

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.

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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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
<i>FMR1</i>	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 <i>N</i> -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 <i>FMR1</i>	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 <i>IN SILICO</i> DOS GENES ALVOS DOS MIR-125B-5P E MIR-132-3P	40
	REFERÊNCIAS	41
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	APÊNDICE A – TCLE - PACIENTES	54
	APÊNDICE B – TCLE - CONTROLES	56
	ANEXO 1 – MIRNEASY SERUM/PLASMA	58
	ANEXO 2 – TAQMAN™ ADVANCED MICRORNA ASSAYS	60
	ANEXO 3 – TCUD	64

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, conseqüentemente, 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, conseqüentemente, 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 conseqüentemente 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).

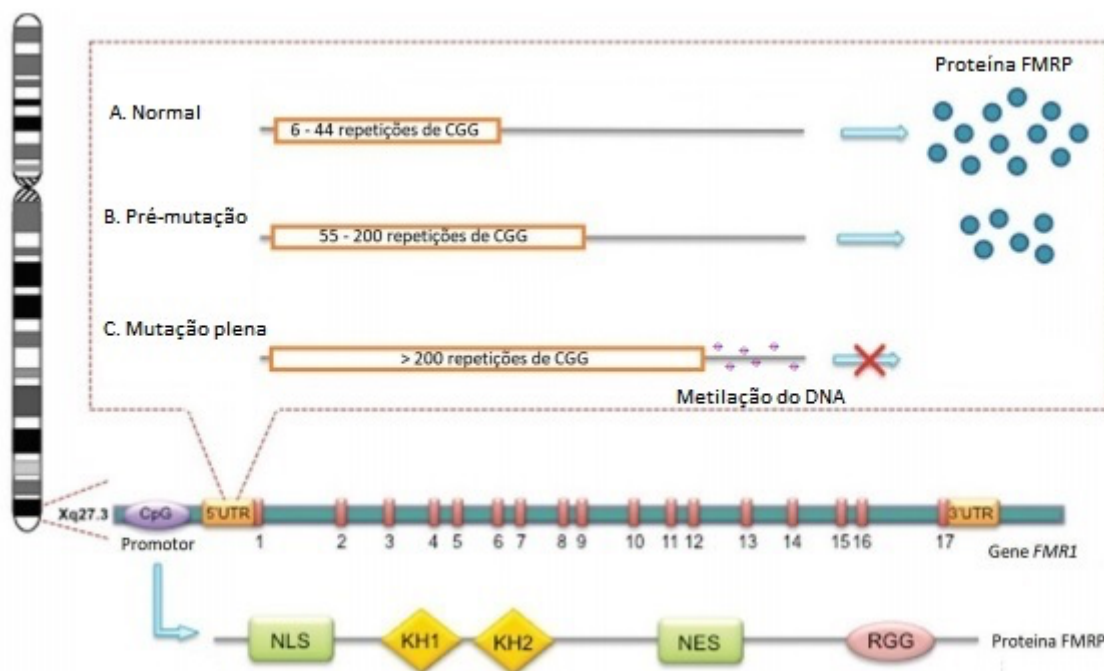
2 REVISÃO DE LITERATURA

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 conseqüentemente 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 mosaicismos quanto ao tamanho da expansão da repetição (CGG)_n, podendo ser mosaicismos de MP e PM, mosaicismos de MP e alelo normal e mosaicismos 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; WILLEMSSEN, 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).

