has some limitations, as the samples recruited in our study are

relatively small, our findings elucidate the clinical potential biomarkers of serum miR-125b and miR-132 for FXS patients and the genetic miRNA associations have shown targets of miR-125b and miR-132 can determine the onset of neurodisorders and ASD phenotypes.

References

1 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
2 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
3 Denk J, Oberhauser F, Kornhuber J, et al. Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197329. Published 2018 May 10. doi:10.1371/journal.pone.0197329
4 Viswambharan V, Thanseem I, Vasu MM, Poovathinal SA, Anitha A. miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. *Biomark Med*. 2017;11(2):151-167. doi:10.2217/bmm-2016-0242
5 Presutti C, Rosati J, Vincenti S, Nasi S. Non coding RNA and brain. *BMC Neurosci*. 2006;7 Suppl 1(Suppl 1):S5. Published 2006 Oct 30. doi:10.1186/1471-2202-7-S1-S5
6 Im HI, Kenny PJ. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*. 2012;35(5):325-334. doi:10.1016/j.tins.2012.01.004
7 Wang Z, Lu Y, Han J. Peripheral blood microRNAs: A novel tool for diagnosing disease?. *Intractable Rare Dis Res*. 2012;1(3):98-102. doi:10.5582/irdr.2012.v1.3.98
8 Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*. 2008;60(2):201-214. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.004
9 Wang T, Bray SM, Warren ST. New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(3):256-263. doi:10.1016/j.gde.2012.02.002
10 Viveiros MT, Santos MD, Dos Santos JM, et al. Screening for fragile X syndrome in males from specialized institutions in the northeast region of Brazil. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):6897-6905. Published 2015 Jun 18. doi:10.4238/2015.June.18.32
11 Saldarriaga W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Fragile X syndrome. *Colomb Med (Cali)*. 2014;45(4):190-198. Published 2014 Dec 30.
12 Santoro MR, Bray SM, Warren ST. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:219-245. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132457
13 Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet*. 2018;93(2):197-205. doi:10.1111/cge.13075
14 Muddashetty RS, Nalavadi VC, Gross C, et al. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*. 2011;42(5):673-688. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.006
15 Comery TA, Harris JB, Willems PJ, et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5401-5404. doi:10.1073/pnas.94.10.5401
16 Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*. 2001;21(14):5139-5146. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-14-05139.2001
17 Bassani S, Zapata J, Gerosa L, Moretto E, Murru L, Passafaro M. The neurobiology of X-linked intellectual disability. *Neuroscientist*. 2013;19(5):541-552. doi:10.1177/1073858413493972
18 Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet*. 2009;18(17):3164-3177. doi:10.1093/hmg/ddp255
19 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
20 Lin SL, Chang SJ, Ying SY. First in vivo evidence of microRNA-induced fragile X mental retardation syndrome. *Mol Psychiatry*. 2006;11(7):616-617. doi:10.1038/sj.mp.4001828
21 Lin SL. microRNAs and Fragile X Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2015;888:107-121. doi:10.1007/978-3-319-22671-2_7

