UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ISABELA ICHIHARA DE BARROS

**Caracterização de um novo RNA longo não codificador e seu provável papel
no desenvolvimento neuronal**

Ribeirão Preto

2020

ISABELA ICHIHARA DE BARROS

**Caracterização de um novo RNA longo não codificador e seu provável papel
no desenvolvimento neuronal**

Versão corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ichihara de Barros, Isabela

Caracterização de um novo RNA longo não codificador e seu provável papel no desenvolvimento neuronal.

Ribeirão Preto, 2020

141 p.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientador: SILVA JR, Wilson Araújo

- RNA longo não codificador (lncRNA). 2. Deficiência intelectual. 3. Neurodesenvolvimento. 4. Diferenciação neural. 5. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs).

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB), localizado no Hemocentro de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP), e contou com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Nome: BARROS, Isabela Ichihara de

Título: Caracterização de um novo RNA longo não codificador e seu provável papel no desenvolvimento neuronal.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____ Intituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Intituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Intituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, mas especialmente: aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, por todo o apoio, compartilhamento de conhecimento e de experiências; a Maria Florencia Tellechea, pessoa fundamental para desenvolvimento deste projeto; aos amigos do Laboratório de Biologia Funcional, por todo o suporte de sempre; a toda equipe da Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto.

À minha família, pela força em todos os momentos para correr atrás dos meus objetivos e chegar cada dia um pouquinho mais longe.

Ao meu orientador Wilson Silva Jr, pela confiança e apoio neste desafio.

Ao professor João Monteiro de Pina Neto, pelo suporte na convocação e atendimento do paciente incluído neste estudo.

Ao professor Daniel A. Lim e toda equipe, pelo acolhimento e aprendizado durante meu estágio no exterior.

Aos meus amigos, por tornarem a caminhada mais leve.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Genética.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa - Código de financiamento 001.

À FAPESP, CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela infraestrutura.

RESUMO

BARROS, Isabela Ichihara de. **Caracterização de um novo RNA longo não codificador e seu provável papel no desenvolvimento neuronal**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Componentes de um grupo altamente heterogêneo de RNAs, os RNAs longos não codificadores (lncRNAs) têm sido descritos nos mais variados processos biológicos e sua importância no contexto regulatório celular tem sido cada vez mais reconhecido. Apesar de uma grande parcela de transcritos ainda não possuir caracterização funcional, diversos lncRNAs vêm sendo descritos como atores fundamentais em vias do desenvolvimento embrionário e, mais especificamente, do neurodesenvolvimento. O lncRNA RP11-1082A3.1 é um transcrito testículo-específico que ainda não possui nenhuma função conhecida e cujo locus foi perdido em um paciente atendido pelo serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Este paciente apresenta dentre os seus fenótipos deficiência intelectual (DI), macrocefalia, dificuldade motora e de aprendizado, porém sem diagnóstico específico. Foi identificada uma microdeleção na região 14q32.2 no paciente e, como não há nenhum outro gene conhecido na região deletada, apenas o lncRNA, hipotetizamos que esse transcrito pode estar envolvido com o desenvolvimento neuronal e a sua perda pode ter influenciado no quadro de DI do paciente. O objetivo deste trabalho foi, então, investigar se o lncRNA RP11-1082A3.1 está envolvido no processo de diferenciação celular do sistema nervoso central. A expressão testículo-específica do transcrito foi validada e ele também foi encontrado expresso em linhagens celulares de câncer, o que pode indicar sua atuação durante a embriogênese. Além disso, com análises *in silico*, foram encontrados diversos RNAs potenciais parceiros de interação que atuam em vias importantes para o neurodesenvolvimento e correto funcionamento neuronal, indicando que o lncRNA também pode estar atuando nesses processos. Foram geradas células pluripotentes induzidas (iPSCs) do paciente com a microdeleção e foi verificado um atraso na diferenciação neuronal, quando comparados com iPSCs de um indivíduo controle, o que foi identificado tanto fenotipicamente quanto por marcadores de progenitores neurais. Adicionalmente, em uma linhagem de iPSCs, foi observado que a diminuição da expressão do RP11-1082A3.1 levou à diminuição da expressão de marcadores neurais após diferenciação. Além disso, a superexpressão desse lncRNA diminuiu a capacidade proliferativa das iPSCs do

paciente em 168h, indicando seu papel regulatório nesse processo. Tais resultados indicam que o RP11-1082A3.1 pode estar atuando na diferenciação neuronal, sendo potencialmente importante para que as células passem de um estado proliferativo para um estado de diferenciação.

Palavras-chave: RNA longo não codificador (lncRNA); Deficiência intelectual; Neurodesenvolvimento; Diferenciação neural; Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs).

ABSTRACT

BARROS, I. I. Characterization of a novel long noncoding RNA and its likely role in neuronal development. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Components of a highly heterogeneous group of RNAs, long noncoding RNAs (lncRNAs) have been described in varied biological processes and their importance in the cellular regulatory context have been increasingly recognized. Despite a large portion of transcripts are still functionally uncharacterized, many lncRNA have been described as fundamental actors in embryonic development, and, more specifically, in neurodevelopmental pathways. The lncRNA RP11-1082A3.1 is a testis-specific transcript that has no known function yet and whose locus was lost in a patient treated by the Genetics Service at the Medical School of Ribeirão Preto, USP. This patient has among his phenotypes intellectual disability (ID), macrocephaly, motor and learning difficulties, but without a specific diagnosis. A microdeletion was identified in the patient in the 14q32.2 region and, since there are no known genes in the deleted region, only this lncRNA, we hypothesized that this transcript might be involved with neuronal development and its loss can have influence in the patient's ID. Thus, the aim of this work was to investigate if the lncRNA RP11-1082A3.1 is involved in cell differentiation in the central nervous system. The testis-specific lncRNA expression was validated and its expression was also found in cancer cell lines, which can indicate its role during embryogenesis. Furthermore, through *in silico* analysis, several potential RP11-1082A3.1 RNAs binding partners were found, which play roles in important neurodevelopment and neuronal functioning pathways, indicating that this lncRNA can also participate in these processes. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) from the patient with the microdeletion were generated and it was verified, both phenotypically and by neural progenitor markers expression, that they showed delayed neuronal differentiation, when compared to iPSCs from a control individual. Additionally, using an iPSC cell line, it was observed that knocking down the lncRNA expression led to diminished neural markers expression after neural differentiation. Furthermore, RP11-1082A3.1 overexpression reduced the proliferation of the patient's iPSCs by 168h, indicating its regulatory role in this process. These results indicate that the lncRNA RP11-1082A3.1 may regulate neuronal differentiation, being potentially important for the proliferation/differentiation switch.

Keywords: Long noncoding RNA (lncRNA); Intellectual disability; Neurodevelopment; Neural differentiation; Induced pluripotent stem cells (iPSCs).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos lncRNAs em relação aos genes codificadores de proteínas. (A) lncRNA intergênico, localizado entre dois genes codificadores de proteína; (B) lncRNA intrônico, que é transcrito a partir da sequência intrônica de um gene codificador de proteína; (C) lncRNAs senso e antisenso, a depender do sentido em que é transcrito em relação ao gene codificador; (D) lncRNA bi-direcional, localizado a pelo menos 1000 pb do gene codificador e transcrito na direção oposta. Fonte: modificado de (HOSSEINI et al., 2019).....	19
Figura 2 - Resultado do aGH, com destaque para a microdeleção identificada no probando. Abaixo, a região genômica deletada no probando acessada pela base de dados UCSC Genome Browser, demonstrando a presença do locus do lncRNA RP11-1082A3.1, único gene encontrado na região até o momento.....	27
Figura 3 - Desenho esquemático da localização do par de primers utilizado para a reação de PCR convencional e o tamanho esperado do amplicon (264 pb). 1: primeiro éxon; 2: segundo éxon; 3: terceiro éxon.	30
Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pSLQ1371 utilizado para clonagem dos gRNAs.....	41
Figura 5 - Avaliação qualitativa (A) e quantitativa (B) da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 em um painel de tecidos normais.	49
Figura 6 - Expressão do RP11-1082A3.1 em um painel de linhagens tumorais. DLD-1, adenocarcinoma colorretal; HB4A, mama normal; PC3, adenocarcinoma de próstata; OVCAR3, adenocarcinoma de ovário; A2780, carcinoma de ovário; SNC775, glioblastoma (cultura primária); NTera-2, carcinoma embrionário de testículo.	50
Figura 7 - Sequências das bandas (A) de 264 pb e (B) de 246 pb. A linha vermelha indica a junção éxon-éxon.	51
Figura 8 - Alinhamento genômico do RP11-1082A3.1 com outras espécies. Na ordem, de cima para baixo: camundongo, rato, chimpanzé, gorila, vaca.	62
Figura 9 - Expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 em dados públicos de RNA-seq de 4 estudos diferentes. (A) Estudo 6, GSE74896; (B) Estudo 10, GSE92277; (C) Estudo 15, SRP069329; (D) Estudo 16, GSE89779. TPM: transcritos por milhão.	70
Figura 10 - Nível de expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 (AL132719.1) em diferentes regiões do cérebro humano pré-natal. TPM, transcritos por milhão.....	72

Figura 11 - Identificação da deleção cromossômica no paciente e sua família. O paciente afetado é filho de pais não consanguíneos (A). Através da análise de aGH, foi possível identificar que a deleção não está presente nos pais (B), apenas no paciente, cuja deleção engloba o locus do RP11-1082A3.1 (C).....	74
Figura 12 - Porcentagem de células positivas (% Gated) do indivíduo controle para marcadores eritroides antes da nucleoporação. O marcador 7AAD foi utilizado para avaliação da viabilidade celular.	75
Figura 13 - Porcentagem de células positivas (% Gated) do paciente para marcadores eritroides antes da nucleoporação. O marcador 7AAD foi utilizado para avaliação da viabilidade celular.	75
Figura 14 - Colônias de iPSCs, identificadas por setas brancas, observadas 10 dias (D10) e 12 dias (D12) após a nucleoporação dos eritroblastos. Aumento: 10x.....	76
Figura 15 - Células pluripotentes induzidas (iPSCs) geradas do paciente após três (P3) e quatro (P4) passagens. Aumento: 5x.	77
Figura 16 - Avaliação da positividade das iPSCs geradas do paciente para os marcadores de pluripotência SSEA4, Nanog, OCT3/4 e SOX2 (% Gated).	78
Figura 17 - Formação de corpos embrióides (EBs) a partir das iPSCs geradas do paciente. (A) iPSCs antes da indução (D-1); (B) EBs (D0). Aumento: 5x.	79
Figura 18 - Expressão de marcadores de pluripotência (OCT4, KLF4, MYC e SOX2), de endoderme (AFP e GATA4), mesoderme (RUNX1 e CD34) e ectoderme (NCAM e NES). H1: linhagem de célula-tronco embrionária humana; Paciente: iPSCs geradas do paciente; D0: dia 0 da indução dos EBs; D15: dia 15 de indução dos EBs.....	79
Figura 19 - Etapa de 4 dias de formação de corpos embrioides do protocolo (EBs) de diferenciação neural. Imagens representativas de cada dia (D). Aumento: 5x.	81
Figura 20 - Experimento piloto de diferenciação neural. EBs, corpos embrioides; Dif. Neuroep., diferenciação neuroepitelial; Dif. Neural, diferenciação neural. Imagens A-J: Aumento 5x; imagens K-P: Aumento 20x.....	82
Figura 21 - Rosetas neurais identificadas na cultura do indivíduo controle (A e B) e em detalhe indicadas pelas setas brancas (B), enquanto a cultura do paciente permanecia com características indiferenciadas (C e D). Aumento: 5x (A e C) e 20x (B e D).	83
Figura 22 - Aspecto das iPSCs em cultura após diferenciação neural. A e B: iPSCs do indivíduo controle, com estruturas semelhantes a neuritos e área celular pequena. C e D: iPSCs do paciente,	

mostrando menor quantidade de projeções semelhantes a neuritos, uma grande área celular e maior número de células. Aumento: 20x. 84

Figura 23 - Análise quantitativa das iPSCs do paciente e do indivíduo controle no D35 de diferenciação neural. (A) número de células, $p < 0.0001$; (B) da área celular, $p < 0.0001$; e da expressão de: (C) OCT4, $p < 0.0001$; (D) SOX2, $p = 0.0063$; e (E) Nestina, $p = 0.0028$ 85

Figura 24 - Análise quantitativa das iPSCs do paciente e do indivíduo controle no D53 de diferenciação neural. (A) número de células, $p < 0.0001$; (B) da área celular, $p = 0.0015$; e da expressão de: (C) OCT4, $p = 0.3621$; (D) SOX2, $p < 0.0001$; e (E) Nestina, $p = 0.0018$ 86

Figura 25 - Níveis de expressão do RP11-1082A3.1 durante a diferenciação neural de linhagem de iPSC. D0, dia 0; D6, dia 6; D12, dia 12. 88

Figura 26 - Nível de expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 após transfusão das iPSCs com os gRNAs. Em preto (-), células não tratadas com doxíciclina - CRISPRi inativado; em cinza (+), células tratadas com doxíciclina - CRISPRi ativado. * p -valor = 0,0219. 89

Figura 27 - Níveis de expressão dos marcadores neurais Nestina, PAX6 e SOX1, além do marcador de pluripotência Pou5f1, após diferenciação neural com o knockdown do lncRNA RP11-1082A3.1. D0: Dia 0 da diferenciação; D12: Dia 12 da diferenciação; (-): células sem tratamento com doxíciclina, CRISPRi desativado; (+): células tratadas com doxíciclina, CRISPRi ativado. * $p = 0.0379$ 90

Figura 28 - Avaliação da capacidade proliferativa das iPSCs após superexpressão do RP11-1082A3.1. A superexpressão do lncRNA nas iPSCs do indivíduo controle (A) não afetou a proliferação nos tempos analisados (B). Por outro lado, a superexpressão do lncRNA nas iPSCs do paciente (C) induziu uma diminuição significativa (**** $p < 0,001$) da proliferação no tempo 168h (D). 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Janelas abertas de leitura identificadas na sequência do RP11-1082A3.1. ORF: Janela aberta de leitura (do inglês, Open Reading Frame); nt: nucleotídeos; aa: aminoácidos.	52
Tabela 2 - Proteínas parceiras de interação do lncRNA RP11-1082A3.1.....	55
Tabela 3 - Predição de interação entre o lncRNA RP11-1082A3.1 e miRNAs. Via KEGG: via do banco de dados Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (do inglês, <i>Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>); Categoria GO: categoria do projeto Ontologia Gênica (do inglês, <i>Gene Ontology</i>).	56
Tabela 4 - Predição de interação do RP11-1082A3.1 com outros RNAs, suas funções e doenças associadas.	59
Tabela 5 - Funções preditas para o lncRNA RP11-1082A3.1. FDR: <i>False Discovery Rate</i> ; GSEA_H: <i>Gene Set Enrichment Analysis, hallmark gene sets</i> ; GSEA_C2: <i>Gene Set Enrichment Analysis, curated gene sets</i> ; GO_BP: <i>Gene Ontology Biological Processes</i> ; GO_CC: <i>Gene Ontology Cellular Components</i>	65
Tabela 6 - Dados de RNA-seq utilizados para a identificação da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1. (*) Disponível no <i>Sequence Read Archive</i> (SRA) do NCBI.	67

SUMÁRIO

1	Introdução.....	18
1.1	RNAs longos não codificadores (lncRNAs)	18
1.2	LncRNAs e o desenvolvimento embrionário humano	21
1.3	LncRNAs no neurodesenvolvimento.....	22
1.4	LncRNAs e doenças do desenvolvimento neurológico.....	23
1.5	Células pluripotentes induzidas (iPSCs).....	24
1.6	O caso clínico	26
2	Hipótese	28
3	Objetivos	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	Materiais e métodos	30
4.1	Validação e verificação da expressão do RP11-1082A3.1	30
4.2	Análises <i>in silico</i>	31
4.3	Amostras	32
4.4	Extração de DNA	32
4.5	Análise de Hibridação Genômica baseada em microarranjos (aGH).....	32
4.6	Geração de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)	33
4.6.1	Separação de células mononucleares (MNCs)	33
4.6.2	Expansão dos eritroblastos e verificação de marcadores eritróides	33
4.6.3	Reprogramação dos eritroblastos	34
4.6.4	Cultivo e expansão das colônias de iPSCs	35
4.7	Caracterização das iPSCs	35
4.7.1	Avaliação morfológica	35
4.7.2	Avaliação de marcadores de pluripotência.....	35
4.7.3	Formação de corpos embrióides (EBs).....	36
4.7.3.1	Avaliação da expressão de marcadores dos 3 folhetos embrionários.....	36
4.8	Indução de diferenciação em células progenitoras neurais (NPCs) e neurônios	37
4.8.1	Avaliação de marcadores neurais por <i>High Content Screening</i> (HCS).....	38
4.8.2	Análise de expressão de marcadores neurais após diferenciação.....	39

4.9	<i>Knockdown da expressão do RP11-1082A3.1</i>	40
4.9.1	Desenho dos RNAs guias (gRNAs)	40
4.9.2	Clonagem em vetor de expressão	40
4.9.3	Produção lentiviral	42
4.9.4	Infecção das iPSCs	42
4.9.5	Avaliação da expressão de BFP e seleção de células positivas	42
4.9.6	Indução do sistema CRISPRi para avaliação do efeito dos gRNAs	43
4.9.7	Extração de RNA e reação de pré-amplificação	43
4.9.8	Avaliação da expressão do RP11-1082A3.1	44
4.10	Expressão de marcadores neurais após <i>knockdown</i> do RP11-1083A2.1	44
4.10.1	Diferenciação neural	44
4.10.2	Avaliação da expressão de marcadores neurais	44
4.11	Superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1	45
4.11.1	Transformação bacteriana e extração de DNA	45
4.11.2	Produção lentiviral	46
4.11.3	Infecção das iPSCs	47
4.12	Ensaio de proliferação celular	48
5	Resultados e discussão	49
5.1	Validação da expressão do RP11-1082A3.1	49
5.2	Análises <i>in silico</i>	51
5.2.1	Potencial codificador do lncRNA RP11-1082A3.1	51
5.2.2	Interação do RP11-1082A3.1 com proteínas	53
5.2.3	Interação do RP11-1082A3.1 com outros RNAs	56
5.2.4	Análise de conservação da sequência do RP11-1082A3.1	62
5.2.5	Predição de função	64
5.2.6	Verificação da expressão do RP11-1082A3.1 em dados públicos	67
5.2.7	Expressão do RP11-1082A3.1 em cérebro	72
5.3	Deteção da deleção na região 14q32.2	73
5.4	Geração das iPSCs do paciente	74
5.4.1	Avaliação de marcadores eritróides	74
5.4.2	Avaliação morfológica	76
5.4.3	Avaliação de marcadores de pluripotência	77

5.4.4	Formação de corpos embrióides	78
5.5	Diferenciação das iPSCs em células progenitoras neurais (NPCs) e neurônios.....	80
5.6	Expressão de marcadores neurais após <i>knockdown</i> do lncRNA RP11-1082A3.1...	88
5.7	Avaliação da proliferação das iPSCs do paciente após superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1	92
6	Conclusões.....	94
7	Referências.....	95
8	Anexos	110
8.1	Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética.....	110
8.2	Anexo B – Manuscrito aceito para publicação	111

1 Introdução

1.1 RNAs longos não codificadores (lncRNAs)

RNAs não codificadores (ncRNAs) constituem um grupo de moléculas regulatórias que tem atraído a atenção da comunidade científica nos últimos anos, principalmente após estudos do projeto ENCODE, que visava produzir um catálogo completo dos *loci* transcritos do genoma humano (THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2011). Desde então, diferentes espécies de RNAs têm sido identificadas e caracterizadas, dentre elas os RNAs longos não codificadores (lncRNAs), que compõem um conjunto bastante heterogêneo e numeroso de transcritos, que ultrapassa até mesmo a quantidade de genes codificadores de proteínas (DJEALI et al., 2012).