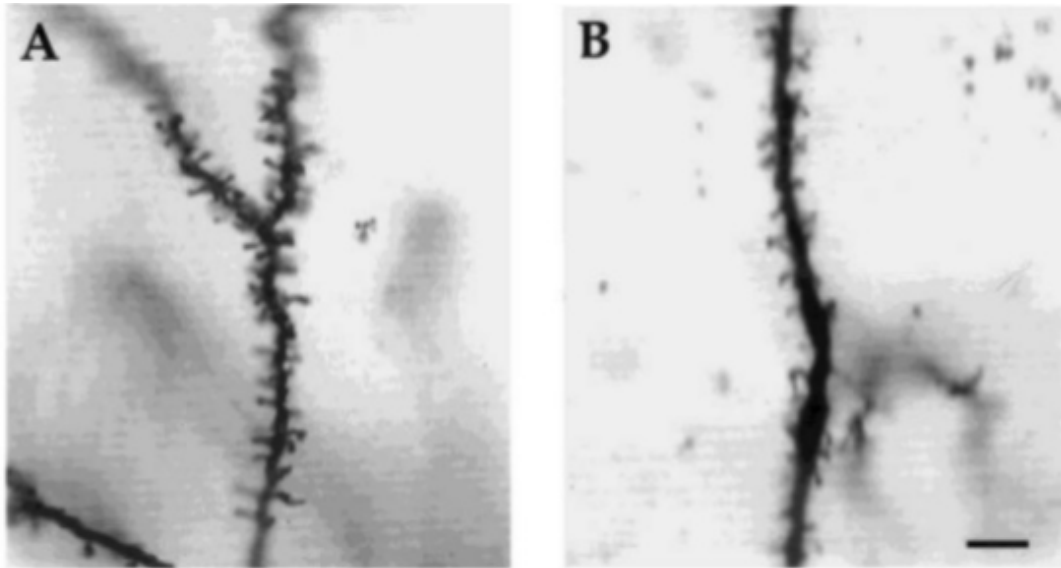
2.2 A PROTEÍNA FMRP

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 proteica (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

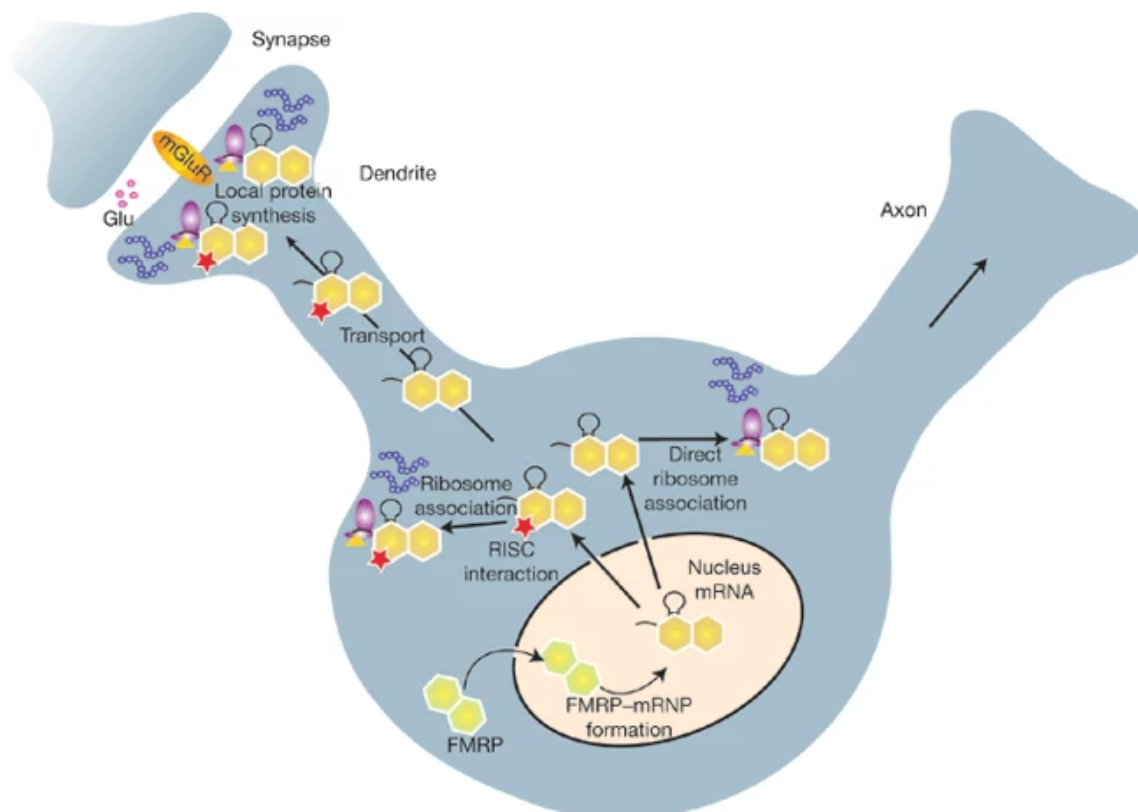


A: Cérebro de camundongo modelo para a SXF, KO *FMR1*, apresenta anormalidades das espinhas dendríticas, que se mostram mais longas, finas, densas e em maior número. B: cérebro de camundongo selvagem com a presença de espinhas dendríticas típicas.

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, conseqüentemente, 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 Argonata e com os microRNAs, para regular a expressão de mRNAs cerebrais (JIN *et al.*, 2004).