22 Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, et al. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132 [published correction appears in Neuron. 2010 Oct 6;68(1):161]. *Neuron*. 2010;65(3):373-384. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.005
23 DeMarco B, Stefanovic S, Williams A, et al. FMRP - G-quadruplex mRNA - miR-125a interactions: Implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217275. Published 2019 May 21. doi:10.1371/journal.pone.0217275
24 Putkonen N, Laiho A, Ethell D, et al. Urine microRNA Profiling Displays miR-125a Dysregulation in Children with Fragile X Syndrome. *Cells*. 2020;9(2):289. Published 2020 Jan 24. doi:10.3390/cells9020289
25 R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **URL https://www.R-project.org**/
26 Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W460-W466. doi:10.1093/nar/gkv403
27 Huang Z, Shi J, Gao Y, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D1013-D1017. doi:10.1093/nar/gky1010
28 Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*. 2015;12(8):697. doi:10.1038/nmeth.3485
29 Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D239-D245. doi:10.1093/nar/gkx1141
30 Lu TP, Lee CY, Tsai MH, et al. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PLoS One*. 2012;7(8):e42390. doi:10.1371/journal.pone.0042390
31 Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D127-D131. doi:10.1093/nar/gkz757
32 Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020;9(2):276. Published 2020 Jan 23. doi:10.3390/cells9020276
33 Nie PY, Ji LL, Fu CH, Peng JB, Wang ZY, Tong L. miR-132 Regulates PTSD-like Behaviors in Rats Following Single-Prolonged Stress Through Fragile X-Related Protein 1. *Cell Mol Neurobiol*. 2021;41(2):327-340. doi:10.1007/s10571-020-00854-x
34 Levy JM, Chen X, Reese TS, Nicoll RA. Synaptic Consolidation Normalizes AMPAR Quantal Size following MAGUK Loss. *Neuron*. 2015;87(3):534-548. doi:10.1016/j.neuron.2015.07.015
35 Niu Y, Zeng X, Zhao L, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 regulates synaptic plasticity in a chronic migraine rat model through the PKC/NR2B signal. *J Headache Pain*. 2020;21(1):139. Published 2020 Dec 4. doi:10.1186/s10194-020-01206-2
36 Wayman GA, Davare M, Ando H, et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):9093-9098. doi:10.1073/pnas.0803072105
37 Tong L, Li MD, Nie PY, Chen Y, Chen YL, Ji LL. miR-132 downregulation alleviates behavioral impairment of rats exposed to single prolonged stress, reduces the level of apoptosis in PFC, and upregulates the expression of MeCP2 and BDNF. *Neurobiol Stress*. 2021;14:100311. Published 2021 Feb 25. doi:10.1016/j.ynstr.2021.100311
38 Sheng WH, Sheng KT, Zhao YX, et al. Identifying the biomarkers of multiple sclerosis based on non-coding RNA signature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(19):3635-3642.
39 Tan L, Yu JT, Liu QY, et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2014;336(1-2):52-56. doi:10.1016/j.jns.2013.10.002
40 Ma X, Liu L, Meng J. MicroRNA-125b promotes neurons cell apoptosis and Tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2017;661:57-62. doi:10.1016/j.neulet.2017.09.043
41 Sun D, Layer R, Mueller AC, et al. Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(11):1448-1457. doi:10.1038/onc.2013.77
42 Nieto Guil AF, Oksdath M, Weiss LA, et al. IGF-1 receptor regulates dynamic changes in neuronal polarity during cerebral cortical migration. *Sci Rep*. 2017;7(1):7703. Published 2017 Aug 9. doi:10.1038/s41598-017-08140-5