Os lncRNAs são definidos como transcritos que possuem mais de 200 nucleotídeos de extensão e tipicamente não possuem janelas abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) funcionais (FANG; FULLWOOD, 2016). Alguns pesquisadores acreditam, porém, que eles poderiam originar novas proteínas, uma vez que muitos se encontram associados a ribossomos (RUIZ-ORERA et al., 2014), mas esta função ainda precisa ser melhor explorada. Assim como os RNAs mensageiros (mRNAs), os lncRNAs apresentam *cap* 5', estrutura de éxons e íntrons, sofrem processamento e grande parte deles possui cauda poliA (FANG; FULLWOOD, 2016). Aqueles que não possuem cauda poliadenilada, devido a processamento alternativo, apresentam diferentes mecanismos de estabilização (ZHANG; YANG; CHEN, 2014).

Apesar de ser um grupo heterogêneo, existem características genômicas compartilhadas pelos lncRNAs como baixo número de éxons, baixa porcentagem de guaninas e citosinas (conteúdo GC), baixa abundância, alta especificidade de expressão e baixa conservação de sequência (ROLLAND et al., 2019), sendo esta última característica atribuída à sua rápida evolução (DIEDERICH, 2014). Tal fato, porém, não implica necessariamente em ausência de função, uma vez que a estrutura do RNA parece ser a principal unidade funcional e restrição evolutiva (JOHNSON et al., 2014).

Uma das formas mais usuais de classificação desses transcritos é com relação à sua posição referente aos genes codificadores de proteína, sendo essencialmente cinco categorias de lncRNAs: senso, antisenso, intrônico, bi-direcional e intergênico (YOUSSEFI et al., 2020). Os lncRNAs intergênicos, também chamados de LincRNAs, são aqueles que se encontram entre dois genes

codificadores de proteínas (Figura 1A), diferentemente dos lncRNAs intrônicos (Figura 1B), que, como o nome sugere, são transcritos a partir de um íntron de um gene codificador. Os lncRNAs senso e antisense podem ser agrupados em uma classe denominada “*overlapping*”, referente aos RNAs transcritos em sobreposição aos éxons de um gene codificador de proteínas, tanto parcial quanto integralmente (Figura 1C). Já os lncRNAs bi-direcionais são aqueles localizados a, pelo menos, 1 kb de distância do gene codificador de proteína, porém sendo transcrito na direção oposta (Figura 1D).

Figura 1 - Classificação dos lncRNAs em relação aos genes codificadores de proteínas. (A) lncRNA intergênico, localizado entre dois genes codificadores de proteína; (B) lncRNA intrônico, que é transcrito a partir da sequência intrônica de um gene codificador de proteína; (C) lncRNAs senso e antisense, a depender do sentido em que é transcrito em relação ao gene codificador; (D) lncRNA bi-direcional, localizado a pelo menos 1000 pb do gene codificador e transcrito na direção oposta. Fonte: modificado de (HOSSEINI et al., 2019).

Uma característica interessante dos lncRNAs é a sua versatilidade: eles são capazes de atuar por meio de variados mecanismos moleculares (WANG; CHANG, 2011). Seus mecanismos de ação podem ser classificados em arquétipos com base nos seus parceiros de interação e seus efeitos diretos, sendo eles: lncRNA-proteína; lncRNA-DNA; lncRNA-RNA; codificação de peptídeos a partir de ORFs curtas; e lncRNAs com ação catalítica (HU et al., 2018). A existência de domínios na estrutura secundária dos lncRNAs permite que eles atuem como andaimes moleculares, ligando

outras biomoléculas e exercendo assim a sua função. Este é o caso do MACC1-AS1, por exemplo, que atua como uma esponja de miRNAs envolvidos na repressão da proliferação em câncer de mama, efeito que é amplificado pela sua ligação concomitante com a proteína PTBP1, levando-o a atuar como um indutor de proliferação celular (ZHANG et al., 2019d). O lncRNA MEG3, por outro lado, é um exemplo de transcrito que é capaz de se ligar ao DNA através da formação de estruturas de tripla hélice com sequências ricas em GA e, assim, regular a função de genes da via TGF- β (MONDAL et al., 2015).

Os lncRNAs podem ser encontrados tanto no núcleo quanto no citoplasma celular (CABILI et al., 2015) e seus níveis de expressão são, geralmente, menores que os dos mRNAs (BHAT et al., 2016), sendo muitas vezes necessário uma abordagem a nível de células únicas para se conseguir detectar a sua expressão. O sequenciamento do transcriptoma de células únicas (*single cell* RNA-seq – scRNA-seq) é uma abordagem que vem sendo cada vez mais utilizada para a análise de lncRNAs. Dessa forma, tem-se revelado que os baixos níveis de expressão de muitos lncRNAs se devem a uma alta expressão específica desses transcritos em uma pequena população de células, que é diluída quando se avalia o transcriptoma de um tecido como um todo (LIU et al., 2016; WU et al., 2019).

Outra característica dos lncRNAs é a sua expressão altamente heterogênea, mesmo dentro de uma mesma população de células aparentemente idênticas (YUNUSOV et al., 2016). Em um trabalho com células B, por exemplo, foi observado que cada população possui a sua própria assinatura de lncRNAs que a distingue do tipo celular anterior. Portanto, eles são expressos de uma forma mais estágio-específica que os mRNAs (AGIRRE et al., 2019), o que também já foi identificado em células em diferentes estágios da espermatogênese murina (TROVERO et al., 2020). No cérebro de camundongos, os lncRNAs também apresentam um padrão de expressão restrito a determinadas regiões cerebrais durante o desenvolvimento embrionário, sendo essa expressão dinâmica para alguns deles, como é o caso do TUG1, que durante a fase embrionária E14.5 é expresso apenas no plexo coróide, enquanto que no cérebro adulto ele é encontrado no neocórtex (GOFF et al., 2015).

1.2 LncRNAs e o desenvolvimento embrionário humano

Os lncRNAs têm sido descritos em inúmeros processos biológicos importantes, inclusive durante a fase embrionária de diversos organismos. O desenvolvimento do embrião envolve uma ampla gama de ações coordenadas, incluindo proliferação, modelamento, definição de linhagem celular e diferenciação (GROTE et al., 2013), necessitando então de uma regulação extremamente refinada. Em camundongos, por exemplo, Marahrens et al. (1997) demonstraram que o lncRNA XIST era necessário para o mecanismo de compensação de dose do cromossomo X. Utilizando camundongos que possuíam XIST mutante, eles observaram que fêmeas com ausência do RNA funcional morriam ainda na primeira metade da gestação (MARAHRENS et al., 1997).

No início do desenvolvimento humano, os lncRNAs representam a classe de transcritos predominante durante e após a ativação gênica embrionária (BOUCKENHEIMER et al., 2016) e já existem muitos estudos na literatura a respeito do envolvimento dessas moléculas com células-tronco embrionárias humanas (hESCs). Xu e colaboradores (2016), por exemplo, verificaram que o lncRNA GAS5 é diretamente regulado por fatores de pluripotência e está envolvido com a autorrenovação das hESCs. O grupo também observou que os níveis de expressão do lncRNA aumentaram juntamente com a clivagem do embrião e, posteriormente, diminuíram diante de condições de diferenciação, demonstrando que sua expressão é variável durante o desenvolvimento (XU et al., 2016). Outro estudo verificou que o transcrito lncPRESS1 é regulado por p53 e controla uma rede gênica de promoção da pluripotência, cujos genes pertencem a assinaturas gênicas de hESCs, como MYC, CDH1 e TFAP2C (JAIN et al., 2016).

Outro lncRNA interessante é o HIPSTR, recentemente identificado no locus TFAP2A (YUNUSOV et al., 2016). No início do desenvolvimento do embrião, a expressão do RNA foi detectada apenas em um subconjunto de células e, em uma linhagem pluripotente, observou-se que HIPSTR foi capaz de induzir genes de expressão tecido-específica e de reprimir genes relacionados com metabolismo e desenvolvimento. Em outro estudo recente utilizando dados de scRNA-seq, foram obtidos perfis do transcriptoma de células embrionárias humanas, com os quais foi possível identificar mudanças significativas de expressão entre diferentes estágios do desenvolvimento. Além disso, também foi observado que os lncRNAs eram mais frequentemente expressos de forma temporal-específica que os genes codificadores de proteína (QIU et al., 2016).

1.3 LncRNAs no neurodesenvolvimento

O desenvolvimento cerebral humano se inicia na terceira semana gestacional, com a diferenciação das células progenitoras neurais, consistindo em um processo sujeito a contextos geneticamente organizados, mas ao mesmo tempo altamente dinâmicos (STILES; JERNIGAN, 2010). A indução neural é um evento crítico do desenvolvimento que ocorre durante a gastrulação, no qual as células neuroectodérmicas dão origem a todos os progenitores neurais regionais e, por fim, ao cérebro e à medula espinhal. Falhas durante esse processo podem levar a quadros de deficiência, incluindo complicações neurológicas e cognitivas (LI et al., 2017).

Nesse complexo contexto de regulação, o papel dos lncRNAs tem sido explorado cada vez mais intensamente, uma vez que muitos têm sido demonstrados como importantes reguladores de vias relacionadas com a proliferação e a diferenciação de células neurais. Em células progenitoras, os lncRNAs podem estabelecer um limiar para a expressão de genes específicos necessários para a diferenciação, além de poderem prevenir a transcrição de genes que levem a célula para destinos alternativos (PERRY; ULITSKY, 2016). Em estudo do desenvolvimento neural, por exemplo, Ramos et al. (2015) demonstraram que o RNA PNKY é capaz de regular a produção de neurônios a partir da interação com a proteína PTBP1, um regulador chave desse processo (RAMOS et al., 2015). O lncRNA FMR4, por sua vez, foi descrito como uma molécula que altera o estado da cromatina e, por consequência, a expressão de diversos genes, incluindo aqueles envolvidos no desenvolvimento neuronal. Além disso, FMR4 parece promover a proliferação das células precursoras neurais humanas (PESCHANSKY et al., 2016). Além disso, ensaios de *knockdown* de 4 lncRNAs em células-tronco neurais levaram à alteração da diferenciação celular, de neurônios para células gliais, demonstrando que eles estão envolvidos na determinação do destino celular (NG; JOHNSON; STANTON, 2012).

Outro bom exemplo é o lncRNA murino Tuna, cuja expressão é específica do sistema nervoso central (SNC) e que possui um ortólogo em humanos (LINC00617) que é ativamente expresso em células embrionárias H1 (LIN et al., 2014). Este transcrito está envolvido com a indução da proliferação celular, além de estar envolvido na indução da diferenciação neural, provavelmente atuando nas fases iniciais do comprometimento neural pela indução de marcadores de células progenitoras neurais, como Nestina, Sox1, Fgf4 e Zpf521 (LIN et al., 2014). Em camundongos, também foi demonstrado que o silenciamento simultâneo de duas variantes de *splicing* do lncRNA

C130071C03Riken, que se encontravam altamente expressas durante a diferenciação neural, levou a um aumento do atraso do desenvolvimento cerebral (ZHANG et al., 2019b).

1.4 LncRNAs e doenças do desenvolvimento neurológico

Doenças do desenvolvimento neural compõem um grande grupo de enfermidades nas quais o SNC é afetado, levando a alterações no modo como as informações motoras, sensoriais e cognitivas são adquiridas e processadas durante o desenvolvimento pós-natal (ARDHANAREESWARAN et al., 2017). Tais doenças se manifestam, tipicamente, durante a infância e antes da puberdade, apresentando um curso clínico estável, além de serem caracterizadas pelo início bem prematuro dos déficits cognitivos e de afetarem indivíduos do sexo masculino com maior frequência (THAPAR; COOPER; RUTTER, 2017). Por serem multifatoriais, as doenças do neurodesenvolvimento são altamente heterogêneas e não há característica clínica ou biológica específica que as diferencie de outras doenças neuropsiquiátricas (THAPAR; COOPER; RUTTER, 2017). Muitas dessas doenças estão associadas com defeitos na diferenciação neural e formação de circuitos, cujas etapas críticas envolvem projeção axonal e arborização dendrítica, além da formação, manutenção e eliminação de sinapses (HSUEH, 2019).

Grande parte dos genes conhecidos como causadores de doenças do neurodesenvolvimento pertencem a poucas vias moleculares que se encontram comumente afetadas (PARENTI et al., 2020). Sendo então um grupo bastante heterogêneo, é preciso considerar também a rede regulatória envolvida no desenvolvimento dessas doenças, como os lncRNAs, uma vez que já tem sido demonstrado que eles estão envolvidos na regulação de importantes processos ligados à neurogênese. De fato, diversos lncRNAs já foram descritos em doenças que afetam o desenvolvimento neuronal. Wang e cols. (2015), em estudo de expressão diferencial, encontraram 19 lncRNAs associados com o transtorno do espectro autista (ASD), sugerindo que a desregulação de lncRNAs em loci causadores de ASD representa uma nova categoria de mecanismos epigenéticos envolvidos nessa síndrome (WANG et al., 2015). Na síndrome do X frágil – uma desordem genética ligada ao cromossomo X e que leva à deficiência intelectual e distúrbios – foram encontrados dois novos transcritos potencialmente úteis como biomarcadores. Um deles, o FMR6, está possivelmente envolvido na regulação da estabilidade, na localização celular e no *splicing* do mRNA FMR1, cujo gene, quando silenciado, perturba as funções normais do sistema

nervoso (PASTORI et al., 2014). Já Buiting e cols. (2007), identificaram um novo transcrito, PWRN1, que possui expressão bialélica em testículo e rim, e monoalélica em cérebro fetal. De forma semelhante, o C15orf2, um gene testículo-específico, também se encontrava expresso no cérebro fetal de forma monoalélica, o que poderia indicar um papel de ambos os genes na síndrome de Prader-Willi (PWS), que possui hipogonadismo, obesidade no início da infância e deficiência intelectual moderada dentro do seu espectro fenotípico (BUITING et al., 2007).

Recentemente, Ang e cols. (2019) demonstraram que a superexpressão do lncRNA lnc-Nr2f1 levou a um aumento significativo no comprimento dos neuritos, além de aumentar a expressão de genes envolvidos na orientação do axônio e na projeção neuronal (ANG et al., 2019). No sentido inverso, o *knockout* do lnc-Nr2f1 levou à diminuição da expressão de genes relacionados com a especificação de linhagem neuronal e orientação do axônio, assim como de genes envolvidos com o transtorno do espectro autista (ANG et al., 2019).

1.5 Células pluripotentes induzidas (iPSCs)

O estudo do desenvolvimento embrionário humano, especialmente do neurodesenvolvimento, encontra muitas barreiras, tanto éticas quanto em relação à disponibilidade de amostras biológicas, as quais frequentemente são de difícil obtenção. Desta forma, a utilização de um sistema baseado na reprogramação de células adultas em células pluripotentes se mostra como uma alternativa valiosa para o estudo tanto do desenvolvimento saudável do embrião quanto de doenças relacionadas a alterações nesse processo.

Em 2006, Takahashi e Yamanaka demonstraram que fibroblastos adultos de camundongos poderiam ser utilizados para induzir células tronco pluripotentes, a partir da introdução de quatro fatores de pluripotência: Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Tais células possuem habilidade proliferativa e de diferenciação em tipos celulares provenientes das três camadas germinativas (endo, meso e ectoderme), já sendo possível obtê-las de diversas fontes como sangue, pele e urina (LIU et al., 2020). Elas possuem um alto potencial terapêutico dentro da medicina personalizada, com a vantagem de ultrapassarem os desafios éticos e imunogênicos apresentados pelas células tronco embrionárias (hESCs) (LIU et al., 2020).