2.3 MICRORNAS (MIRNAS)

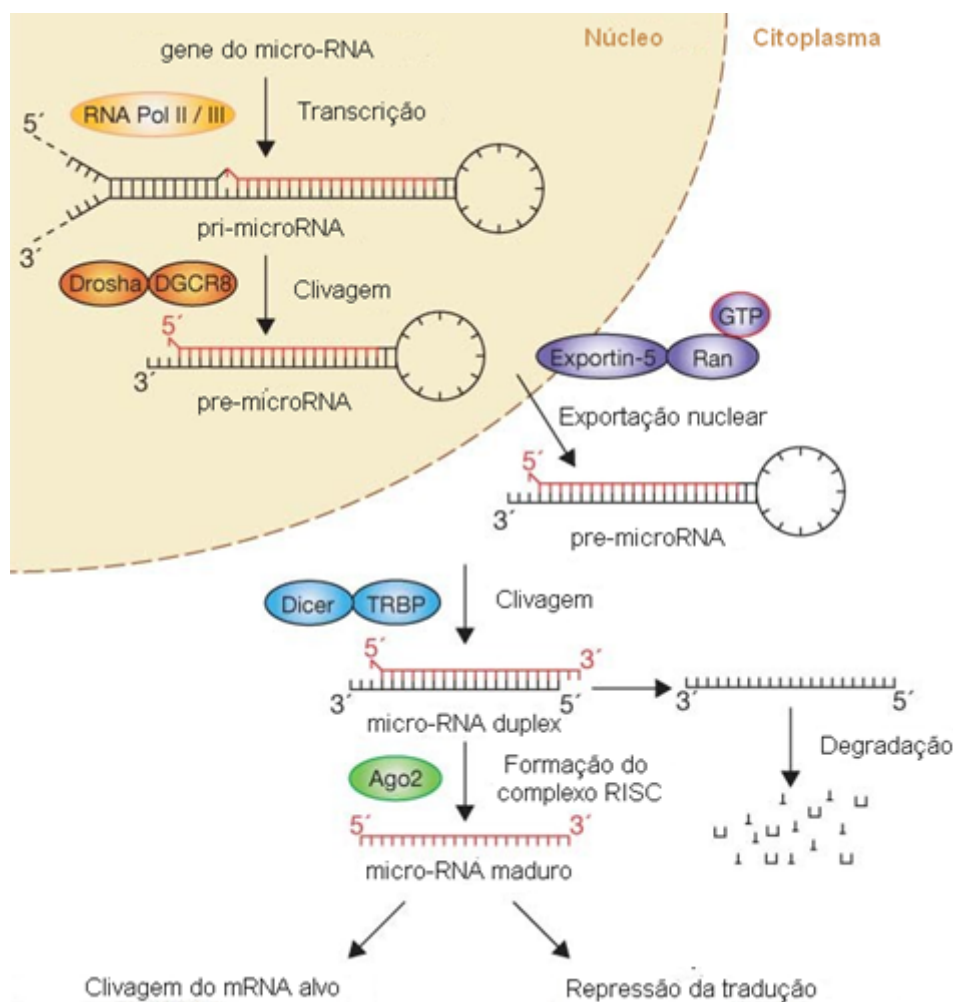
Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes de fita simples de aproximadamente 22 nucleotídeos envolvidos na regulação gênica pós-transcricional (BARTEL, 2009; KROL *et al.*, 2010). Seu papel no processo da regulação gênica ocorre em diferentes processos biológicos importantes das células, 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 Argonata (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-ucccugagaccuaacuuguga- 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.

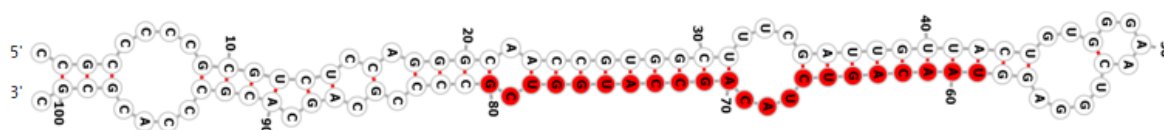
Fonte: <http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>

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; JUŻWIK *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; JUŻWIK *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; KANACH *et al.*, 2021; MARTINEZ; PELOW, 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 4°C. Após a centrifugação, o soro foi alíquotado e separado em criotubos devidamente identificados e armazenados a -80°C 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 -80°C.

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)
<i>TaqMan™ Fast Advanced Master Mix</i>	10 uL
<i>Advanced assay</i> - 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 95°C por 20 segundos, 40 ciclos sob uma temperatura de 95°C por 1 segundo e 40 ciclos a 60°C 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 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ médio do alvo} - Ct \text{ médio do endógeno}) - Ct \text{ médio do calibrador}$.