43 Wang J, Tang Y, Zhang W, et al. Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia. *FEBS J*. 2013;280(15):3658-3668. doi:10.1111/febs.12359
44 Smith PY, Hernandez-Rapp J, Jolivette F, et al. miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Hum Mol Genet*. 2015;24(23):6721-6735. doi:10.1093/hmg/ddv377
45 Xie B, Zhou H, Zhang R, et al. Serum miR-206 and miR-132 as Potential Circulating Biomarkers for Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(3):721-731. doi:10.3233/JAD-142847
46 Yang Z, Li T, Li S, et al. Altered Expression Levels of MicroRNA-132 and Nurr1 in Peripheral Blood of Parkinson's Disease: Potential Disease Biomarkers. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(5):2243-2249. doi:10.1021/acschemneuro.8b00460
47 Borgonio-Cuadra VM, Valdez-Vargas C, Romero-Córdoba S, et al. Wide Profiling of Circulating MicroRNAs in Spinocerebellar Ataxia Type 7. Mol Neurobiol. 2019;56(9):6106-6120. doi:10.1007/s12035-019-1480-y
48 Szemraj M, Bielecka-Kowalska A, Oszajca K, et al. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD. *Med Sci Monit*. 2015;21:2734-2742. Published 2015 Sep 14. doi:10.12659/MSM.893697
49 Dolati S, Aghebati-Maleki L, Ahmadi M, et al. Nanocurcumin restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Cell Physiol*. 2018;233(7):5222-5230. doi:10.1002/jcp.26301
50 Vrabec K, Boštjančič E, Koritnik B, et al. Differential Expression of Several miRNAs and the Host Genes *AATK* and *DNM2* in Leukocytes of Sporadic ALS Patients. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:106. Published 2018 Apr 4. doi:10.3389/fnmol.2018.00106
51 Weber DG, Gawrych K, Casjens S, et al. Circulating miR-132-3p as a Candidate Diagnostic Biomarker for Malignant Mesothelioma. *Dis Markers*. 2017;2017:9280170. doi:10.1155/2017/9280170
52 Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2015;137(7):1679-1690. doi:10.1002/ijc.29544
53 Yuxia M, Zhennan T, Wei Z. Circulating miR-125b is a novel biomarker for screening non-small-cell lung cancer and predicts poor prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(12):2045-2050. doi:10.1007/s00432-012-1285-0
54 Wang H, Tan G, Dong L, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e34210. doi:10.1371/journal.pone.0034210
55 Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*. 2009;23(7):862-876. doi:10.1101/gad.1767609
56 Nakanishi A, Minami A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. BRCA1 and p53 tumor suppressor molecules in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):2879-2892. Published 2015 Jan 28. doi:10.3390/ijms16022879
57 Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. Clin Chem. 2013;59(5):781-792. doi:10.1373/clinchem.2012.195776
58 Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):E846-E850. doi:10.1210/jc.2010-2701
59 Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J*. 2013;12:114. Published 2013 Aug 8. doi:10.1186/1475-2891-12-114
60 Meyers EA, Kessler JA. TGF-β Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(8):a022244. Published 2017 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect.a022244
61 Yuan H, Low CM, Moody OA, Jenkins A, Traynelis SF. Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases. *Mol Pharmacol*. 2015;88(1):203-217. doi:10.1124/mol.115.097998
62 El Khattabi L, Guimiot F, Pipiras E, et al. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including SIM1. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(8):1010-1018. doi:10.1038/ejhg.2014.230
63 Ramachandrappa S, Raimondo A, Cali AM, et al. Rare variants in single-minded 1 (SIM1) are associated with severe obesity [published correction appears in J Clin Invest. 2013 Aug 1;123(8):3635. Datta, Vippan [corrected to Datta, Vipan]]. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3042-3050. doi:10.1172/JCI68016
64 Renjie W, Haiqian L. MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5. *Cancer Lett*. 2015;356(2 Pt B):568-578. doi:10.1016/j.canlet.2014.10.003

65 Fukushi D, Yamada K, Suzuki K, et al. Clinical and genetic characterization of a patient with SOX5 haploinsufficiency caused by a de novo balanced reciprocal translocation. *Gene*. 2018;655:65-70. doi:10.1016/j.gene.2018.02.049
66 Qu X, Chen Z, Fan D, Sun C, Zeng Y. MiR-132-3p Regulates the Osteogenic Differentiation of Thoracic Ligamentum Flavum Cells by Inhibiting Multiple Osteogenesis-Related Genes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1370. Published 2016 Aug 20. doi:10.3390/ijms17081370
67 Tolchin D, Yeager JP, Prasad P, et al. De Novo SOX6 Variants Cause a Neurodevelopmental Syndrome Associated with ADHD, Craniosynostosis, and Osteochondromas. *Am J Hum Genet*. 2020;106(6):830-845. doi:10.1016/j.ajhg.2020.04.015
68 Deng Y, Zhang J, Sun X, et al. miR-132 improves the cognitive function of rats with Alzheimer's disease by inhibiting the MAPK1 signal pathway. *Exp Ther Med*. 2020;20(6):159. doi:10.3892/etm.2020.9288
69 Vithayathil J, Pucilowska J, Landreth GE. ERK/MAPK signaling and autism spectrum disorders. *Prog Brain Res*. 2018;241:63-112. doi:10.1016/bs.pbr.2018.09.008
70 Armeanu R, Mokkonen M, Crespi B. Meta-Analysis of BDNF Levels in Autism. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(5):949-954. doi:10.1007/s10571-016-0415-7
71 Mziaut H, Henniger G, Ganss K, et al. MiR-132 controls pancreatic beta cell proliferation and survival through Pten/Akt/Foxo3 signaling. *Mol Metab*. 2020;31:150-162. doi:10.1016/j.molmet.2019.11.012
72 Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, et al. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet*. 2005;42(4):318-321. doi:10.1136/jmg.2004.024646
73 Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, et al. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*. 2006;50(3):377-388. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.023
74 Dionne O, Corbin F. A new strategy to uncover fragile X proteomic biomarkers using the nascent proteome of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Sci Rep*. 2021;11(1):15148. Published 2021 Jul 26. doi:10.1038/s41598-021-94027-5