Doenças do neurodesenvolvimento são difíceis de serem estudadas em modelos murinos, apesar de valiosos para o esclarecimento de muitos aspectos comportamentais e fisiopatológicos, pois eles possuem limitações de complexidade, devido a diferenças na velocidade de desenvolvimento cerebral, quantidade e densidade neurais. Tecidos *post-mortem*, por sua vez, permitem apenas uma visão pontual, que traz pouca elucidação a respeito do processo de desenvolvimento do SNC no período pré-natal (ARDHANAREESWARAN et al., 2017). Assim, as iPSCs, tanto derivadas de pacientes quanto editadas geneticamente, oferecem então uma fonte valiosa de modelagem de doenças neurais para avaliação de fenótipos celulares, a fim de identificar vias moleculares envolvidas em doenças (MCKINNEY, 2017). Elas permitem a reprodução do início do desenvolvimento cerebral ao mesmo tempo que retêm a assinatura genética única de cada paciente, possibilitando desvendar os fatores genéticos e não genéticos que formam os circuitos neurais saudáveis e em quadros de doença (ARDHANAREESWARAN et al., 2017). Além disso, hiPSCs são modelos que estão em desenvolvimento ativo e expressam programas genéticos dinâmicos que regulam o processo de proliferação e diferenciação, refletindo os programas genéticos pré-natais, que não são acessíveis com amostras *post mortem*, já que o padrão expressão gênica após o nascimento muda drasticamente (ARDHANAREESWARAN et al., 2017).

É possível encontrar na literatura diversos exemplos da utilização das iPSCs como modelos *in vitro* de doenças que afetam o neurodesenvolvimento. Em 2010, Marchetto e cols. descreveram a geração de iPSCs de pacientes com a síndrome de Rett que possuíam diferentes mutações no gene MeCP2, gerando então um modelo humano dessa doença. Além de demonstrar que as iPSCs permaneciam capazes de gerar células progenitoras neurais (NPCs) proliferativas, eles observaram que as células dos pacientes, quando diferenciadas em neurônios, apresentavam um número reduzido de dendritos e sinapses (MARCHETTO et al., 2010). Mais recentemente, Adhya e cols. (2020) geraram iPSCs de 9 indivíduos com autismo, buscando compreender melhor as alterações precoces durante a vida pré-natal no contexto da doença. Eles observaram nesse estudo que as iPSCs dos pacientes, quando diferenciadas em neurônios corticais, apresentavam capacidade diminuída de se organizarem em rosetas neurais (ADHYA et al., 2020).

1.6 O caso clínico

Este trabalho foi inspirado por um caso atendido pelo serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), constituído por uma criança de 5 anos, do sexo masculino, filho de pais não consanguíneos. Ela é filha do segundo casamento da mãe, que já possuía 2 filhos do primeiro casamento, e cuja gravidez durou 39 semanas, sendo o parto cesáreo. O probando apresenta cariótipo normal e possui características clínicas que incluem obesidade, dificuldade motora e de aprendizado, alta estatura, macrocefalia, deficiência intelectual e hipogenitalismo, porém sem diagnóstico de uma síndrome genética. Desta forma, uma amostra de sangue do probando foi submetida a genotipagem por Hibridação Genômica baseada em *array* (aGH) em que foi detectada uma deleção cromossômica na região 14q32.2 com 106.388 pb de extensão (chr14:98,414,747-98,521,135) e que abrange o sítio genômico do lncRNA RP11-1082A3.1 (Figura 2).

Relatos de deleções no braço longo do cromossomo 14 não são encontradas frequentemente na literatura (SCHNEIDER et al., 2008). Apesar disso, sabe-se que pacientes com deleções 14q apresentam características clínicas em comum, como hipotonia, microcefalia, ponte nasal ampla e deficiência intelectual leve a moderada (SCHLADE-BARTUSIAK; ARDINGER; COX, 2009). Schneider et al. (2008) relataram 2 novos casos de deleção terminal na região 14q32, onde os pacientes apresentavam características semelhantes, como deficiência no desenvolvimento, hipotonia, dismorfismo facial e hipoplasia do corpo caloso (SCHNEIDER et al., 2008). Outro estudo, descreveu um caso clínico de uma criança que apresentava dismorfismos, atraso no desenvolvimento e um choro agudo fraco e que possuía uma deleção de aproximadamente 6 Mb na região 14q32.2-32.1, juntamente com uma duplicação no cromossomo 1 (YOUNGS; DASOUKI; BUTLER, 2012). Maurin e cols. (2006) relataram também o caso de uma criança com dismorfismo facial, atraso do crescimento, atraso psicomotor, entre outros fenótipos, associados com uma deleção terminal na região 14q32.33 (MAURIN et al., 2006).

Figura 2 - Resultado do aGH, com destaque para a microdeleção identificada no probando. Abaixo, a região genômica deletada no probando acessada pela base de dados UCSC Genome Browser, demonstrando a presença do locus do lncRNA RP11-1082A3.1, único gene encontrado na região até o momento.

A região 14q32.2 possui grupos de genes codificadores de proteína expressos paternalmente, e genes não codificadores expressos maternalmente. Além disso, essa região abrange duas regiões diferencialmente metiladas (DMRs), que funcionam como centros de controle na placenta e no corpo (KAGAMI et al., 2010). Microdeleções incluindo um ou ambos os centros de controle de *imprinting* já foram relatadas em síndromes como Kagami-Ogata, porém van der Werf e cols. (2016) sugeriram que o envolvimento das DMRs não é essencial para o desenvolvimento da doença, pois ainda que a família estudada exibisse deformidades torácicas e deficiência intelectual características, a deleção detectada não incluía nenhuma das duas regiões (VAN DER WERF et al., 2016).

2 Hipótese

Uma vez que o lncRNA RP11-1082A3.1 é o único gene encontrado na região deletada do probando, que apresenta um fenótipo de deficiência intelectual, e com base nas evidências da literatura sobre o envolvimento dessa classe de transcritos no desenvolvimento neural, a nossa hipótese é de que esse novo lncRNA atua durante o desenvolvimento embrionário, participando da diferenciação dos neurônios.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar se o lncRNA RP11-1082A3.1 está envolvido no processo de diferenciação celular do sistema nervoso central.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Validar a expressão testículo-específica do lncRNA RP11-1082A3.1;
- 3.2.2 Realizar análises *in silico* para investigar a função do lncRNA RP11-1082A3.1;
- 3.2.3 Gerar células pluripotentes induzidas do probando;
- 3.2.4 Avaliar a capacidade das iPSCs do probando de se diferenciarem em neurônios;
- 3.2.5 Avaliar o efeito da diminuição da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 na diferenciação neuronal de uma linhagem de iPSC;
- 3.2.6 Avaliar o efeito da superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1 na proliferação das iPSCs do probando.

4 Materiais e métodos

4.1 Validação e verificação da expressão do RP11-1082A3.1

Primeiramente, foi realizado o tratamento dos RNAs com DNase, cuja reação consistiu de 1 µg de RNA, 1 µl de RQ1 DNase 10x *Reaction Buffer* (Promega), 1 µl RQ1 *RNase-Free* DNase (Promega) e água para completar 10 µl. A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos em termociclador, adicionando-se em seguida 1 µl de RQ1 DNase *Stop Solution* (Promega) e seguindo-se de incubação a 65 °C por 10 minutos, também em termociclador. Após, o RNA tratado foi utilizado para sintetizar o DNA complementar (cDNA) com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), usando *primers* randômicos, de acordo com as instruções do fabricante.

A validação da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 em testículo e a verificação da sua expressão em outros tecidos normais provenientes do *Human Total RNA Master Panel II* (Clontech), assim como em linhagens tumorais, foi realizada, primeiramente, por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional utilizando um par de *primers* específicos (F: 5' GCAAGAAAGGAGAGGGAGAA 3'; R: 5' CCAGTGCTCTTTTGAGTACAG 3') (Figura 3). A reação, que consistiu de 12,5 µl de *JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix* (Sigma-Aldrich), 2 µl de *primers* 10 µM, 2 µl de cDNA e 8,5 µl de água, foi colocada em aparelho termociclador Veriti (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e por fim 72 °C por 5 minutos e 4 °C ∞. O produto do PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific) para visualização das bandas.

Figura 3 - Desenho esquemático da localização do par de primers utilizado para a reação de PCR convencional e o tamanho esperado do amplicon (264 pb). 1: primeiro éxon; 2: segundo éxon; 3: terceiro éxon.

Alternativamente, quando não foi possível observar bandas no gel de agarose, o produto de PCR foi submetido a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 12%, o qual posteriormente foi corado com nitrato de prata. Para confirmar a sequência amplificada, 100 ng da reação de PCR foi

utilizado para sequenciamento Sanger em aparelho ABI 3500 XL (Applied Biosystems) e cujo resultado foi analisado utilizando o programa FinchTV v1.4.0 1 (Geospiza).

Para a quantificação da expressão do lncRNA, foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Foi utilizada uma placa de 96 poços, sendo a reação por poço composta de: 5 µl de *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,4 µl de *primers* 10 µM, 0,6 µl de água livre de nucleases e 4 µl de cDNA. Foi utilizado o gene 18S como controle endógeno e cada amostra foi plaqueada em triplicata. As análises foram realizadas com o 7500 *Software* v2.3 (Applied Biosystems) e o programa *GraphPad Prism* 7.

4.2 Análises *in silico*

Foram realizadas análises *in silico* para investigar funções já descritas ou preditas do lncRNA, utilizando bases de dados *online* na busca por parceiros de interação, padrões de expressão e conservação. Para tal, foram usados os seguintes bancos de dados e ferramentas *online*: ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) para buscar segmentos do lncRNA com potencial codificador de proteína; NPInter v4.0 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/npinter4/>) para interação com proteínas; Rtools (<http://rtools.cbrc.jp/cgi-bin/RNARNA/index.pl>) para predição de interação com RNAs; o módulo de predição do DIANA-LncBase v.2 (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=lncbasev2%2Findex-predicted) para predição de interação com miRNAs e mirPath v.3 (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) para análise de vias KEGG e GO dos miRNAs preditos; Vista-Point (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2?selector=vistapoint>) para análise de conservação; FuncPred (<http://www.funcpred.com/>) para predição de função; Uniprot (<https://www.uniprot.org>) para acessar funções e localização subcelular das proteínas que interagem com o RP11-1082A3.1; OMIM (<https://www.omim.org/>) e GeneCards (<https://www.genecards.org/>) para acessar informações a respeito dos RNAs preditos de interagir com o lncRNA; e Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) para buscar a expressão do lncRNA em tecidos humanos.

Além disso, foram utilizados dados brutos de RNA-seq disponíveis na plataforma *Gene Expression Omnibus* (GEO) para obter dados de expressão do RP11-1082A3.1. Esses dados foram processados no ambiente estatístico R, utilizando as ferramentas FastQC para analisar a qualidade

das *reads* e as ferramentas Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/>) e Salmon (<https://combine-lab.github.io/salmon/>) para a quantificação dos transcritos.

4.3 Amostras

Para geração de células pluripotentes induzidas (iPSCs) e extração de DNA, foram coletados 15 ml de sangue periférico do probando e de cada membro da sua família (mãe, pai e avó paterna) no momento da consulta médica, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Além da família, também foi coletada a mesma quantidade de sangue de um indivíduo saudável como amostra controle. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (processo HCRP n°11885/2018).

4.4 Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue periférico do paciente e de membros da sua (mãe, pai e avó) para posterior análise por Hibridação Genômica Comparativa baseada em microarranjos (a-CGH) de seus pais e sequenciamento do exoma de todos os indivíduos (não foi realizada extração da amostra do paciente, pois o material já se encontrava disponível no banco de DNA do laboratório). Para tal, as amostras de sangue foram coletadas em um tubo roxo e a extração foi realizada com o kit *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação dos DNAs foi realizada em aparelho *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific) e as amostras foram estocadas a -20 °C.

4.5 Análise de Hibridação Genômica baseada em microarranjos (aGH)

A identificação de aberrações cromossômicas no paciente foi realizada em 200 ng de DNA na rotina de diagnóstico do Centro de Medicina Genômica (CMG) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com a plataforma *Affymetrix Human SNP Array*, utilizando o *Cytoscan HD Array Kit* (Affymetrix), de acordo com as instruções do fabricante. Os chips foram lavados na estação fluídica e escaneados no GeneChip Scanner 3700 (Affymetrix). Os dados foram analisados com o *Chromosome Analysis Suite v3.3.0* (Affymetrix). A análise dos pais do paciente foi realizada utilizando a mesma metodologia.

4.6 Geração de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)

4.6.1 Separação de células mononucleares (MNCs)

Primeiramente, os 15 ml de sangue periférico foram diluídos com 35 ml de uma solução de PBS 1X contendo 10% de anticoagulante citrato ácido dextrose (10% ACD) a T. A. Em seguida, essa solução foi adicionada cuidadosamente sobre 30 ml de *Ficoll® Paque Plus* (GE Healthcare), distribuídos em dois tubos de 50 ml. Os tubos foram centrifugados a 700 g por 30 min e então realizada a coleta do anel de MNCs, transferindo-o para um novo tubo de 50 ml e fazendo uma lavagem com PBS 1X + 10% ACD, completando o volume para 30 ml. A solução foi centrifugada a 250 g por 10 min, descartado o sobrenadante e adicionado 5 ml de tampão de lise (bicarbonato de amônio 0.01 M, cloreto de amônio 1.44 M) gelado, realizando a ressuspensão das células cuidadosamente. A suspensão foi incubada em T. A. por 10 min e adicionou-se 45 ml de PBS 1X + 10% ACD, invertendo-se o tubo 2 vezes para homogeneizar. Em seguida, os seguintes passos foram realizados duas vezes: centrifugação dos tubos a 400 g por 15 min a 4 °C, descarte do sobrenadante, adição de 25 ml de PBS 1X + 10% ACD para ressuspender suavemente as células, centrifugação dos tubos a 400 g por 15 min a 4 °C e descarte do sobrenadante. Por fim, as células foram ressuspensas com soro fetal bovino (SFB) com 10% dimetilsulfóxido (DMSO) para congelamento.

4.6.2 Expansão dos eritroblastos e verificação de marcadores eritróides

As MNCs do probando e do indivíduo controle foram descongeladas em soro fetal bovino (SFB), seguindo-se de centrifugação a 300 g por 5 minutos e contagem utilizando o aparelho *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific). As células foram ressuspensas na concentração de 2×10^6 células/ml em meio *StemSpan SFEM II* (StemCell Technologies) contendo 40 ng/mL de IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), 100 ng/mL de SCF (*Stem Cell Factor*), 10 ng/mL de IL-3 (*Interleukin-3*) (R&D Systems), 2 U/mL de EPO (Eritropoetina) e 1 μ M/mL de Dexametasona. A troca do meio foi feita a cada 3 dias, por um período de 9 dias, mantendo-se a concentração inicial de células nas 2 primeiras trocas de meio e diminuindo para 1×10^6 células/ml no último dia. No décimo dia, após a separação das células para reprogramação, as células foram repicadas para para avaliação no dia seguinte de marcadores de eritroblastos por citometria de fluxo. As células foram transferidas do poço para um tubo de 15 ml, lavando o poço em seguida com 1 ml de tampão de FACS (PBS 1% BSA) para coleta das células remanescentes, adicionando-se o conteúdo ao mesmo tubo. O volume do tubo foi completado para 8 ml com tampão de FACS

e 2 ml dessa suspensão foram distribuídos para cada tubo de citometria previamente identificado. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante por inversão em seguida e sendo adicionados os respectivos anticorpos a cada tubo (anticorpos utilizados: anti-CD71, CD235, CD36, CD117, 7AAD e IgG), incubando-os no gelo e no escuro por 15 minutos. Após a incubação, cada tubo foi lavado com 2 ml de tampão de FACS e centrifugado a 1800 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante por inversão. O *pellet* foi ressuspensionado com 200 µl de tampão de FACS e a leitura por citometria foi feita em aparelho FACSCalibur (BD).

4.6.3 Reprogramação dos eritroblastos

No décimo dia de expansão, as células do poço foram ressuspensas suavemente e 10 µl desta suspensão foi utilizado para contagem com o aparelho *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific). De cada poço, o volume correspondente a 2×10^6 células foi transferido para um tubo de 15 ml, adicionando-se ao tubo 10 ml de dPBS 7,5% BSA e seguindo-se com centrifugação a 200 g por 5 minutos a 4 °C. Durante a centrifugação, foi preparado o *mix* para nucleoporação, composto de 82 µl de solução Nucleofector e 18 µl de suplemento, ambos provenientes do kit *Human CD34 Cell Nucleofector* (Lonza), em um tubo de 1,5 mL e mantido à temperatura ambiente (T. A.). Dessa solução, foram utilizados 100 µl para homogeneizar o *pellet* de células, que foi então transferido para um tubo de 1,5 ml contendo os seguintes plasmídeos episomais: 2,1 µg de pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, 2,1 µg de pCE-hUL, 2,1 µg de pCE-mp53DD e 1,6 µg de pCXB-EBNA1. Após homogeneização, o conteúdo total do tubo foi transferido para a cubeta de eletroporação proporcionada pelo kit e a nucleoporação foi realizada no aparelho *Amxa Nucleofector 2b* (Lonza). Em seguida, as células nucleoporadas foram transferidas para um poço de placa de 12 poços, contendo meio de expansão de eritroblastos com bFGF (50 ng/µl) e dexametasona, e a placa foi colocada em incubadora de hipóxia (5% O₂). No terceiro dia após a nucleoporação, as células foram lavadas com meio de eritroblastos, com subsequente ressuspensão do *pellet* em meio DMEM *high glucose* contendo 10% SBF, 1% aminoácidos não essenciais (NEAA) e 1% penicilina-streptomicina. Em seguida, o volume total foi dividido para 2 poços de placa de 12 poços contendo fibroblastos embrionários murinos (MEFs) irradiados, sendo a placa centrifugada a 200 g por 30 minutos a 37 °C e depois colocada na incubadora de CO₂. No quarto dia, o meio de cultura de MEFs foi substituído por meio DMEM F12 suplementado com 0,25 mM de butirato de sódio (NaB) e bFGF (20 ng/µl). A partir do oitavo dia, o meio F12 foi trocado por

meio condicionado, que consistiu de meio DMEM F12 (39,25 ml de DMEM F12, 10 ml de KSR, 500 µl de NEAA, 250 µl de L-Glutamina e 0,35 µl de 2-Mercaptoetanol) coletado da cultura de MEFs e filtrado. A partir desse dia, o meio foi trocado em dias alternados até o surgimento das colônias, momento a partir do qual o meio passou a ser trocado diariamente até o primeiro repique.