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.

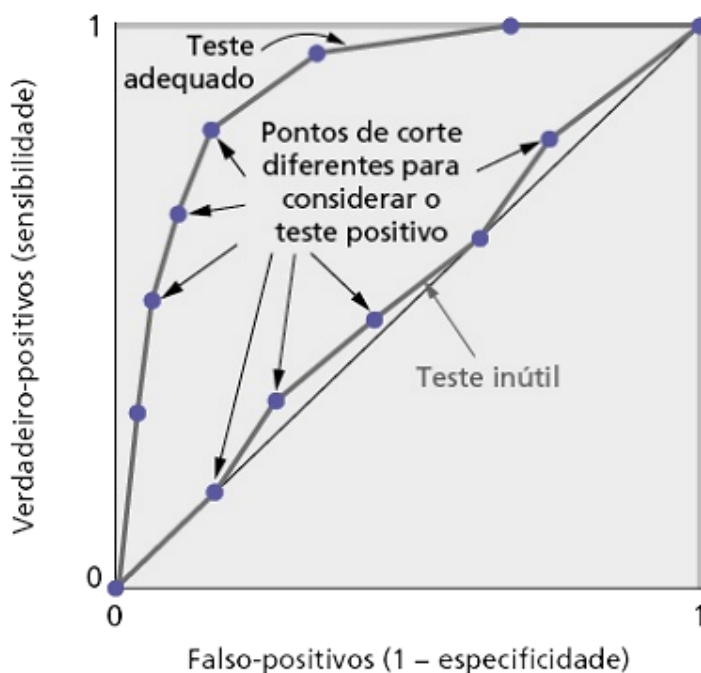
6.13 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CURVA ROC

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 prever 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)* (DWEET; 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](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](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. I.], 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. I.], 2021. Available at: <https://www.ensembl.org/>. Acesso em: 2 ago. 2021.

ESCH, C. E. F.; ZEIDLER, S.; WILLEMSSEN, 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. I.], 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 3rd 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>

JUŻWIK, 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 down-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- $\Delta\Delta$ CT 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; PELOW, 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- κ B 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/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3481111/). Acesso em: 20 ago. 2021.

7 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.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de

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: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

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](mailto: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.

— Sample to Insight —



-
4. Add 20 μ l 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 $\times g$ for 3 min at room temperature to pellet the precipitate.
Note: Supernatant should be clear and colorless.
 6. Transfer the supernatant (~230 μ l) 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 $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
 7. Pipet 700 μ l Buffer RWT to the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
 8. Pipet 500 μ l Buffer RPE onto the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
 9. Add 500 μ l of 80% ethanol to the RNeasy UCP MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$. 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 μ l 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 PB-2299-002 © 2021 QIAGEN, all rights reserved.

ANEXO 2 – TAQMAN™ ADVANCED MICRORNA ASSAYS

applied biosystems

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

- 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.

- Vortex the Ligation Reaction Mix, then centrifuge briefly.
- 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.
- 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.

- Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
- 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

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

Perform the reverse transcription (RT) reaction

- 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.

- Vortex the RT Reaction Mix, then centrifuge briefly.
- 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.
- Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
- Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
- 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

- 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

- 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.

- Vortex the miR-Amp Reaction Mix, then centrifuge briefly.
- Transfer 45 µL of the miR-Amp Reaction Mix to each well of a new reaction plate or reaction tube.
- 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.
- Seal the reaction plate or tubes, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
- Centrifuge the reaction plate or tubes briefly to spin down the contents.
- 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

- 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

- Thaw the assays on ice, gently vortex, then centrifuge briefly.
- Prepare 1:10 dilution of cDNA template.
- Gently shake the bottle of master mix. Do not invert the bottle.
- 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.

- Vortex the PCR Reaction Mix, then centrifuge briefly.
- Transfer 15 µL of the PCR Reaction Mix to each well of a PCR reaction plate.
- 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.
- Seal the reaction plate with an adhesive cover, then vortex briefly to thoroughly mix the contents.
- 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/qpcr/education.

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.

For support visit thermofisher.com/support or email techsupport@lifetech.com
thermofisher.com

2 September 2016

ThermoFisher
SCIENTIFIC

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

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

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 FEVREIRO de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Rowena Rubem Silva do Couto	Rowena Rubem S. Couto
SANDRA LEISTNER SEGAL	Sandra Leistner
ANA CAROLINA BRUSIS FACCHINI	Ana Carolina Brusis
FRANCINE KUBACKI	Francine Kubacki
Tereza Maria Felício	Tereza Maria Felício