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados pela técnica de RT-qPCR para o miR-125b e miR-132 mostram que estes miRNAs são superexpressos no soro de pacientes com SXF. Isso sugere que estes miRNAs podem ser potenciais biomarcadores para auxiliar no prognóstico da síndrome. Além disso, os valores de AUC encontrados para os miR-125b e miR-132 sugerem que estes possuem alta sensibilidade e especificidade em discriminar indivíduos com SXF de indivíduos saudáveis. A superexpressão circulante destes miRNAs corrobora com os resultados encontrados para outras neuropatologias. Ambos miRNAs foram encontrados superexpressos em pacientes com Esclerose múltipla e Alzheimer, enquanto miR-132 também foi encontrado superexpresso em pacientes com doença de Parkinson, Ataxia Espinocerebelar, Degeneração Macular Relacionada à Idade e Esclerose Lateral Amiotrófica. A análise *in silico* sugere que miR-125b e miR-132 interagem com diversos genes que regulam processos metabólicos normais e neuropatológicos, sendo alguns deles *IGF1R*, *TP53*, *GRIN2A* e *SIM1* para miR-125b e *SOX5*, *SOX6*, *MAPK1*, *BDNF* e *PTEN* para miR-132. Existem diversos estudos relacionando esses genes às neuropatologias e a TEA. São necessários estudos maiores para confirmar a desregulação destes miRNAs em relação aos diferentes genótipos encontrados na síndrome e para explorar a causa e consequência da desregulação observada no soro dos pacientes com SXF.

APÊNDICE A – TCLE - PACIENTES

Projeto: Análise da expressão dos microRNAs mir-125, mir-132 e candidatos alvos na Síndrome do X Frágil

A pessoa pela qual você é responsável que apresenta diagnóstico de síndrome do X Frágil está sendo convidada a participar de uma pesquisa no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A pesquisa tem por objetivo pesquisar moléculas circulantes no sangue para saber se elas podem ser usadas futuramente no diagnóstico de novos pacientes com a síndrome do X-frágil. Isso porque a classificação da doença nem sempre é possível se usarmos apenas os sintomas manifestados pelos pacientes. Por isso, estamos pesquisando moléculas que possam ajudar no diagnóstico.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, a pessoa sob sua responsabilidade realizará o seguinte procedimento:

Será submetido a uma coleta de sangue, equivalente a uma colher de chá no ambulatório do Centro de Pesquisa Clínica do HCPA (mais ou menos 3 mL de sangue).

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto será minimizado pela realização da coleta por profissional treinado. Esta pesquisa não tem como finalidade imediata uma melhora para os pacientes com X-frágil. O estudo pretende encontrar mais uma alternativa que auxilie no diagnóstico e acompanhamento de pessoas com a síndrome do X-frágil, já que ainda existem casos em que o diagnóstico e acompanhamento podem ser difíceis.