4.6.4 Cultivo e expansão das colônias de iPSCs

Em uma capela de fluxo laminar horizontal contendo um microscópio invertido, foi feito manualmente o isolamento das colônias de iPSCs. Com o auxílio de uma ponteira estéril, os clones foram fragmentados e transferidos separadamente para placas de 24 poços cobertos com Geltrex (Thermo Fisher Scientific), onde foram cultivados em meio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) para sua expansão. Após 6 dias, as colônias obtidas de cada clone foram repicadas manualmente e cultivadas em placas de 12 poços. Após 4 dias de expansão, as colônias de cada clone foram repicadas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético 0.5 M (EDTA) com NaCl (500 µl de EDTA 0.5 M, 0,9 g de NaCl e PBS 1x para completar o volume para 500 ml) e cultivadas em placas de 6 poços. Para o congelamento das colônias foi utilizada uma solução de SFB contendo 10% DMSO.

4.7 Caracterização das iPSCs

4.7.1 Avaliação morfológica

A avaliação morfológica das células reprogramadas foi realizada por microscopia de contraste de fase, utilizando um microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus). As células foram fotografadas com a câmera digital *AxioCam MRC* (Carl Zeiss) acoplada ao microscópio *MicroImaging GMBH 81* (Carl Zeiss).

4.7.2 Avaliação de marcadores de pluripotência

A avaliação da porcentagem de células positivas para marcadores de pluripotência foi realizada por citometria de fluxo. Para isso, cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1x e adicionado a elas 1 ml de *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Gibco), deixando-as por 6 minutos em incubadora de CO₂ a 37 °C. As células foram ressuspensas com uma micropipeta de 1 ml para individualizá-las e transferidas para um tubo de 15 ml, sendo lavado o poço em seguida com PBS 1x para coletar as células remanescentes e transferida a suspensão para o mesmo tubo. O volume do tubo foi completado para 10 ml com PBS 1x, e 10 µl desta suspensão foi utilizado para

contagem das células em aparelho *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific). Após centrifugação dos tubos a 200 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1 ml de PBS 1x, sendo o volume distribuído para os tubos de citometria previamente identificados. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 3 minutos, sendo descartado o sobrenadante por inversão e adicionados os respectivos anticorpos a cada tubo (anticorpos utilizados: anti-SSEA4, NANOG, OCT3/4, SOX4 e IgG), deixando-os no gelo e no escuro por 15 minutos. Após a incubação, cada tubo foi lavado com 2 ml de tampão de FACS e centrifugado a 1800 rpm por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante por inversão em seguida. O *pellet* foi ressuspensado com 200 µl de tampão de FACS e levado para leitura em aparelho FACSCalibur (BD).

4.7.3 Formação de corpos embrióides (EBs)

O ensaio de formação de EBs foi realizado com o objetivo de demonstrar a capacidade das células reprogramadas de se diferenciarem nos 3 folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme). Para isso, foram utilizadas iPSCs cultivadas em uma placa de 6 poços com uma confluência de aproximadamente 70%. No dia zero (D0), o meio foi trocado e a ele foi adicionado 1 µl/ml de *ROCK inhibitor* Y-27632 (STEMCELL), sendo a placa incubada em estufa de CO₂ por 1 hora. Após esse tempo, uma solução de EDTA 0.5 M com NaCl foi utilizada para destacar as colônias em grandes fragmentos, que foram então transferidos na proporção de 2:1 para poços de uma placa de 6 poços de baixa adesão contendo 2,5 mg/ml de álcool polivinílico (PVA) diluído em meio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies). No dia 2 (D2), o meio foi trocado por meio E6 (Gibco) e daí por diante a troca foi realizada a cada 3 dias até o D16. Em seguida, os EBs foram coletados por centrifugação a 300 g por 5 minutos, aspirado o sobrenadante e armazenado o *pellet* em -80 °C até a extração de RNA, que foi realizada com o *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.3.1 Avaliação da expressão de marcadores dos 3 folhetos embrionários

A verificação da expressão de marcadores dos folhetos embrionários foi realizada por RT-qPCR em aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Foi utilizada uma placa de 96 poços, sendo a reação por poço composta de: 5 µl de *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,4 µl de *primers* 10 µM, 2,6 µl de água livre de nucleases e 2 µl de cDNA diluído (1:10). Foi utilizado o gene 18S como controle endógeno e *primers* específicos para genes

sabidamente expressos em cada um dos folhetos, sendo eles: AFP e GATA4 (endoderme); RUNX1 e CD34 (mesoderme); NCAM e NES (ectoderme); além dos genes de pluripotência OCT4, KLF4, MYC e SOX2. Cada amostra foi plaqueada em triplicata. As análises foram feitas com o 7500 *Software* v2.3 (Applied Biosystems) e o programa *GraphPad Prism* 7.

4.8 Indução de diferenciação em células progenitoras neurais (NPCs) e neurônios

A diferenciação das iPSCs geradas do probando e do indivíduo controle foi induzida como descrito no protocolo de Li e Zhang (LI; ZHANG, 2006). Primeiramente, as iPSCs foram descongeladas e cultivadas em meio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) em placas de 6 poços cobertas com Geltrex (Thermo Fisher Scientific) até atingirem a mesma passagem. Em seguida, foram gerados corpos embrioides (EBs) como já descrito no item 4.6.2, os quais foram mantidos em cultura por 4 dias.

No quarto dia de formação dos EBs, foi iniciada a diferenciação neuroepitelial das células a partir da adesão dos EBs à placa de cultura. Para isso, os EBs de cada poço foram coletados e transferidos para um tubo de 15 ml, sendo centrifugados a 50 g por 2 min a T. A. Após aspiração e descarte do sobrenadante com uma pipeta de 5 ml, os EBs foram lavados com 1 ml de meio de indução neural (IN), composto de 48,9 ml de DMEM/F12 (Gibco), 500 µl de MEM *Non-Essential Amino Acids Solution* (100X) (Gibco), 500 µl de N-2 *Supplement* (100X) (Gibco) e 100 µl de 1 mg/ml heparina sódica (Sigma-Aldrich). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os EBs ressuspensos em 600 µl de meio IN com 10 ng/ml bFGF. Dessa suspensão, foram utilizados 200 µl para adicionar a um poço de placa de 6 poços coberto com Geltrex (Thermo Fisher Scientific) contendo 1,5 ml de meio IN com 10 ng/ml bFGF. As placas foram incubadas na estufa de CO₂ e assim que os EBs aderiram à matriz, o meio foi trocado em dias alternados.

No D12 da diferenciação neuroepitelial, foi realizado o isolamento das rosetas neurais. Inicialmente, o meio dos poços foi retirado e eles foram lavados com 2 ml de PBS 1x, adicionando-se em seguida 1 ml/poço de meio IN com dispase (concentração final: 0,5 mg/ml) e as placas mantidas em estufa de CO₂ por 30 min. Com uma pipeta de 10 ml, as células dos poços foram ressuspensas e transferidas para tubos de 15 ml para centrifugar a 50 g por 2 min a T. A. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 2 ml de meio IN/tubo e centrifugado novamente. Em seguida, após descarte do sobrenadante, foi adicionado a cada tubo 2 ml de meio IN com 10

ng/ml bFGF, transferindo-se o volume para 1 poço de uma placa de 6 poços sem Geltrex. Após incubar as placas em estufa de CO₂ por 2 horas, o sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para um novo poço de placa de 6 poços de baixa aderência para formação de esferas neuroepiteliais, realizando-se a troca de meio em dias alternados.

Após 12 dias de cultivo das esferas neuroepiteliais, foi iniciada a diferenciação neural das células. Desta forma, as esferas foram coletadas em um tubo de 15 ml e decantadas para retirar o sobrenadante e descartá-lo. As esferas foram lavadas com 1 ml de PBS 1x e, em seguida, foi adicionado 600 µl de *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Gibco), incubando-se os tubos por 4 min em banho seco a 37 °C – durante esse tempo, os tubos foram periodicamente agitados levemente para dissociação das células. Os tubos foram centrifugados a 300 g por 5 min a T. A. e os aglomerados de células ressuspensos em meio IN, distribuindo-se o volume para 3 poços de uma placa de 6 poços com Geltrex. Quando os poços atingiram a confluência, foi realizado o repique das células com EDTA 0.5 M com NaCl, incubando as placas a T. A. por 4 min. Com jatos de meio IN, as células foram destacadas dos poços e transferidas para tubos de 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas com 1 ml de meio IN e foi realizada a contagem em aparelho *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific), utilizando-se 10 µl da suspensão de células. Foram plaqueadas, então, 5 x 10⁴ células/poço de uma placa de 6 poços com Geltrex, mantendo as células em meio N2B27, composto de 49,2 ml de meio DMEM/F12 (Gibco), 250 µl de N-2 *Supplement* (100X) (Gibco), 500 µl B-27 *Supplement* (50X) (Gibco), 50 µl de penicilina/streptomicina e 20 ng/ml bFGF. A troca do meio foi feita dia sim, dia não.

4.8.1 Avaliação de marcadores neurais por *High Content Screening* (HCS)

O HCS é um método de microscopia de alto rendimento, que tem como principal objetivo utilizar imagens de células para produzir perfis multidimensionais que permitem identificar fenótipos aberrantes (MATTAZZI USAJ et al., 2016). Foram utilizados poços cobertos com Geltrex (Thermo Fisher Scientific) de uma placa preta de fundo chato de 96 poços para plaquear 8 x 10³ células/poço, as quais foram mantidas em cultura com 100 µl de meio IN ou meio N2B27 até atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, momento em que foi realizada a fixação das células. Para fixá-las, foi retirado o meio de cultura dos poços e eles foram lavados 2 vezes com PBS 1x, prosseguindo-se com a adição da solução de fixação, composta de metanol 2% em formol.

A placa foi incubada por 20 min a -20 °C e os poços lavados 2 vezes com PBS 1x. Foram então adicionados 100 µl de PBS 1x em cada poço e a placa foi estocada a 4 °C até o momento da marcação.

Para a marcação das células, primeiramente elas foram incubadas com glicina 0,1 M por 15 min a T. A. e depois com uma solução de bloqueio (soro/PBS) por 30 min a T. A. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário em solução de bloqueio *overnight*, realizando-se então 3 lavagens com PBS 1x e a incubação com o anticorpo secundário por 45 min a T. A. Cada anticorpo foi utilizado em triplicata, sendo eles: SOX2, Nestina e OCT4. A aquisição das imagens foi realizada utilizando a plataforma *ImageXpress High Content Screening* (Molecular Devices), sendo tiradas fotos de 9 campos por poço no aumento de 10x. O processamento das imagens e quantificações foram realizadas com o programa *Cell Profiler* (<https://cellprofiler.org/>) e as análises estatísticas foram feitas com o *GraphPad Prism 7*.

4.8.2 Análise de expressão de marcadores neurais após diferenciação

Além da análise por HCS, foi extraído RNA das células em estágio de NPCs e de neurônios para a análise de expressão de marcadores neurais por RT-qPCR. Foram utilizados os kits *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) ou *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen) para a extração de RNA, sendo realizada a quantificação em aparelho *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado 1 µg de RNA para fazer o tratamento com DNase, que consistiu em adicionar, para cada µg de RNA, 1 µl de RQ1 10X *Buffer* (Promega), 1µl de RQ1 DNase (Promega) e água livre de nucleases para completar 8 µl. Em seguida, essa solução foi incubada por 30 min a 37 °C, tempo após o qual foi adicionado 1 µl de *Stop Solution* (Promega) e realizada uma nova incubação por 10 min a 65 °C. O RNA tratado foi utilizado, então, para a síntese de cDNA com o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) com *primers* randômicos, de acordo com instruções do fabricante.

O cDNA foi diluído 5 vezes para a reação de RT-qPCR, que consistiu, por poço, de 5 µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,2 µl de *forward primer* 10 mM, 0,2 µl de *reverse primer* 10 mM, 2 µl de cDNA (1:5) e água livre de nucleases para completar 10 µl. Foi avaliada a expressão dos genes PAX6, SOX1, SOX2, Nestina e OCT4, utilizando o GAPDH como controle endógeno. A reação foi realizada em aparelho *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied biosystems) e as análises estatísticas foram feitas com os programas Excel e *GraphPad Prism 7*.

4.9 Knockdown da expressão do RP11-1082A3.1

O ensaio de *knockdown* da expressão do lncRNA foi realizado com a técnica de interferência por CRISPR (CRISPRi), que visa a regulação da transcrição sem alterar a sequência de DNA. Esta plataforma se baseia na utilização de uma enzima Cas9 cataliticamente inativa (dCas9) que, juntamente com um repressor transcricional (como KRAB, por exemplo), impede o início ou a continuação da transcrição (LARSON et al., 2013).

4.9.1 Desenho dos RNAs guias (gRNAs)

Utilizando a ferramenta CRISPR da plataforma Benchling (<https://benchling.com/>) foram selecionados 12 gRNAs para a sequência genômica que compreende 100 pb acima e abaixo do sítio de início da transcrição (TSS) do lncRNA RP11-1082A3.1, levando em consideração os maiores valores dos *scores on* e *off-target* possíveis para a região.

4.9.2 Clonagem em vetor de expressão

Previamente à clonagem, foi realizada a ligação das frações senso e antisenso dos gRNAs, para gerar sequências de fita dupla. A reação consistiu de 21 µl de água livre de DNase/RNase, 2 µl do oligo sense (50 µM), 2 µl do oligo antisenso (50 µM) e 25 µl de tampão de ligação 2x (200 mM acetato de potássio, 60 mM HEPES-KOH pH 7.4, 4 mM acetato de magnésio). Ela foi incubada a 95 °C por 5 minutos e depois deixada na bancada para a temperatura baixar a T. A. A reação foi estocada a -20 °C *overnight* e em seguida foi feita a ligação de cada gRNA individualmente ao vetor lentiviral pSLQ1371 (Addgene), que expressa a proteína azul fluorescente (BFP) e gene de resistência à puromicina (Figura 4). Para tal, foi utilizado 10 ng do vetor linearizado, 1 µl do gRNA (diluído na proporção 1:40), 1 µl de tampão de ligase 10x, 1 µl de DNA ligase e água livre de DNase/RNase para completar 10 µl. A reação foi então incubada a T. A. por aproximadamente 3 horas.

Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pSLQ1371 utilizado para clonagem dos gRNAs.

Para a transformação bacteriana com os vetores de expressão, foi utilizado 20 µl de *NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)* para cada 1 µl dos produtos de ligação. A reação foi incubada em bloco de metal frio por 20 minutos e, em seguida, realizado o choque térmico das bactérias a 42 °C por 10 segundos, seguido de incubação no bloco gelado por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 180 µl de meio SOC (Takara) a cada tubo, os quais foram incubados a 37 °C por 1 hora. O conteúdo completo de cada tubo (aproximadamente 200 µl) foi transferido para uma placa de 100 mm de LB agar com ampicilina (Teknova), utilizando *beads* (EZ-Spread Plating Beads, Genlantis) para espalhar o conteúdo por toda a placa, que foi incubada em estufa a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram retiradas da estufa e incubadas em T. A. até o isolamento das colônias. Cada colônia foi isolada com uma ponteira de 20 µl e colocada dentro de um tubo de 15 ml, sendo adicionados em seguida 2 ml de meio LB com 1 µl/ml de ampicilina C. As colônias isoladas foram incubadas a 37 °C com agitação de 250 rpm *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a extração do DNA com o kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) e a quantificação do DNA extraído com o aparelho *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). Para conferir a inserção dos gRNAs no vetor de expressão, foi realizado o sequenciamento dos DNAs, cuja análise foi feita utilizando a opção “*alignments*” da plataforma Benchling.

4.9.3 Produção lentiviral

Para a produção dos lentivírus contendo os gRNAs, células da linhagem HEK 293T foram preparadas para transfecção, sendo plaqueadas na concentração de 2×10^5 por poço de uma placa de 24 poços. Primeiramente, para cada gRNA, foram misturados em um tubo de 1,5 ml (*mix* lentiviral): 270 ng do vetor de empacotamento pCMV-dR8.91, 33 ng do vetor de envelope viral pMD2-G e 270 ng do vetor lentiviral pSLQ1371 contendo o gRNA. Em um outro tubo de 1,5 ml (tubo B), foram adicionados 60 µl de meio DMEM (Sigma-Aldrich) não suplementado e 1,5 µl de *TransIT®-LTI Transfection Reagent* (Mirus), seguindo-se de incubação a T. A. por 5 minutos. Após esse tempo, 60 µl do tubo B foram transferidos a cada *mix* lentiviral, sendo incubados então a T. A. por 30 min. Em seguida, o meio das células HEK 293T foi trocado por novo DMEM suplementado, ao qual foi adicionado o *mix* lentiviral. Após 8-12 horas o meio das células foi trocado por DMEM não suplementado com adição de *ViralBoost Reagent* (500x) (ALSTEM, INC) na proporção de 1:500.