Lembre-se, que a participação neste estudo não terá nenhum custo (não haverá recebimento de pagamento pela participação) e é voluntária. Se você decidir não autorizar ou quiser desistir da autorização em qualquer momento, tem total liberdade de fazer, sem que isto prejudique ou interfira no acompanhamento e tratamento do paciente no HCPA. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a Dra. Sandra Leistner-Segal, pelo telefone (51) 3359 7211, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a Dra. Sandra Leistner-Segal, pelo telefone (51) 3359 7211, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

_____

Nome do participante da pesquisa

_____

Assinatura (*se aplicável*)

_____

Nome do responsável

_____

Assinatura

_____

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

_____

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE B – TCLE - CONTROLES

Projeto: Análise da expressão dos microRNAs mir-125, mir-132 e candidatos alvos na Síndrome do X Frágil

Prezado, estamos realizando um estudo no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e estamos convidando você para participar desse estudo. O projeto tem por objetivo pesquisar moléculas circulantes no seu sangue para serem comparadas a moléculas circulantes no sangue de pacientes com X –frágil e saber se estas podem ser usadas futuramente no diagnóstico de pacientes com a síndrome do X-frágil. Isso porque a classificação da doença nem sempre é possível se usarmos apenas os sintomas manifestados pelos pacientes. Por isso, estamos pesquisando moléculas que possam ajudar no diagnóstico. Você está sendo convidado para participar voluntariamente como controle, pois NÃO possui a síndrome do X-Frágil.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, será realizado o seguinte procedimento:

Na hora da doação de sangue, será incluído um tubo adicional para coleta de sangue para este projeto, equivalente a uma colher de chá (mais ou menos 3 mL de sangue).

Os riscos e desconfortos causados por esta coleta de sangue serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Esta pesquisa não tem como finalidade imediata uma melhora para os pacientes com X-frágil. O estudo pretende encontrar mais uma alternativa que auxilie no diagnóstico e acompanhamento de pessoas com a síndrome do X-frágil, já que ainda existem casos em que o diagnóstico e acompanhamento podem ser difíceis.

Lembre-se, que a participação neste estudo não terá nenhum custo (não haverá recebimento de pagamento pela participação) e é voluntária. Se você decidir não autorizar ou quiser desistir em qualquer momento, tem total liberdade de fazer, sem que isto prejudique ou interfira sua doação de sangue no Banco de Sangue do HCPA. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem sua identificação, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a Dra. Sandra Leistner-Segal, pelo telefone (51) 3359 7211, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

_____

Nome do responsável

_____

Assinatura

_____

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

_____

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO 1 – MIRNEASY SERUM/PLASMA

Quick-Start Protocol April 2021

miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit

The miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (cat. no. 217204) is shipped at ambient temperature. Upon arrival, store the RNeasy® UCP MinElute® spin columns at 2–8°C. Store the remaining components dry at room temperature (15–25°C). This protocol is for purification of total RNA including small RNAs from serum or plasma.

Further information

- *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Handbook*: **www.qiagen.com/HB-2390**
- Safety Data Sheets: **www.qiagen.com/safety**
- Technical assistance: **support.qiagen.com**

Notes before starting

- Buffer RWT and RPL contain guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach.
- If necessary, re-dissolve any precipitate in Buffer RPL or Buffer RWT by warming
- Equilibrate buffers to room temperature (15–25°C).
- All steps should be performed at room temperature (15–25°C). Work quickly.
- Add ethanol (96–100%) to Buffer RWT and Buffer RPE concentrates before use (see bottle label for volume).
- Before starting, read method for preparing serum or plasma in the handbook.

Procedure

1. Prepare serum or plasma or thaw frozen samples.
2. Transfer 200 µl serum or plasma into a 2 ml tube.
3. Add 60 µl Buffer RPL. Close the tube caps and vortex for > 5 s. Incubate at room temperature for 3 min.

4. Add 20 µl Buffer RPP. Close the tube caps and mix vigorously by vortexing for >20 s. Incubate at room temperature for 3 min.
5. Centrifuge at 12000 *x g* for 3 min at room temperature to pellet the precipitate.

   Note: Supernatant should be clear and colorless.
6. Transfer the supernatant (~230 µl) to a new reaction tube. Add 1 volume isopropanol. Mix well by vortexing. Transfer the entire sample to an RNeasy UCP MinElute column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at ≥8000 *x g*. Discard the flow-through.
7. Pipet 700 µl Buffer RWT to the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at ≥8000 *x g*. Discard the flow-through.
8. Pipet 500 µl Buffer RPE onto the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at ≥8000 *x g*. Discard the flow-through.
9. Add 500 µl of 80% ethanol to the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 2 min at ≥8000 *x g*. Discard the flow-through and the collection tube.
10. Place the RNeasy UCP MinElute spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid of the spin column and centrifuge at full speed for 5 min to dry the membrane. Discard the flow-through and the collection tube.
11. Place the RNeasy UCP MinElute spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 20 µl RNase-free water directly to the center of the spin column membrane and incubate 1 min. Close the lid, and centrifuge for 1 min at full speed to elute the RNA.

Document Revision History

Date	Changes
04/2021	Removed the reference to the miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control.

Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law. 1124411 04/2021 HB-2299-002 © 2021 QIAGEN, all rights reserved.

ANEXO 2 – TAQMAN™ ADVANCED MICRORNA ASSAYS

appliedbiosystems QUICK REFERENCE

TaqMan® Advanced miRNA Assays

Single-tube assays

Catalog Number A25576

Pub. No. 100027898 **Rev.** D

Note: For safety and biohazard guidelines, see the "Safety" appendix in the *TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (Single-tube Assays)* (Pub. No. 100027897). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

This Quick Reference is intended as a benchtop reference for experienced users of TaqMan® Advanced miRNA Assays and the TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Cat. No. A28007; sold separately). For detailed instructions, supplemental procedures, and troubleshooting, see the *TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (Single-tube Assays)* (Pub. No. 100027897).

Prepare cDNA templates

Procedural guidelines

Guidelines for preparing cDNA templates

- Keep the TaqMan® Advanced miRNA Assays in storage until ready for use.
- Calculate the number of required reactions. Scale reaction components based on the single-reaction volumes, then include 10% overage.

Guidelines for RNA input

- Prepare samples using a total RNA isolation method that preserves small RNAs.
- For tissue samples: Use 1–10 ng of total RNA per reaction.
- For blood, serum, or plasma samples: Use 2 µL of sample eluent (from the sample isolation procedure) per reaction.
- For optimal reverse transcription, input RNA should be:
  - Free of inhibitors of reverse transcription (RT) and PCR
  - Dissolved in PCR-compatible buffer
  - Free of RNase activity
  - Nondenatured total RNA

Perform the poly(A) tailing reaction

1. Thaw samples and cDNA synthesis reagents on ice, gently vortex, then centrifuge briefly.

IMPORTANT! The 50% PEG 8000 reagent must be at room temperature for the adaptor ligation reaction (next section).

2. In a 1.5-mL microcentrifuge tube, prepare sufficient Poly(A) Reaction Mix for the required number of reactions according to the following table.

Component	1 Rxn	4 Rxns[1]	10 Rxns[1]
10X Poly(A) Buffer	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
ATP	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
Poly(A) Enzyme	0.3 µL	1.3 µL	3.3 µL
RNase-free water	1.7 µL	7.5 µL	18.7 µL
Total Poly(A) Reaction Mix volume	**3.0 µL**	**13.2 µL**	**33 µL**

[1] Volumes include 10% overage.

3. Vortex the Poly(A) Reaction Mix, then centrifuge briefly.
4. Add 2 µL of sample to each well of a reaction plate or each reaction tube, then transfer 3 µL of Poly(A) Reaction Mix to each well or tube.

   The total volume should be 5 µL per well or tube.
5. Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
6. Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents and eliminate air bubbles.
7. Place the reaction plate or tubes into a thermal cycler, then incubate using the following settings and standard cycling:

Step	Temperature	Time
Polyadenylation	37°C	45 minutes
Stop reaction	65°C	10 minutes
Hold	4°C	Hold

8. Proceed immediately to the adaptor ligation reaction (next section).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher SCIENTIFIC

Perform the adaptor ligation reaction

1. In a 1.5-mL microcentrifuge tube, prepare sufficient Ligation Reaction Mix for the required number of reactions according to the following table.