4.9.4 Infecção das iPSCs

O meio das células HEK 293T foi coletado 48 horas após a transfecção e filtrado com um filtro de 0,45 µm, sendo então utilizado para infectar iPSCs da linhagem CRISPRi indutível, que expressa a dCas9-KRAB. A suspensão de infecção foi plaqueada em poço de uma placa de 12 poços e foi composta por 2×10^5 iPSCs, 750 µl de meio *Essential 8 Flex* (Gibco), 250 µl de vírus, 1 µl de brometo de hexadimetrina (Sigma-Aldrich) e 1 µl de *ROCK inhibitor Y-27632* (STEMCELL). As células foram incubadas em estufa de CO₂, sendo realizada a troca de meio no dia seguinte e depois em dias alternados, até atingirem confluência.

4.9.5 Avaliação da expressão de BFP e seleção de células positivas

Quando as células atingiram a confluência, foi realizado o repique com *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Thermo Fisher Scientific). Uma porção da suspensão de células foi separada para avaliação da positividade para a proteína azul fluorescente (do inglês *blue fluorescent protein*, BFP) por citometria de fluxo em aparelho LSR II (BD Biosciences). Apenas os poços que apresentaram ao menos 4% das células positivas foram selecionados para prosseguir com a seleção com puromicina. O tratamento, então, consistiu na adição de puromicina ao meio de cultura em concentrações crescentes (1:1000, 1:500, 1:300) à medida que as células foram atingindo a confluência. Dessa forma, apenas as células que possuíam o vetor de expressão seriam capazes de

sobreviver e, com o passar do tempo, a população se tornaria pura. As células foram congeladas com 1 ml da solução de congelamento *STEM-CELLBANKER* (Amsbio LCC) em nitrogênio líquido para estoque.

4.9.6 Indução do sistema CRISPRi para avaliação do efeito dos gRNAs

Ao fim do tratamento com puromicina e no momento em que as células encontravam-se confluentes, foi realizado o repique das mesmas com *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Thermo Fisher Scientific), incubando-as por aproximadamente 10 minutos em estufa de CO₂. Em seguida as células foram ressuspensas com auxílio de uma pipeta de 1000 µl e transferidas para um tubo de 15 ml contendo PBS 1x. Foram utilizados 10 µl da suspensão de células para realizar a contagem no aparelho *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific), utilizando 10 µl de azul de tripan para a diluição e para acessar a viabilidade celular. Após centrifugar as células a 300 g por 3 minutos, o sobrenadante foi aspirado e o *pellet* ressuspendido em 1 ml de meio E8. Da suspensão de células, o volume correspondente a 1×10^5 células foi transferido para um poço de uma placa de 12 poços coberto com Matrigel, adicionando-se 1 ml de meio *Essential 8 Flex* (Gibco) com 1 µl/ml de *ROCK Inhibitor Y-27632* (STEMCELL). Para cada gRNA, foram plaqueados 4 poços, sendo uma duplicata sem o sistema CRISPRi induzido e a outra duplicata para a ativação do sistema CRISPRi, realizada com a adição de doxiciclina 1 µM ao meio de cultura na proporção de 1:1000. As células foram mantidas em tratamento por 5 dias, momento após o qual foi realizada a coleta das mesmas para a extração de RNA.

4.9.7 Extração de RNA e reação de pré-amplificação

A coleta das células foi realizada utilizando *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Gibco), centrifugando-as a 300 g por 3 min. O sobrenadante foi aspirado e 300 µl de *TRI Reagent* (Sigma) foi adicionado a cada *pellet*, estocando-os a -80 °C em seguida. A extração de RNA foi feita utilizando o *Direct-zol RNA MiniPrep kit* (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante, e a quantificação dos RNAs foi feita em aparelho *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foi utilizado o *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, e termociclador *C1000 Touch* (Bio-Rad). Para todas as reações de síntese foram utilizados *primers* randômicos e 2 a 5 µg de RNA. Em seguida, foi realizada uma reação de pré-amplificação de 3,5 µl do cDNA utilizando o *PreAmp Master Mix* (Fluidigm) e um par de *primers* específico para o lncRNA na concentração

de 500 nM cada um. As condições da pré-amplificação consistiram de 2 minutos a 95 °C e 10 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguidos de 4 minutos a 60 °C. Em seguida, foi realizado o tratamento da reação com Exonuclease I 20 U/μl (New England BioLabs), cujas condições consistiram de uma etapa de digestão a 37 °C por 30 minutos e uma etapa de inativação enzimática de 80 °C por 15 minutos. Por fim, a reação foi diluída 5 vezes com água livre de nucleases.

4.9.8 Avaliação da expressão do RP11-1082A3.1

A reação de pré-amplificação foi utilizada como amostra para quantificar a expressão do lncRNA por RT-qPCR. Para isso, foram utilizados primers específicos para o RP11-1082A3.1 (F: 5' GCAAGAAAGGAGAGGGAGAA 3'; R: 5' CTCTGCAGATCTAGATCTTCA) e para o gene RPLP0, utilizado como controle. Cada amostra foi plaqueada em triplicata. Por poço de uma placa de 384 poços, foram utilizados 4 μl de *SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 2 μl de *primers* 2 μM e 2 μl de cDNA pré-amplificado. A corrida foi realizada no aparelho *LightCycler 480* (Roche). Para análise dos valores de expressão, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.10 Expressão de marcadores neurais após *knockdown* do RP11-1083A2.1

4.10.1 Diferenciação neural

Após a identificação do gRNA que consistentemente diminuiu a expressão do lncRNA, foi realizado o experimento de diferenciação neural para avaliar a expressão de marcadores neurais após o *knockdown*. Para tanto, foram utilizadas as células que expressavam o gRNA em duas condições: sem e com tratamento com doxiciclina. Foram utilizadas 1×10^6 células por poço de uma placa de 12 poços, fazendo-se duplicatas por condição. No D0, as células foram plaqueadas e uma porção delas foi separada para extração de RNA, como já descrito anteriormente (item 4.9.7). As células foram mantidas em cultura por 12 dias, com meio de cultura *Essential 6 Medium* (Gibco) suplementado com 10 mM SB431542 (SB) e 100 nM LDN193189 (L), ambos na proporção 1:1000. No D12 as células foram coletadas para extração de RNA e síntese de cDNA, de acordo com método descrito no item 4.9.7.

4.10.2 Avaliação da expressão de marcadores neurais

Para avaliar a expressão de marcadores de diferenciação neural, foi realizada uma reação de pré amplificação, como descrito no item 4.9.7, seguida de um RT-qPCR com *primers*

específicos para o RP11-1082A3.1 e os marcadores neurais Nestina, PAX6 e SOX1, além do marcador de pluripotência Pou5f1. A reação, por poço de placa de 384 poços, consistiu de 4 µl de *SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 2 µl de *primers* 2 µM e 2 µl de cDNA pré-amplificado. A reação foi realizada no aparelho *LightCycler 480* (Roche). Para análise dos valores de expressão, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.11 Superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1

4.11.1 Transformação bacteriana e extração de DNA

A sequência de cDNA do lncRNA RP11-1082A3.1 foi obtida pelo processo de customização de sequência MiniGene (IDT). O lncRNA encontrava-se inserido em um plasmídeo de transferência com resistência a puromicina (pUCIDT-AMP), do qual foi utilizado 400 ng para a transformação de bactérias DH5α. Este processo foi realizado por choque térmico, que consistiu de incubação em gelo por 30 minutos, incubação por 1 minuto e 45 segundos a 42 °C em banho seco e incubação no gelo por 5 minutos. Em seguida, as bactérias transformadas foram transferidas para tubos de 15 ml contendo 950 µl de meio Luria Bertani (LB) líquido sem antibiótico, seguido-se de incubação a 37 °C e agitação de 250 rpm por 1 hora. Após esse tempo, o conteúdo dos tubos foi transferido para tubos de 1,5 ml e estes foram centrifugados por 1 minuto em microcentrífuga de bancada. Em seguida, 500 µl do sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado no volume restante, sendo utilizados 100 µl dessa suspensão para plaqueio em placa de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina. As placas foram então incubadas a 37 °C *overnight*.

No dia seguinte, foi realizado o isolamento das colônias utilizando ponteiras estéreis, que após serem enconstadas nas colônias, foram dispensadas cada uma em um tubo de 15 ml contendo 5 ml de meio LB líquido com ampicilina. Os tubos foram incubados a 37 °C e agitação de 250 rpm *overnight* para crescimento das bactérias. No dia seguinte foi realizada uma reação de mini-prep para extração de DNA. Para isso, os tubos foram centrifugados a 13.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A cada *pellet* foram adicionados 200 µl de Solução I (5% de glicose 1 M, 2,5% de Tris HCl 1 M pH 8 e 2% de EDTA 0.5 M pH 8), sendo ele homogeneizado e transferido para um tubo de 1,5 ml. Os tubos foram vortexados e incubados a T. A. por 5 minutos, sendo adicionados em seguida 200 µl de Solução II (4% NaOH 5 N e 10% de SDS 10% em água) e feita a homogeneização por inversão lenta. Após incubação em gelo por 5 minutos, foi adicionado

a cada tubo 200 µl de Solução III (147,25 g de acetato de potássio em 500 ml de água, pH 5.5), invertendo-se os tubos lentamente para homogeneizar e sendo realizada uma incubação em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm por 15-30 minutos, sendo os sobrenadantes transferidos para novos tubos de 1,5 ml. A cada um foram então adicionados 480 µl de isopropanol gelado e a homogeneização foi feita por inversão lenta. As amostras foram incubadas a T. A. por 10 minutos e centrifugadas a 13.500 rpm por 10 minutos, sendo os sobrenadantes descartados em seguida. A cada *pellet* foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado e eles foram centrifugados a 13.500 rpm por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos na banca para secagem. Cada *pellet* foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE contendo 5% de PureLink Rnase A (Invitrogen) e incubado a 37 °C por 10 minutos em banho seco. A quantificação do DNA extraído foi realizada em aparelho *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific).

A checagem dos clones positivos foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos para o lncRNA RP11-1082A3.1 (os mesmos do item 4.1) e também por digestão com 2 enzimas de restrição específicas para excisão da sequência do lncRNA. Após a conferência, 100 ng foram encaminhados para sequenciamento Sanger. Após confirmação das sequências, 100 ng de DNA foram utilizados para nova transformação bacteriana, como descrito anteriormente. Para a fase de crescimento, as colônias foram adicionadas a 250 ml de meio LB líquido com ampicilina e incubadas a 37 °C e agitação de 250 rpm *overnight*. Após centrifugação, foi realizada a extração de DNA por midi-prep, utilizando o *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. A confirmação dos clones positivos foi realizada por PCR com *primers* específicos para o lncRNA RP11-1082A3.1.

4.11.2 Produção lentiviral

Primeiramente, foi realizada a ligação da sequência do lncRNA RP11-1082A3.1 ao vetor de expressão lentiviral pLJM1 (Addgene). Para tal, foi feita a linearização do vetor lentiviral e do plasmídeo contendo o lncRNA com as enzimas de restrição NheI-HF e EcoRI (NEB), sendo as reações incubadas a 37 °C por 2 horas. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose e as bandas correspondentes ao vetor linearizado e ao inserto foram purificadas com o *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A ligação do inserto ao pLJM1 foi feita utilizando 50 ng do plasmídeo, 275 ng do inserto, 1 µl de T4 Ligase DNA (NEB), 2 µl de 10x *Buffer for T4*

(NEB) e água para completar 20 µl. A reação foi incubada a 16 °C *overnight* e dela foram utilizados 7 µl para transformar bactérias, como descrito no item 4.11.1.

Para a produção viral, foram utilizadas células HEK293T plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço de placas de 6 poços e em meio DMEM com 10% de SFB. No dia seguinte, o meio das células foi trocado e a um tubo foram adicionados meio incompleto para completar 700 µl, os plamídeos empacotadores (1750 ng de pM2G e 8750 ng de pSPAX), o plamídeo de interesse (8750 ng de pLJM1 – vazio ou com o inserto) e 57,75 µl de polietilenimina (PEI). A solução foi vortexada por 10 segundos e incubada a T. A. por 15 minutos. Dela, foram utilizados 100 µl para gotear em cada poço de HEK293T. As placas foram centrifugadas a 1000 g por 30 minutos a T. A. e, em seguida, incubadas na estufa de CO₂. No dia seguinte (D3), o meio das placas foi trocado por 3 ml de DMEM sem soro. Nos dias D4 e D5, o meio dos poços contendo os vírus, foi coletado em um tubo de 50 ml, sendo posteriormente filtrado com filtro de seringa de 0.45 µm, aliquoteado 500 µl em tubos de 1,5 ml estéreis e estocados a -80 °C.

4.11.3 Infecção das iPSCs

As iPSCs do paciente e do indivíduo controle foram repicadas com *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Gibco) e 2×10^5 células foram utilizadas para serem infectadas. Elas foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado com 500 µl de vírus. Em seguida as células foram centrifugadas a 1000 g por 30 minutos, sendo o *pellet* ressuspensionado no próprio meio com vírus e transferido para um poço de placa de 6 poços coberto com Geltrex, contendo 1,5 ml de meio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) com *ROCK inhibitor* Y-27632 (STEMCELL). No dia seguinte, o meio foi trocado por 1,5 ml de mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) e 500 µl de vírus. Este processo foi realizado por 4 dias consecutivos e no quinto dia o meio foi trocado por 2 ml de mTeSR™1 (STEMCELL Technologies). A partir do D6 foi iniciada a seleção das células, que foi realizada com a adição de puromicina (concentração estoque: 1 µg/ml) na concentração de 1:1000. Após 2 dias, a concentração foi aumentada para 1:500 e, após mais 2 dias, aumentada para 1:300, para garantir a pureza da população. Como controle do tratamento, foram utilizadas células de cada indivíduo não transfectadas. Ao final do tratamento, as células foram coletadas para extração de RNA com *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific), seguido de tratamento com DNase, como descrito no item 4.8.2. A avaliação da superexpressão foi realizada por RT-qPCR, como descrito no item 4.1.

4.12 Ensaio de proliferação celular

Para avaliação da capacidade proliferativa das iPSCs do paciente após a superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1, foi realizado um ensaio de proliferação com cristal violeta. Para isso, as iPSCs foram repicadas com *StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent* (Gibco) e plaqueadas em poços cobertos com Geltrex de placas de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^3$ células/poço em 100 µl de meio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies). Todas as condições foram plaqueadas em quadruplicata. A primeira leitura (0h) foi realizada após 3 horas do plaqueio, para permitir a aderência das células e, após a leitura das 24h, as leituras foram feitas de 48 em 48h (72h, 120h e 216h). Para cada ponto, o meio de cultura dos poços foi removido e as células foram coradas com 60 µl de solução de cristal violeta (0,05% de cristal violeta e 11% de etanol em água) por 15 minutos a T. A. A solução foi retirada e a placa foi lavada com água 6 vezes. Após secar bem a placa, foi adicionado 100 µl de ácido acético 10% a cada poço e realizada incubação a T. A. por 30 minutos. A absorbância (590 nm) foi lida em aparelho FLUOstar Omega (BMG Labtech) e os dados foram analisados com o GraphPad Prism 7.

5 Resultados e discussão

5.1 Validação da expressão do RP11-1082A3.1

De acordo com a base de dados GTEx Portal, o RP11-1082A3.1 é um lncRNA testículo-específico e de baixa expressão. Utilizando então um painel de tecidos normais, foi realizada a validação da sua expressão por PCR convencional e por RT-qPCR, demonstrando que, de fato, ele não é detectado em outros tecidos além do testículo (Figura 5). É possível observar que o RP11-1082A3.1, além de apresentar uma expressão bastante específica, é bem pouco expresso, uma vez que dificilmente foi detectada a sua amplificação em gel de agarose, sendo necessário utilizar gel de poliacrilamida para sua identificação.

Figura 5 - Avaliação qualitativa (A) e quantitativa (B) da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 em um painel de tecidos normais.

Adicionalmente, foi realizada a verificação da expressão do lncRNA em linhagens celulares tumorais (Figura 6), encontrando o RP11-1082A3.1 em todas as linhagens testadas. É interessante notar que o par de *primers* utilizado foi desenhado para abranger os três éxons da sequência anotada, totalizando 264 pb. Tanto na amostra de testículo como em todas as linhagens tumorais,

foi encontrada não somente a banda de tamanho esperado, mas também uma banda menor, de aproximadamente 246 pb.

Figura 6 - Expressão do RP11-1082A3.1 em um painel de linhagens tumorais. DLD-1, adenocarcinoma colorretal; HB4A, mama normal; PC3, adenocarcinoma de próstata; OVCAR3, adenocarcinoma de ovário; A2780, carcinoma de ovário; SNC775, glioblastoma (cultura primária); Ntera-2, carcinoma embrionário de testículo.

Ambas as bandas foram eluídas e encaminhadas para sequenciamento, a fim de confirmar se a banda de 264 pb era de fato correspondente o lncRNA RP11-1082A3.1 e para verificar se a sequência da banda menor era um produto inespecífico. A partir do resultado do sequenciamento, foi possível confirmar que a banda de 264 pb era de fato correspondente ao lncRNA, no qual pode-se observar a presença das junções dos éxons 1 e 2 e dos éxons 2 e 3 (Figura 7A). Surpreendentemente, a sequência da banda menor também corresponde ao RP11-1082A3.1, porém a uma provável isoforma ainda não anotada que não possui o éxon 2 em sua estrutura, como pode ser observado pela junção dos éxons 1 e 3 (Figura 7B).