Component	1 Rxn	4 Rxns[1]	10 Rxns[1]
5X DNA Ligase Buffer	3 µL	13.2 µL	33 µL
50% PEG 8000[2]	4.5 µL	19.8 µL	49.5 µL
25X Ligation Adaptor	0.6 µL	2.6 µL	6.6 µL
RNA Ligase	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
RNase-free water	0.4 µL	1.8 µL	4.4 µL
Total Ligation Reaction Mix volume	**10 µL**	**44 µL**	**110 µL**

[1] Volumes include 10% overage.
[2] 50% PEG 8000 is very viscous, follow the Important statement below to ensure accurate pipetting.

IMPORTANT! For accurate pipetting of 50% PEG 8000:

- Use 50% PEG 8000 at room temperature.
- Aspirate and dispense solution slowly.

2. Vortex the Ligation Reaction Mix, then centrifuge briefly.
3. Transfer 10 µL of the Ligation Reaction Mix to each well of the reaction plate or each reaction tube containing the poly(A) tailing reaction product.

   The total volume should be 15 µL per well or tube.
4. Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly or shake (1,900 rpm for 1 minute with an Eppendorf® MixMate™ (Cat. No. 21-379-00)) to thoroughly mix the contents.

IMPORTANT! Watch for a swirling motion of the adaptor ligation reaction to ensure proper mixing, which is necessary for efficient ligation.

5. Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
6. Place the reaction plate or tubes into a thermal cycler, then incubate using the following settings and standard cycling:

Step	Temperature	Time
Ligation	16°C	60 minutes
Hold	4°C	Hold

7. Proceed immediately to the reverse transcription (RT) reaction (next section).

Perform the reverse transcription (RT) reaction

1. In a 1.5-mL microcentrifuge tube, prepare sufficient RT Reaction Mix for the required number of reactions according to the following table.

Component	1 Rxn	4 Rxns[1]	10 Rxns[1]
5X RT Buffer	6 µL	26.4 µL	66 µL
dNTP Mix (25 mM each)	1.2 µL	5.3 µL	13.2 µL
20X Universal RT Primer	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
10X RT Enzyme Mix	3 µL	13.2 µL	33 µL
RNase-free water	3.3 µL	14.5 µL	36.3 µL
Total RT Reaction Mix volume	**15 µL**	**66 µL**	**165 µL**

[1] Volumes include 10% overage.

2. Vortex the RT Reaction Mix, then centrifuge briefly.
3. Transfer 15 µL of the RT Reaction Mix to each well of the reaction plate or each reaction tube containing the adaptor ligation reaction product.

   The total volume should be 30 µL per well or tube.
4. Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
5. Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
6. Place the reaction plate or tubes into a thermal cycler, then incubate using the following settings and standard cycling:

Step	Temperature	Time
Reverse transcription	42°C	15 minutes
Stop reaction	85°C	5 minutes
Hold	4°C	Hold

7. Proceed to the miR-Amp reaction (next section).

Store the RT reaction product at –20°C for up to 2 months.

Perform the miR-Amp reaction

1. In a 1.5-mL microcentrifuge tube, prepare sufficient miR-Amp Reaction Mix for the required number of reactions according to the following table.

Component	1 Rxn	4 Rxns[1]	10 Rxns[1]
2X miR-Amp Master Mix	25 µL	110 µL	275 µL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 µL	11 µL	27.5 µL
RNase-free water	17.5 µL	77 µL	192.5 µL
Total miR-Amp Reaction Mix volume	**45 µL**	**198 µL**	**495 µL**

[1] Volumes include 10% overage.

2. Vortex the miR-Amp Reaction Mix, then centrifuge briefly.
3. Transfer 45 µL of the miR-Amp Reaction Mix to each well of a *new* reaction plate or reaction tube.
4. Add 5 µL of the RT reaction product to each reaction well or each reaction tube.