Tais resultados demonstram que o RP11-1082A3.1 é expresso especificamente em testículo, mas que pode também estar expresso durante o desenvolvimento embrionário, o que foi indicado pela sua presença em linhagens tumorais. Tal inferência se justifica pelo fato de que muitas vias normalmente ativas durante o desenvolvimento embrionário são reativadas no contexto do câncer. Um exemplo é que tanto as células cancerosas quanto as trofoblásticas expressam proto-oncogenes que codificam fatores de crescimento, além de ambos os tipos celulares expressarem receptores para esses fatores de forma similar, e ambos expressarem enzimas necessárias para migração e invasão (FERRETTI et al., 2007). Acredita-se que a reativação de vias específicas de trofoblasto pode contribuir para a inativação do controle do crescimento tumoral, reaproveitando vias que

normalmente estão ativas durante a formação da placenta e que são necessárias para evitar a resposta imune materna contra os antígenos fetais (COSTANZO et al., 2018). Em câncer de fígado, por exemplo, já foi demonstrado um conjunto de genes que apresentam um padrão similar de expressão durante o início do desenvolvimento embrionário e em tumores hepáticos primários e secundários (SHAH et al., 2018). Desta forma, a expressão do RP11-1082A3.1 em linhagens celulares de câncer pode ser um indicativo que ele tem papel durante o desenvolvimento intra-uterino, passando a ser testículo-específico durante a vida adulta.

Figura 7 - Sequências das bandas (A) de 264 pb e (B) de 246 pb. A linha vermelha indica a junção éxon-éxon.

5.2 Análises *in silico*

5.2.1 Potencial codificador do lncRNA RP11-1082A3.1

Uma das etapas de caracterização de um RNA não codificador é justamente verificar se o transcrito não possui potencial codificador de proteínas. Apesar disso, no caso de lncRNAs essa definição parece ser um tanto flexível, uma vez que já foi demonstrado que alguns deles podem

codificar pequenos peptídeos (WANG; MAO; LIU, 2019). Assim, foi utilizada a ferramenta *Open Reading Frame Finder* do NCBI para procurar por janelas abertas de leitura (*Open Reading Frames*, ORFs) na sequência de cDNA do RP11-1082A3.1, tendo sido identificadas duas (Quadro 1) de aproximadamente 100 nt, o que é considerado uma ORF curta (< 300 nt) (WU et al., 2020).

Para verificar se as possíveis proteínas eram funcionais, foi utilizada a ferramenta BLASTP, também do NCBI, para buscar por homologia das sequências. Para a ORF 1 (Tabela 1) o algoritmo não conseguiu identificar similaridades significativas, o que sugere que essa sequência provavelmente não codifica uma proteína funcional (PASTORI et al., 2014). Para a sequência proteica da ORF 2 (Tabela 1), por outro lado, foram obtidos muitos alinhamentos com outras proteínas, porém o *score* de alinhamento foi baixo (< 40). Por este resultado, pode haver indício de que o lncRNA pode dar origem a um peptídeo funcional.

Tabela 1 - Janelas abertas de leitura identificadas na sequência do RP11-1082A3.1. ORF: Janela aberta de leitura (do inglês, Open Reading Frame); nt: nucleotídeos; aa: aminoácidos.

ORF	Fita do DNA	Início	Término	Sequência (nt)	Sequência (aa)	Comprimento (nt / aa)
1	-	141	37	ATGGGCCTTTTGCTTTCTGATTATGC CATAGAACCTGTATTTTTAGGACT TTTATTCCTATTTCATCACTTGGCCGG CAACTTTCCTCCTCTCCTTTCTTG CCTAG	MGLLLSDYAIEPVLGL LFLFITWPATFSLSFLA	105 / 34
2	-	356	264	ATGTTTTCCATTTCCCAGTGGAGAG TCCACCTGCTCCTCAATGACCCCAT ATCCAGTGCTCTTTTGAGTACAGTT TCCCTTGGCAGTTTCTGA	MFSISQWRVHLLNDPI SSALLSTVSLGSF	93 / 30

Fonte: BARROS, I. I. (2020).

Peptídeos funcionais são geralmente codificados por ORFs pequenas em RNAs não codificadores (ncRNAs), os quais podem possuir uma ou mais ORFs (WU et al., 2020), que geralmente se iniciam por um tradicional códon de início AUG e frequentemente não terminam com códons de parada típicos (DRAGOMIR et al., 2020). De acordo com Ruiz-Orera e cols. (2014), a associação de lncRNAs com ribossomos é mais frequente do que se imagina. Em seu estudo, eles identificaram que a maioria das ORFs primárias encontradas nos lncRNAs correspondem a proteínas com menos de 100 aminoácidos (aa) de comprimento (RUIZ-ORERA et al., 2014). Utilizando uma análise de bioinformática, Ji e cols. (2015) encontraram que

aproximadamente 40% dos lncRNAs expressos codificam peptídeos com mais de 10 aa, enquanto 8% deles codificam peptídeos maiores que 100 aa (JI et al., 2015).

A capacidade de tradução do lncRNA está intrinsicamente ligada à presença do transcrito no citoplasma, uma vez que isso determina o acesso da maquinaria de tradução ao RNA, porém ela por si só não indica se o peptídeo produzido é biologicamente importante ou suficientemente estável para ser detectado (JI et al., 2015). Apesar disso, alguns peptídeos traduzidos a partir de lncRNAs já foram demonstrados como tendo funções importantes em câncer, como é o caso da proteína UBAP1-AST6, cuja superexpressão induz a proliferação de células de câncer de pulmão e a formação de colônias, e da HOB-AS3, que tem funções antitumorais em câncer colorretal (WU et al., 2020).

Com o aumento do número de estudos investigativos a respeito de peptídeos advindos de ncRNAs, bancos de dados com informações funcionais sobre o tema têm sido desenvolvidos, como é o caso do FuncPEP, que possui peptídeos de ncRNAs confirmados funcionalmente (DRAGOMIR et al., 2020). Os dois peptídeos provenientes das ORFs identificadas no RP11-1082A3.1, porém, não foram identificados nessa base de dados. A presença de ORFs que podem dar origem a pequenos peptídeos no RP11-1082A3.1 indica, então, a sua presença no citoplasma. Apesar disso, a função dos peptídeos gerados a partir dele teria que ser experimentalmente avaliada.

5.2.2 Interação do RP11-1082A3.1 com proteínas

O primeiro passo na busca da função de novos transcritos, não havendo dados sobre eles na literatura, é a pesquisa de informações em bancos de dados públicos e a utilização de ferramentas disponíveis para prever interações com outras biomoléculas, o que pode indicar suas vias de atuação. Um importante mecanismo de ação dos lncRNAs é a sua capacidade de interação com proteínas e, uma vez identificadas essas interações, é possível compreender as potenciais funções dos lncRNAs (ZHANG et al., 2019a). Para tal análise, foi utilizado o banco de dados NPInter 4.0, que possui interações de ncRNAs validadas experimentalmente (TENG et al., 2020), encontrando interação do RP11-1082A3.1 com 6 proteínas (Tabela 2).

As proteínas identificadas até o momento como parceiras de interação do lncRNA, de acordo com os bancos de dados utilizados, estão localizadas principalmente no núcleo celular e

estão, na sua maioria, envolvidas no processamento de mRNA. A proteína Wdr33 é uma das subunidades que compõem o complexo CPSF (sigla em inglês para fator de especificidade de clivagem e poliadenilação), tendo sido demonstrado que ela se liga diretamente ao hexâmero AAUAAA da extremidade 3', cujo reconhecimento é necessário para a poliadenilação do mRNA (CHAN et al., 2014). De forma similar, um estudo da proteína parceira de interação hnRNPA2B1 indicou que ela desempenha um papel na montagem do spliceossomo, afetando o processo de *splicing* alternativo. O mesmo estudo ainda demonstrou que mutação na proteína em neurônios motores diferenciados a partir de iPSCs de paciente com esclerose lateral amiotrófica, apresentavam maior risco de morte em cultura a longo termo (MARTINEZ et al., 2016).

Estudo recente demonstrou que a proteína MOV10 pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma de células germinativas masculinas primordiais, apresentando um papel fundamental na determinação de linhagem e na proliferação de células progenitoras espermatogoniais (FU et al., 2019). Além disso, um outro estudo, em camundongos, mostrou que essa proteína é essencial para o desenvolvimento embrionário e para o desenvolvimento e funcionamento saudável do sistema nervoso central (SKARIAH et al., 2017). A FBL, por outro lado, é uma proteína encontrada no nucléolo que está relacionada com morfologia e proliferação celular (AMIN et al., 2007), mas aparentemente não está envolvida em nenhum processo relacionado a desenvolvimento neural.

O lncRNA RP11-1082A3.1 também é capaz de interagir com duas proteínas, NONO e SFPQ, ambas da família DBHS, cujos membros atuam como andaimes moleculares, se associando a diversos fatores de transcrição, DNA e RNA (KNOTT; BOND; FOX, 2016). A primeira possui papel importante na regulação de RNAs sinápticos, tendo sido demonstrado que mutações ou deleções nessa proteína levam a defeitos nas funções cognitivas tanto em camundongos quanto em humanos (MIRCSOF et al., 2015). NONO também é capaz de se ligar ao promotor do gene OCT4 e regular a sua expressão durante a diferenciação neural de células tronco embrionárias (ESCs) (PARK et al., 2013), nas quais já se observou a incapacidade de se diferenciarem eficientemente em neurônios devido à manutenção do estado pluripotente pela expressão de OCT4 (KARWACKI-NEISIUS et al., 2013). A proteína SFPQ, por sua vez, participa da regulação de inúmeros mRNAs localizados nos axônios de neurônios sensoriais e que codificam proteínas promotoras de sobrevivência axonal (COSKER et al., 2016).

Tabela 2 - Proteínas parceiras de interação do lncRNA RP11-1082A3.1.

ID da interação	Proteína	Experimento	Linhagem celular	Função molecular	Processo biológico	Localização subcelular
ncRI-40042172	WDR33	PAR-CLIP	HEK293	Ligação de RNA	Processamento de mRNA	Núcleo
ncRI-40173621	hnRNPA2B1	HITS-CLIP	MDA-MB-231	Ribonucleoproteína, ligação de RNA	Interação vírus-hospedeiro; processamento, <i>splicing</i> e transporte de mRNA	Núcleo, região extracelular
ncRI-40593511	MOV10	CLIP-seq	MDA-MB-231	Helicase, hidrolase, ligação de RNA	Interação vírus-hospedeiro; silenciamento gênico mediado por RNA; regulação de transcrição	Núcleo, citoplasma
ncRI-40606170	FBL	CLIP-seq	Flp-In 293	Metiltransferase, ligação de RNA	Processamento de rRNA	Núcleo
ncRI-40622127	NONO	CLIP-seq	HeLa	Ativador, ligação de DNA, repressor, ligação de RNA	Ritmos biológicos; dano, recombinação e reparo de DNA; imunidade inata; processamento, <i>splicing</i> de mRNA; regulação de transcrição	Núcleo
ncRI-40626379	SFPQ	CLIP-seq	HeLa	Ativador, ligação de DNA, repressor, ligação de RNA	Ritmos biológicos; dano, recombinação e reparo de DNA; imunidade inata; processamento, <i>splicing</i> de mRNA; regulação de transcrição	Núcleo, citoplasma

Fonte: BARROS, I. I. (2020)

Esses resultados indicam que o lncRNA RP11-1082A3.1 pode atuar tanto no núcleo quanto no citoplasma celular, uma vez que interage com proteínas de ambos os compartimentos. Adicionalmente, sua capacidade de se ligar a proteínas que participam do processamento de mRNAs e de processos como proliferação celular e desenvolvimento neural indica que ele também está envolvido nessas vias.

5.2.3 Interação do RP11-1082A3.1 com outros RNAs

Assim como interações com proteínas, a interação com outros RNAs pode dar indícios de função para um lncRNA ainda não caracterizado funcionalmente. Diversos lncRNAs anotados podem abrigar elementos de reconhecimento de miRNAs, agindo assim como uma crítica camada regulatória de interação (JALALI et al., 2013). Para buscar essas interações, foi utilizado o módulo de predição do banco de dados DIANA-LncBase v.2, que possui uma extensa coleção de elementos de reconhecimento de miRNAs em lncRNAs (PARASKEVOPOULOU et al., 2015). Como recomendado, foi aplicado o *score* de predição limite de 0.7, que corresponde a 28,3% de sensibilidade e 50,8% de precisão (PARASKEVOPOULOU; HATZIGEORGIOU, 2016), obtendo assim 15 miRNAs preditos (Tabela 3).

Tabela 3 - Predição de interação entre o lncRNA RP11-1082A3.1 e miRNAs. Via KEGG: via do banco de dados Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (do inglês, *Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes*); Categoria GO: categoria do projeto Ontologia Gênica (do inglês, *Gene Ontology*).

miRNA	Score	Via KEGG	Categoria GO
hsa-miR-1825	0.927	Metabolismo de tirosina; Meiose de oócito; Via de sinalização TGF-beta; Proteólise mediada por ubiquitina; Processamento de proteína no RE; Biossíntese de glicosfingolipídeo	Organela; Ligação de RNA; Expressão gênica; Via de sinalização de receptor de neurotrofina TRK; Processo biossintético; Via de sinalização de receptor de TGF-beta; Complexo npBAF
hsa-miR-548au-3p	0.905	Biossíntese de esteróide	Organização de membrana; Morte celular; Interrupção do ciclo celular; Via biossintética; Ativação de plaqueta; Regulação do transporte de glicose; Via de sinalização Notch; Processo metabólico do colesterol
hsa-miR-3920	0.856	-	-
hsa-miR-758-5p	0.794	-	-
hsa-miR-4762-3p	0.792	-	-

hsa-miR-3614-5p	0.787	Carcinogênese viral; Glioma; Ciclo celular; MicroRNAs em câncer; Melanoma; Leucemia mielóide crônica; Câncer de pulmão de células pequenas; Via de sinalização de neurotrofina	Regulação negativa do desenvolvimento embrionário; Regulação da montagem do complexo centromérico; Desdiferenciação celular; Regulação negativa do desenvolvimento da mesoderme; Desmetilação de histona; Processo apoptótico de célula glial
hsa-miR-1208	0.781	-	-
hsa-miR-3117-3p	0.731	-	Ponto de checagem da citocinese; Regulação negativa da citocinese; Ligação de fosfatidilinositol-3-fosfato; Sulco de clivagem; Centro de organização de microtúbulo; Divisão celular; Ligação de lipídio
hsa-miR-186-5p	0.727	Doenças priônicas; Biossíntese de ácido graxo; Carcinogênese viral; Via de sinalização do p53; Metabolismo de ácido graxo; Ciclo celular; Proteoglicanos em câncer; Transporte de RNA; Câncer colorretal; Via de sinalização TGF-beta; Junções aderentes; Biossíntese de esteróides	Organela; Processo biossintético; Ligação de RNA; Ciclo celular mitótico; Resposta a estresse; Morte celular; Via de sinalização do receptor de neurotrofina TRK; Processo do sistema imune; Via de sinalização apoptótica intrínseca; Via de sinalização EGFR
hsa-miR-29a-5p	0.724	Alongamento de ácido graxo; Proteoglicanos em câncer; Meiose de oócito; Via de sinalização TGF-beta; Degradação de ácido graxo; Via de vigilância de mRNA	Organela; Expressão gênica; Organização de membrana; Processo biossintético; Via de sinalização do receptor de neurotrofina TRK; Ciclo celular mitótico; Via de sinalização EGFR; <i>Splicing</i> de RNA
hsa-miR-4469	0.723	-	-
hsa-miR-6892-3p	0.714	-	-
hsa-miR-380-5p	0.712	Interação receptor-MEC; Amebíase; Adesão focal; Carcinogênese química; Digestão e absorção de proteína; Junção aderente; Metabolismo de esfingolípídeo; Degradação de RNA; Via de vigilância de mRNA; Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450	Organização de matriz extracelular; Processo catabólico de colágeno; Desmontagem de matrix extracelular; Adesão focal; Exossomo vesicular extracelular; Morfogênese da pele; Projeção celular
hsa-miR-8083	0.711	-	-
hsa-miR-3169	0.704	-	-

Fonte: BARROS, I. I. (2020)

Os miRNAs indicados como parceiros de interação do RP11-1082A3.1, como esperado, participam dos mais variados processos biológicos e, dentre aqueles que foram enriquecidos em vias KEGG e/ou categoria GO, encontrei muitos relacionados a ciclo celular. Alguns também estão associados com regulação do desenvolvimento neural, como é o caso do miR-3614-5p, que aparece

com a via KEGG “Via de sinalização de neurotrofina”, e dos miRNAs miR-186-5p e miR-29a-5p, que aparecem com categoria GO “Via de sinalização do receptor de neurotrofina TRK”. Neurotrofinas são fatores de crescimento envolvidos em diversas funções do sistema nervoso através da sua ligação com receptores Trk, ativando vias de sinalização relacionadas a funções neurais, tais como sobrevivência, diferenciação, formação de sinapse, plasticidade e crescimento axônico (ARÉVALO; WU, 2006).

Dentre os miRNAs preditos com *score* acima de 0.9, temos o miR-548a-3p e o miR-1825. O primeiro pertence à família gênica miR-548, que é encontrada apenas em humanos e primatas (PIRIYAPONGSA; JORDAN, 2007), e sua superexpressão está associada com inibição da proliferação e promoção de apoptose em células de câncer de mama (SHI et al., 2015). O miR-1825, por sua vez, já foi descrito como um supressor tumoral em gliomas, inibindo proliferação e invasão, além de induzir apoptose (XING; ZENG, 2017). Além de estar enriquecido na categoria GO “Via de sinalização do receptor de neurotrofina TRK”, descrita anteriormente, ele já foi encontrado desregulado, sendo menos expresso, em amostras de cérebro de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ALS). Utilizando modelo animal, os autores ainda observaram que a sua menor expressão leva ao aumento da expressão de um de seus alvos, o TBCB, o que gera neurônios motores com axônios mais curtos (HELFERICH et al., 2018). Adicionalmente, o miR-1825 está enriquecido na via KEGG “Via de sinalização TGF-beta”, uma via que está envolvida em diversos processos, mas que também tem papel central no desenvolvimento do SNC durante a embriogênese: membros da família TGF- β regulam o início da formação do sistema nervoso, comprometimento de linhagem das células-tronco em neurônios e glia, migração e sobrevivência celular (MEYERS; KESSLER, 2017).