   The total volume should be 50 µL per well or tube.
5. Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
6. Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
7. Place the reaction plate or tubes into a thermal cycler, then incubate using the following settings, MAX ramp speed, and standard cycling:

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 minutes	1
Denature	95°C	3 seconds	14
Anneal/Extend	60°C	30 seconds	
Stop reaction	99°C	10 minutes	1
Hold	4°C	Hold	1

8. Proceed to performing the real-time PCR (next section).

Store the undiluted miR-Amp reaction product at –20°C for up to 2 months.

Perform real-time PCR

Procedural guidelines for performing real-time PCR

- Keep the assays protected from light and stored at –20°C until ready for use.
- We recommend four replicates of each reaction.
- Calculate the number of required reactions. Scale reaction components based on the single-reaction volumes, then include 10% overage.
- For reaction volumes that are different from those detailed, scale all components proportionally.
  Reaction volumes < 10 µL are not recommended.

Prepare PCR reaction plate

1. Thaw the assays on ice, gently vortex, then centrifuge briefly.
2. Prepare 1:10 dilution of cDNA template.
3. Gently shake the bottle of master mix. Do not invert the bottle.
4. In a 1.5-mL microcentrifuge tube, prepare sufficient PCR Reaction Mix for the required number of reactions according to the following table.

Component	1 Rxn	4 Rxns[1]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	44.0 µL
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	1 µL	4.4 µL
RNase-free water	4 µL	17.6 µL
Total PCR Reaction Mix volume	**15 µL**	**66 µL**

[1] Volumes include 10% overage.

5. Vortex the PCR Reaction Mix, then centrifuge briefly.
6. Transfer 15 µL of the PCR Reaction Mix to each well of a PCR reaction plate.
7. Add 5 µL of the diluted cDNA template to each reaction well of the plate.

   The total volume should be 20 µL per reaction well.
8. Seal the reaction plate with an adhesive cover, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
9. Centrifuge the reaction plate briefly to spin down the contents.

Set up and run the real-time PCR instrument

See the appropriate instrument user guide for detailed instructions to program the thermal-cycling conditions or to run the plate.

1. Load the reaction plate in the real-time PCR instrument.
2. Set the appropriate experiment settings and PCR thermal cycling conditions for your instrument. Select the fast cycling mode for all instruments.

Table 1 StepOnePlus™, VIIA™ 7, and QuantStudio™ systems

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	20 seconds	1
Denature	95°C	1 second	40
Anneal / Extend	60°C	20 seconds	

Table 2 7500 and 7500 Fast systems

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	20 seconds	1
Denature	95°C	3 seconds	40
Anneal / Extend	60°C	30 seconds	

3. Set the reaction volume appropriate for the reaction plate.
4. Start the run.

Analyze the results

For detailed information about data analysis, see the appropriate documentation for your instrument. Use the standard curve method or the relative quantification ($\Delta\Delta C_t$) method to analyze results.

The general guidelines for analysis include:

- View the amplification plot; then, if needed:
  - Adjust the baseline and threshold values.

    Note: A threshold value of 0.1 is recommended.
  - Remove outliers from the analysis.
- In the well table or results table, view the C_t values for each well and for each replicate group.

For more information about real-time PCR, go to: **thermofisher.com/qpcreducation.**

Manufacturer's address: Life Technologies Corporation | 6055 Sunol Blvd | Pleasanton, CA 94566

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Revision history. Pub. No. 100027898

Revision	Date	Description
D	02 September 2016	Update general formatting to streamline content.
C	July 2015	Correct typos in poly(A) tailing reaction preparation table and in miR-Amp reaction thermal cycling conditions table.
B	June 2015	Correct typo in PCR reaction preparation table.
A	April 2015	New document.

Important Licensing Information. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

ANEXO 3 – TCUD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Título do Projeto	Cadastro no GPPG
Análise da expressão dos microRNAs miR-125, miR-132 e candidatos alvos na Síndrome do X frágil	

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 15 de FEVEREIRO de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Raviena Rubem Silva do Couto	Raviena Rubem S Couto
SANDRA LEISTNER SEGAL	
ANA CAROLINA BRUSINS FACCHIN	
FRANLYNE KUBASKI	Franlyne Kubaski
Temis Maria Félix	