Além da interação com miRNAs, foi realizada a predição de interação do RP11-1082A3.1 com mRNAs e outros lncRNAs, sendo utilizado para isso o banco de dados desenvolvido por Teraí e colaboradores (<http://rtools.cbrc.jp/cgi-bin/RNARNA/index.pl>), que leva em conta a energia de interação e a predição de estrutura secundária conjunta (TERAI et al., 2016). Foi utilizado o SumEnergy como método de classificação, que leva em conta a soma das energias de interação locais menores que 0.692 kcal/mol, que, de acordo com os autores, é o mais adequado para sequências longas de RNA, como os lncRNAs. Dos RNAs alvos de interação do RP11-1082A3.1, foi obtida uma lista de 15 transcritos (Tabela 4), cujas funções e doenças associadas já descritas

foram obtidas com os bancos de dados OMIM (<https://www.omim.org/>) e GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Tabela 4 - Predição de interação do RP11-1082A3.1 com outros RNAs, suas funções e doenças associadas.

Posição	Nome	Função	Doenças associadas
1	TTN	Molde de adesão para a montagem da maquinaria contrátil em células musculares	Distrofia muscular tibial; Miopatia hereditária com insuficiência respiratória precoce
2	KCNQ1OT1	Transcrito antisense do gene KNCQ1, interage com a cromatina e regula a transcrição de múltiplos alvos por modificações epigenéticas	Síndrome de Beckwith-Wiedemann; Hemi-hiperplasia
3	MUC16	Formação de barreira, protegendo as células epiteliais contra patógenos	Câncer de ovário; Adenocarcinoma de célula clara
4	TSIX	Transcrito antisense de XIST, é co-expresso com XIST apenas no cromossomo X inativo	Esclerodermia sistêmica; Ataxia espinocerebelar tipo 8
5	NEAT1	LncRNA que é retido no núcleo, onde forma o componente estrutural principal das sub-organelas <i>paraspeckles</i>	Esclerose múltipla recorrente-remitente
6	GRIN2B	Papel no desenvolvimento do cérebro, na formação de circuitos, plasticidade sináptica, migração e diferenciação celular	Deficiência intelectual com ou sem convulsões; Encefalopatia epiléptica
7	XIST	Iniciação e espalhamento da inativação do X	Inativação do cromossomo X; Hipogonadismo hipogonadotrópico
8	DNAJC10	Reduz ligações dissulfeto incorretas em glicoproteínas mal dobradas	Cutis laxa; Tumor de vesícula seminal
9	SLC8A1	Regulação de níveis citoplasmáticos de Ca(2+) e processos celulares dependentes de Ca(2+)	Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito; Doença cardíaca
10	KCNJ6	Regulação dos níveis celulares de potássio	Síndrome de Keppen-Lubinsky; Epilepsia
11	ABI2	Regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina subjacente à motilidade e adesão celular	Anosognosia; Distrofia muscular de cinturas tipo 2H

12	FSIP2	Associado à bainha fibrosa do esperma. É específico de células espermato gênicas	Falha espermatogênica; Infertilidade masculina não-sindrômica devido a transtorno de motilidade de esperma
13	LPP	Pode estar envolvido em adesão célula-célula e motilidade celular	Leucemia Mieloide Aguda; Leucemia Monoblástica Aguda
14	NCKAP1	Parte do complexo WAVE que regula a reorganização de filamentos de actina	Síndrome de Nance-Horan; Transtorno do espectro autista; Doença de Alzheimer
15	AGO3	Pode exercer função no silenciamento gênico mediado por RNAi	-

Fonte: BARROS, I. I. (2020)

Pode-se observar que a maioria dos RNAs preditos possuem alguma doença já associada, de acordo com a base de dados GeneCards, sendo algumas delas síndromes genéticas raras e de comprometimento neural. Esse é o caso, por exemplo, do RNA TSIX, um lncRNA necessário para inibição da função de XIST, que por sua vez atua no *imprinting* do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário (OHHATA et al., 2011). TSIX aparece associado à ataxia espinocerebelar tipo 8, que consiste em uma doença neurodegenerativa que pode levar a um quadro progressivo de piora de descoordenação da fala e oculomotora, deglutição, movimentos dos membros e moderada perda sensorial (DAY et al., 2000). O NEAT1, por sua vez, é um lncRNA que está envolvido na promoção da extensão dos axônios de neurônios primários em cultura, além de promover melhora nas funções motora, de aprendizado e de memória espacial em camundongos (ZHONG et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado em camundongos que esse RNA tem papel importante na regulação do desenvolvimento embrionário pela modulação de genes especificadores de linhagem, tanto de forma direta quanto indireta (ANNA HUPALOWSKA et al., 2018). De acordo com o GeneCards, NEAT1 está associado com esclerose múltipla, uma doença neurológica crônica caracterizada por discretas áreas de inflamação no SNC, desmielinização e lesão axonal, que leva a disfunção cognitiva em um grande número de casos (SÁNCHEZ et al., 2008), demonstrado novamente sua importância na biologia neural.

Outro bom exemplo é o RNA GRIN2B, que está associado a uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por moderado a profundo atraso no desenvolvimento/deficiência intelectual, além de anormalidades de tônus muscular (como hipotonia) e problemas de comportamento (PLATZER; LEMKE, 1993). Ele é traduzido em uma

das subunidades componentes de receptores da família NMDAR (do inglês, *N-methyl-d-aspartate receptors*), que medeiam o fluxo de Ca^{2+} , importante para a transmissão sináptica excitatória no SNC. Tal subunidade é altamente expressa durante o período pré-natal, o que sugere seu papel crucial no desenvolvimento cerebral (HU et al., 2016). Já o RNA KCNJ6 está envolvido na síndrome de Keppen-Lubinsky, cujas características clínicas incluem severo atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual e microcefalia (MASOTTI et al., 2015). Ele é traduzido em uma proteína pertencente a uma família que forma canais iônicos nas membranas das células de mamíferos, controlando o fluxo de íons de potássio (K^+) no coração e no SNC (WANG; WHORTON; MACKINNON, 2014).

O RNA ABI2 encontra-se associado a anosognosia, uma condição neurológica na qual o paciente não tem consciência do seu estado e que está associada com demência, doença mental e lesão na estrutura cerebral (ACHARYA; SÁNCHEZ-MANSO, 2019). Apesar da doença associada estar aparentemente relacionada com dano físico ao cérebro, já foi demonstrado que o gene *ABI2* também tem papel ativo em processos neurológicos como na migração neuronal no neocórtex e hipocampo e na morfologia e densidade da coluna dendrítica, além de atuar nos processos de aprendizagem e memória (GROVE et al., 2004).

Finalmente, o NCKAP1 tem como uma de suas doenças associadas à síndrome de Nance-Horan, uma doença genética rara caracterizada principalmente por catarata congênita e anormalidades faciais e de dentição, mas casos com deficiência intelectual leve a moderada e atraso no desenvolvimento motor já foram reportados (LI et al., 2018; TOUTAIN; AYRAULT; MORAINÉ, 1997). O transtorno do espectro autista é outra doença associada ao NCKAP1, uma doença que envolve tanto alterações na anatomia do cérebro quanto redes de funções neurais, que resultam provavelmente da regulação alterada de múltiplos processos ontogenéticos (DICICCO-BLOOM et al., 2006). Esse RNA também encontra-se associado à doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa e progressiva que é uma das principais causas de demência, representando de 60% a 80% de todos os casos (RASKIN et al., 2015). NCKAP1 foi encontrado com a expressão significativamente diminuída no cérebro de pacientes com Alzheimer e a sua supressão induziu apoptose de células neurais, o que pode indicar a sua via de atuação na doença (SUZUKI et al., 2000). Adicionalmente, outro estudo já demonstrou que a proteína NCKAP1 é seletivamente expressa em neurônios em diferenciação no córtex cerebral embrionário, tendo papel

crucial nesse processo e também na formação e atividade de lamelipódio, que consistem em protrusões de membrana muito importantes para o crescimento de neuritos (YOKOTA et al., 2007).

Uma vez que um dos fenótipos apresentados pelo paciente é o hipogonadismo, é interessante observar que três dos RNAs preditos estão associados a vias relacionadas à reprodução, sendo eles o XIST, o DNAJC10 e o FSIP2. O primeiro tem justamente o hipogonadismo hipogonadotrópico como doença associada, que se caracteriza como uma função testicular prejudicada que ocorre devido a uma disfunção no eixo hipotálamo-hipófise (FRAIETTA; ZYLBERSTEJN; ESTEVES, 2013). XIST é responsável pela inativação do cromossomo X em mulheres durante a fase embrionária, mas sua expressão também já foi detectada em embriões humanos tanto femininos quanto masculinos durante a fase de pré-implantação (RAY; WINSTON; HANDYSIDE, 1997). Tal achado já foi corroborado por outro estudo que mostrou a expressão do alelo materno de XIST em embriões masculinos na mesma fase (DE MELLO et al., 2017), o que demonstra que ele também pode ter um papel importante no desenvolvimento humano masculino.

Com base, então, nos RNAs preditos como parceiros de interação do RP11-1082A3.1, pode-se inferir que esse lncRNA pode atuar em vias biológicas associadas a funções neurais e do desenvolvimento.

5.2.4 Análise de conservação da sequência do RP11-1082A3.1

Foi realizado o alinhamento da sequência genômica do lncRNA com outras espécies, para verificar o seu grau de conservação. A partir do resultado obtido (Figura 8), pode-se observar que o RP11-1082A3.1 é conservado em espécies mais próximas à humana, como chimpanzé e gorila, porém apresenta apenas algumas ilhas de conservação nas outras espécies analisadas, o que pode ser verificado pelas áreas em rosa.

Figura 8 - Alinhamento genômico do RP11-1082A3.1 com outras espécies. Na ordem, de cima para baixo: camundongo, rato, chimpanzé, gorila, vaca.

A conservação evolutiva é amplamente utilizada como um indicador de função de novos genes, sendo a similaridade na sequência de nucleotídeos a visão canônica desse fenômeno (DIEDERICHS, 2014). Tal abordagem, muito valiosa para mRNAs, não parece ser aplicável para lncRNAs, já que estes não apresentam questões relacionadas à codificação de proteínas (como o uso de códons, quadro de leitura, dobradura, estabilidade ou função), o que torna os elementos funcionais dentro do lncRNA relativamente livres para se embaralharem dentro do gene e faz o alinhamento de sequência ser muito mais desafiador (LEE; ZHANG; KRAUSE, 2019). Dessa forma, eles apresentam baixa conservação de sequência primária, além de já ter sido demonstrado que para aproximadamente 20% deles não foi possível encontrar a expressão de ortólogos além de chimpanzé (WASHIETL; KELLIS; GARBER, 2014). Assim, foram propostas quatro dimensões de conservação entre espécies para os lncRNAs: a nível de sequência, referente à homologia de sequência que dá origem a transcritos altamente similares; a nível estrutural, onde transcritos de diferentes espécies se dobram em estruturas similares independente da homologia de sequência; a nível funcional, referente a lncRNAs de diferentes espécies que executam a funções similares; e a nível transcricional, no qual lncRNAs de espécies diferentes são transcritos a partir de um locus conservado com genes vizinhos idênticos (DIEDERICHS, 2014).

O baixo nível de conservação encontrado nessa classe aparentemente se deve à recente aparição dos lncRNAs humanos por meio de seleção neutra e retrotransposição (PERRY; ULITSKY, 2016). Além disso, a falta de homólogos de lncRNAs em espécies separadas por mais de 50 milhões de anos sugere a alta frequência de originação de novos transcritos desse grupo (ULITSKY, 2016). Um estudo do transcriptoma de 17 espécies já demonstrou, inclusive, que lncRNAs de espécies distantes compartilham pequenas ilhas de conservação de sequências, abrangendo apenas um ou dois éxons e mais próximo da extremidade 5' do transcrito (HEZRONI et al., 2015). Em outro estudo, com lncRNAs testículo-específicos de camundongos, os pesquisadores observaram que apenas uma pequena porcentagem dos transcritos eram parcialmente conservados no genoma humano, indicando mais uma vez a baixa taxa de conservação da sequência primárias dos lncRNAs (HONG et al., 2018).

Os lincRNAs mais evolutivamente jovens são menos conservados entre mamíferos e primatas, e dentro da espécie humana eles são mais tecido-específicos e são particularmente enriquecidos para expressão em testículo (WASHIETL; KELLIS; GARBER, 2014). Isso se deve

à intensa pressão seletiva à qual está sujeita a reprodução masculina, levando à rápida divergência dos genes testiculares tanto a nível de expressão quanto a nível de sequência (ROLLAND et al., 2019). O lncRNA RP11-1082A3.1 aparentemente segue esse padrão de baixa conservação e especificidade tecidual, o que pode indicar a sua recente aparição na escala evolutiva.

5.2.5 Predição de função

Para a predição das funções do RP11-1082A3.1, foi utilizada a interface *web* FuncPred, uma plataforma que utiliza como base a coexpressão do lncRNA com genes codificadores de proteína conhecidos em diversos tecidos e espécies (PERRON; PROVERO; MOLINERIS, 2017). Ela utiliza como fontes de anotação gênica o *Gene Ontology Consortium* e coleções de grupos de genes do banco de dados de assinaturas moleculares MSigDB, que é uma coleção de genes anotados para ser utilizada pelo programa GSEA (do inglês, *Gene Set Enrichment Analysis*), e se baseia no princípio de que, se um gene demonstra um perfil de expressão relacionado àquele de um conjunto de genes envolvidos em uma função específica, tal gene provavelmente está envolvido na mesma função (PERRON; PROVERO; MOLINERIS, 2017). Esta é uma abordagem interessante, uma vez que muitos lncRNAs ainda não possuem função conhecida e não teriam como ser abordados diretamente em uma análise de enriquecimento de vias.

Como resultado, foi obtida uma lista de 24 funções preditas para o RP11-1082A3.1, considerando um $FDR < 0.05$, que podem ser encontradas na Tabela 5. Na coluna “Descrição” encontram-se os nomes dos conjuntos de genes enriquecidos, a partir da qual é possível observar que a maioria dos enriquecimentos está relacionada com vias de espermatogênese, das quais os que apresentaram FDR mais significativo foram o conjunto de genes que se encontram altamente expressos durante a produção de gametas masculinos (HALLMARK_SPERMATOGENESIS) e o grupo de genes altamente regulados especificamente no tecido testicular humano (SU TESTIS). Tal achado é coerente com o fato do RP11-1082A3.1 ser um lncRNA testículo-específico, o que significa que ele pode estar envolvido em funções específicas deste órgão.

A espermatogênese consiste em uma série de eventos celulares que acontecem nos túbulos seminíferos do testículo e envolve a auto-renovação de células-tronco por mitose, meiose e eventos de diferenciação (CHEN et al., 2017). Em camundongos, modelo no qual a espermatogênese é mais estudada, já foram identificados lncRNAs específicos em diferentes tipos celulares pertencentes a esse processo, sugerindo a atuação deles na manutenção e sobrevivência das células germinativas

indiferenciadas, assim como na regulação da meiose e diferenciação das mesmas (LIANG et al., 2014). A relativa ausência de heterocromatina durante a espermatogênese permite a transcrição a partir de promotores que estariam inacessíveis em outras condições, permitindo que os RNAs que tenham efeitos positivos no sucesso ou função do esperma sejam passados para a próxima geração e, com o tempo, as mudanças genéticas que permitiram a expressão desses transcritos podem também levar à expressão e benefícios em outros tecidos (LEE; ZHANG; KRAUSE, 2019). Dessa forma, o lncRNA RP11-1082A3.1 pode estar envolvido na regulação de eventos como proliferação e diferenciação de células germinativas.

Tabela 5 - Funções preditas para o lncRNA RP11-1082A3.1. FDR: *False Discovery Rate*; GSEA_H: *Gene Set Enrichment Analysis, hallmark gene sets*; GSEA_C2: *Gene Set Enrichment Analysis, curated gene sets*; GO_BP: *Gene Ontology Biological Processes*; GO_CC: *Gene Ontology Cellular Components*.

Palavra-chave	Categoria	Descrição	FDR
HALLMARKSPERMATOGENESIS	GSEA_H	HALLMARK SPERMATOGENESIS	1.2e-05
SUTESTIS	GSEA_C2	SU TESTIS	2.4e-05
WMLIFU	GSEA_C2	WEBER METHYLATED LCP IN FIBROBLAST UP	0.00028
WMLISU	GSEA_C2	WEBER METHYLATED LCP IN SPERM UP	0.00046
WMIIF	GSEA_C2	WEBER METHYLATED ICP IN FIBROBLAST	0.00089
WMIISD	GSEA_C2	WEBER METHYLATED ICP IN SPERM DN	0.0017
WMHISD	GSEA_C2	WEBER METHYLATED HCP IN SPERM DN	0.0023
WMHIFD	GSEA_C2	WEBER METHYLATED HCP IN FIBROBLAST DN	0.0028
GO:0007283	GO_BP	Spermatogenesis	0.0042
GO:0048232	GO_BP	Male gamete generation	0.0043

WMLIFD	GSEA_C2	WEBER METHYLATED LCP IN FIBROBLAST DN	0.0064
GO:0060293	GO_CC	Germ plasm	0.013
GO:0045495	GO_CC	Pole plasm	0.013
GO:0043186	GO_CC	P granule	0.013
WMISU	GSEA_C2	WEBER METHYLATED ICP IN SPERM UP	0.015
WMHISU	GSEA_C2	WEBER METHYLATED HCP IN SPERM UP	0.018
GO:0007276	GO_BP	Gamete generation	0.027
GO:0019953	GO_BP	Sexual reproduction	0.028
GO:0070192	GO_BP	Chromosome organization involved in meiosis	0.033
MBHWHU	GSEA_C2	MEISSNER BRAIN HCP WITH H3 UNMETHYLATED	0.035
GO:0007129	GO_BP	Homologous chromosome pairing at meiosis (synapsis)	0.042
GO:0071546	GO_CC	Pi-body	0.044
GO:0048610	GO_BP	Cellular process involved in reproduction	0.048
WMHIFU	GSEA_C2	WEBER METHYLATED HCP IN FIBROBLAST UP	0.05

Fonte: BARROS, I. I. (2020)

Apesar da maioria das funções preditas estarem associadas com espermatogênese e reprodução, houve o enriquecimento de um grupo de genes cujos promotores altamente densos em CpG não possuem marcas de metilação da histona H3 no cérebro (MEISSNER BRAIN HCP WITH H3 UNMETHYLATED). A metilação do DNA é uma mecanismo epigenético que consiste na modificação química do DNA genômico pela adição de um grupo metil (-CH₃) à citosina ou adenina, ocorrendo tipicamente no contexto de ilhas CpG e representando um mecanismo chave

de modulação da expressão gênica e regulação durante o desenvolvimento (LAI; SHIEKHATTAR, 2014). A metilação é um evento associado ao silenciamento gênico, devido à inibição direta da ligação do fator de transcrição ou mediado por proteínas que se ligam ao grupamento metil e recrutam maquinarias de modificação da cromatina (DEATON; BIRD, 2011). Dessa forma, o estado não metilado dos promotores com alta densidade de CpG – que estão associados a genes *housekeeping* ubíquos e genes chave do desenvolvimento altamente regulados (MEISSNER et al., 2008) – indicam que seus genes encontram-se ativos no cérebro e pode sugerir que eles exercem funções importantes para o normal funcionamento do órgão. O enriquecimento desse grupo de genes pode representar um indício de que o RP11-1082A3.1 está de alguma forma envolvido em processos biológicos essenciais para o SNC, ainda que em menor magnitude que em vias de gametogênese.

5.2.6 Verificação da expressão do RP11-1082A3.1 em dados públicos

Em seguida, foram utilizados dados públicos de RNA-seq para tentar identificar a expressão do lncRNA. Dezesete estudos cujos dados brutos encontram-se disponíveis no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) (Tabela 6) foram selecionados para análise de bioinformática e identificação dos níveis de expressão do RP11-1082A3.1, os quais foram identificados em 4 dos estudos avaliados.

Tabela 6 - Dados de RNA-seq utilizados para a identificação da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1. (*) Disponível no *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI.

Estudo n°	N° GEO	Título do estudo	Expressão
1	GSE86985	<i>Region-specific neural stem cell lineages revealed by single-cell RNA-seq from human embryonic stem cells [population]</i>	-
2	GSE71315	<i>Single cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex</i>	-
3	GSE103715	<i>Transcriptome analysis reveals determinant stages controlling human embryonic stem cell commitment to neuronal cells</i>	-
4	GSE60548	<i>Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cell (RNA-Seq)</i>	-
5	GSE72986	<i>Expression profiles of cultured human epididymis cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions</i>	-
6	GSE74896	<i>The conserved transcriptional landscapes in human spermatogenesis</i>	Sim

7	GSE91063	<i>Single-cell Gene Expression Analysis Reveals Transcriptional Diversity among Human Spermatogonia</i>	-
8	GSE29160	<i>rRNA cleavage ensures translational cessation in the mature sperm</i>	-
9	GSE80137	<i>HLA peptides derived from tumor antigens induced by inhibition of DNA methylation for development of drug-facilitated immunotherapy</i>	-
10	GSE92277	<i>Genomic profiling of human spermatogonial stem cells [BulkRNA-Seq]</i>	Sim
11	GSE63392	<i>RNA-Seq of cKIT+ sorted cells from 53-137 day old fetal testes and ovaries and RNA-Seq of TRA-1-81+ H1 and UCLA1 hESCs</i>	-
12	GSE67835	<i>A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level</i>	-
13	GSE85606	<i>Cancer Associated Fibroblasts are defined by a core set of epigenome changes that contribute to the tumor phenotype [RNA-seq]</i>	-
14	GSE100206	<i>RNA-seq reveals abundant circRNA, lncRNA and mRNA in blood exosomes of normal persons</i>	-
15	SRP069329*	<i>Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis</i>	Sim
16	GSE89779	<i>Development of diagnostic exosomal biomarkers for the detection of invasive non-functional pituitary adenomas (NFPAs)</i>	Sim
17	GSE36552	<i>Tracing pluripotency of human early embryos and embryonic stem cells by single cell RNA-seq</i>	-

Fonte: BARROS, I. I. (2020)

Os estudos nos quais a expressão do RP11-1082A3.1 foi detectada foram os de número 6, 10, 15 e 16 (Tabela 6), sendo três deles relacionados à espermatogênese e um a câncer. O primeiro estudo consistiu na geração do perfil de expressão de células germinativas masculinas humanas, utilizando populações de células testiculares altamente enriquecidas. Além do testículo como um todo, foram sequenciados 5 tipos celulares isolados do órgão, dentre os quais o lncRNA estava expresso em espermatócito e espermátide (Figura 9A). Tais células são componentes do processo de espermatogênese, sendo os espermatócitos as células resultantes da primeira divisão meiótica das espermatogônias e as espermátides as células originadas a partir da divisão dos espermatócitos, consistindo no último estágio antes da completa transformação em espermatozóide (DE KRETZER et al., 1998), representando então células ainda em estágio de diferenciação.

O segundo estudo, o de número 10 (Tabela 6), consistiu de uma análise do perfil do transcriptoma de células-tronco espermatogoniais, avaliando populações em auto-renovação e em diferenciação, usando para isso os marcadores SSEA4 e c-Kit, respectivamente. Nesse conjunto de dados, foi identificada a expressão do RP11-1082A3.1 em dois pacientes, um com marcação positiva para SSEA4 e outro cujas células expressavam SSEA4 e não expressavam c-Kit, caracterizando então células-tronco em auto-renovação (Figura 9B). O lncRNA também estava expresso em espermatogônias do estudo 15 (Tabela 6), no qual foram gerados perfis de todo o transcriptoma de subtipos de células germinativas. Mais especificamente, ele encontrava-se expresso em espermatogônias escuras e claras do tipo A (Figura 9C), ambas consideradas células-tronco, porém o tipo escuro funciona como uma reserva de células-tronco que raramente se dividem, mas que podem iniciar a divisão em caso de dano ou doença. O tipo claro, por sua vez, são as células-tronco de renovação e que futuramente darão origem aos tipos celulares diferenciados (WAHEEB; HOFMANN, 2011). O conjunto dos estudos 6, 10 e 15 demonstrou, então, que o RP11-1082A3.1 está expresso em células-tronco e células comprometidas com a diferenciação, apresentando uma expressão com característica mais primordial durante o processo da espermatogênese.

O RP11-1082A3.1 também foi encontrado expresso em exossomos (Figura 9D), partículas extracelulares geradas pelas células que agem como vesículas de transporte. O estudo em questão, o de número 16 (Tabela 6), buscou desenvolver biomarcadores exossomais para o diagnóstico de adenomas hipofisários não funcionais invasivos, que consistem em tumores intracranianos benignos e que são originados de células adeno-hipofisárias, caracterizadas pela falta de evidência clínica de hipersecreção hormonal (ESPOSITO et al., 2019). Em câncer, já foram observados lncRNAs empacotados em exossomos, cujo modo de ação provavelmente seria atuar distalmente para criar um nicho pré-metastático (HEWSON et al., 2016). Em linhagens celulares, também já foi descrito que lncRNAs com níveis de expressão relativamente baixos encontravam-se altamente enriquecidos em exossomos (GEZER et al., 2014). A própria região 14q32, na qual se encontra o locus do RP11-1082A3.1, já foi descrita como uma região ativa de transporte exossômico, possuindo um grupo de miRNAs maduros que são exportados massivamente em exossomos, enquanto são praticamente indetectáveis nas células (TSANG et al., 2017). É interessante notar que a hipófise faz parte do circuito que controla a espermatogênese, participando do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014) e a coordenação correta desse eixo é

necessária para a função testicular normal - falhas em qualquer nível desse processo podem resultar em hipogonadismo (CORRADI; CORRADI; GREENE, 2016).

Figura 9 - Expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 em dados públicos de RNA-seq de 4 estudos diferentes. (A) Estudo 6, GSE74896; (B) Estudo 10, GSE92277; (C) Estudo 15, SRP069329; (D) Estudo 16, GSE89779. TPM: transcritos por milhão.

O fato de não ter sido encontrado o lncRNA expresso nos demais estudos, principalmente nos relacionados a células embrionárias e em diferenciação, além dos dados de cérebro, pode ser devido tanto à baixa abundância do transcrito nas amostras, quanto por uma variação temporal da expressão do RP11-1082A3.1. Em experimentos de RNA-seq, a detecção de transcritos pouco abundantes requer uma maior profundidade de sequenciamento (número de *reads* sequenciadas), assim como boas replicatas biológicas (PEREIRA; IMADA; GUEDES, 2017). O aumento do número de *reads*, porém, pode ainda não garantir a identificação desses transcritos, pois uma

grande proporção delas são originadas de um pequeno conjunto de genes altamente expressos, levando assim à necessidade de buscar por opções para captura adicional de genes com baixa expressão (VAN DEN BERGE et al., 2019).

Outra questão a ser levada em consideração é que lncRNAs de um modo geral apresentam especificidade celular. Estudos de RNA-seq que fazem análise de expressão de um tecido como um todo, que é composto por diferentes tipos de células, acabam não sendo os mais adequados para a identificação de transcritos pouco abundantes, uma vez que a expressão de um gene específico é a média ponderada da sua expressão em todas as células que compõem o tecido (ALESSIO et al., 2020). Sendo então a expressão gênica heterogênea mesmo entre tipos similares de células, métodos de sequenciamento de células únicas (*single-cell RNA-seq*, scRNA-seq) representam uma alternativa relevante para o entendimento do transcriptoma de células individuais de forma mais precisa (HWANG; LEE; BANG, 2018). Desta forma, não ter identificado a expressão do RP11-1082A3.1 nos estudos com cérebro pode ser reflexo da abordagem de sequenciamento de tecidos inteiros, diluindo seu baixo nível de expressão entre genes mais expressos a níveis indetectáveis. Em estudo de lncRNAs em cérebro de camundongo, por exemplo, já foi observado que essa classe de transcritos exibe maior regionalização cerebral e especificidade temporal que mRNAs (RAMOS et al., 2013). No estudo de Liu e colaboradores (2016) também foi demonstrado que lncRNAs que aparentemente são pouco expressos em tecidos podem ter importantes funções a nível de célula individual, demonstrando por análise de scRNA-seq que tais transcritos podem ser altamente expressos em células individuais do neocórtex humano em desenvolvimento (LIU et al., 2016). É importante salientar que, mesmo o scRNA-seq sendo uma técnica interessante para a detecção de lncRNAs raros no cérebro, algumas regiões desse órgão são de difícil acesso e possuem poucos ou nenhum estudo utilizando NGS, como é o caso do plexo coróide.

Além disso, alguns lncRNAs apresentam uma regulação espacial e temporal rígida, sendo encontrados em estágios específicos do desenvolvimento embrionário (SAUVAGEAU et al., 2013). Em cérebros de galinhas, por exemplo, já foi observado que a expressão dos lncRNAs, quando comparada à dos mRNAs, é temporalmente mais restrita o que, de acordo com os autores, sugere padrões de mudanças funcionais relacionados aos estágios do desenvolvimento (XU et al., 2018). Em macaco também já foram identificados grupos de lncRNAs com diferentes padrões de expressão tempo-específicos em diferentes órgãos durante variados estágios do desenvolvimento

(LI et al., 2015). Dessa forma, a ausência do RP11-1082A3.1 poderia ser consequência de estudos que avaliaram tempos específicos nos quais ele não se encontrava expresso.

5.2.7 Expressão do RP11-1082A3.1 em cérebro

Apesar de não ter encontrado o lncRNA RP11-1082A3.1 expresso nos estudos de RNA-seq em cérebro obtidos no GEO, a sua expressão foi detectada em um estudo de RNA-seq do Recurso de Biologia do Desenvolvimento Humano (HDBR), disponível no banco de dados *Expression Atlas*, que estudou o desenvolvimento do cérebro pré-natal humano (4 a 17 semanas pós-concepção) (LINDSAY et al., 2016). Nesse estudo, o RP11-1082A3.1 (AL132719.1, de acordo com o genoma hg38) foi encontrado com baixos níveis de expressão em uma região específica do cérebro, o plexo coróide, no estágio do desenvolvimento de 10 semanas pós-concepção (Figura 10).

Figura 10 - Nível de expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 (AL132719.1) em diferentes regiões do cérebro humano pré-natal. TPM, transcritos por milhão.

O plexo coróide (PC) é uma estrutura consistida de um estroma altamente vascularizado, com tecido conectivo rodeado por uma única camada de epitélio cuboidal simples (PRASONGCHEAN et al., 2015). Existem quatro PCs localizados em cada um dos ventrículos cerebrais (RODRÍGUEZ-LORENZO et al., 2020), que se desenvolvem cedo durante a embriogênese, se originando ao longo do eixo dorsal do tubo neural nos locais dos futuros ventrículos e consistindo tanto de componentes ectodérmicos (epitélio) quanto mesodérmicos (estroma) (KAUR; RATHNASAMY; LING, 2016). Em embriões humanos o PC representa mais de 50% da área ventricular, o que demonstra sua imensa relevância para o desenvolvimento e função normais do cérebro (LIDDELOW, 2015).

O PC é responsável pela secreção do líquido cefalorraquidiano (LCR), além de uma quantidade considerável de fatores tróficos e de sinalização no SNC (RODRÍGUEZ-LORENZO et

al., 2020), tendo funções cruciais durante o desenvolvimento cerebral e na homeostase do órgão. O LCR provê proteção mecânica para o cérebro e age na remoção dos produtos de metabolismo, atuando como uma rota de comunicação do SNC, à medida que transporta hormônios, fatores de crescimento e transmissores entre diferentes regiões cerebrais (KAUR; RATHNASAMY; LING, 2016). Além disso, o LCR regula a neurogênese sinalizando e alimentando progenitores em rápida divisão ao longo das paredes ventriculares (ARNAUD et al., 2016).

Sob condições fisiológicas normais, o PC possui a habilidade de expressar vários genes que codificam proteínas importantes para a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras neurais (FALCÃO et al., 2012). Também já foi observado que células epiteliais do PC de ratos, em estágios desde o desenvolvimento até 8 semanas pós-natais, têm habilidade de funcionar como células progenitoras neurais, o que vai diminuindo com o aumento da idade (ITOKAZU et al., 2006). Falhas durante o desenvolvimento do PC, assim como no seu correto funcionamento, podem ter então um grande impacto na homeostase cerebral: pouco LCR prejudica gravemente o crescimento do cérebro e excesso de LCR pode levar à hidrocefalia (LUN; MONUKI; LEHTINEN, 2015). O excesso de LCR, inclusive, já foi indicado como um marcador precoce do transtorno do espectro autista (SHEN et al., 2013).

Desta forma, a expressão do RP11-1082A3.1 no início do desenvolvimento cerebral no PC reforça o indicativo de que ele participa de funções relacionadas à formação e ao correto funcionamento do cérebro.

5.3 Detecção da deleção na região 14q32.2

O paciente é filho de pais não consanguíneos (Figura 11A) e possui uma deleção cromossômica de aproximadamente 106 kb na região 14q32.2 que o levou a perder o *locus* do lncRNA RP11-1082A3.1 (Figura 11C). Para investigar se essa mesma deleção também está presente nos seus pais, foi utilizada a técnica de hibridação genômica em *array* (aGH). A partir do resultado dessa análise, foi possível concluir que a perda não tem causa hereditária, uma vez que os pais do paciente não possuem a deleção em questão (Figura 11B).

Figura 11 - Investigação da deleção cromossômica no paciente e sua família. O paciente afetado é filho de pais não consanguíneos (A). Após análise de aGH, foi possível identificar que a deleção não está presente nos pais (B), apenas no paciente, cuja deleção engloba o locus do RP11-1082A3.1 (C).

5.4 Geração das iPSCs do paciente

5.4.1 Avaliação de marcadores eritróides

Para certificação de que as células expandidas e utilizadas posteriormente para nucleoporação e reprogramação em iPSCs eram de fato eritroblastos, foi realizada uma avaliação das mesmas por citometria de fluxo. Foi utilizado um conjunto de 4 marcadores comumente usados na delineação de perfil eritróide: o CD71, um marcador de reticulócitos; o CD235a, marcador de células sanguíneas vermelhas (SAMSEL; MCCOY, 2015); o CD36, expresso quando as células estão comprometidas com a linhagem eritróide (MAO et al., 2016); e o CD117, um marcador de progenitores eritróides (WESTERS et al., 2017). Além desses, também foi utilizado o 7-AAD, que permite a avaliação da porcentagem de células viáveis (7-AAD⁻) (CHEN et al., 2016).

De um modo geral, as células provenientes do indivíduo controle apresentaram mais de 50% da população positiva para a maioria dos marcadores eritróides, além de possuírem baixa positividade para o 7-AAD (menor que 3%), o que significa que aproximadamente 97% das células avaliadas estava viável (Figura 12). O mesmo foi encontrado nas células do paciente, inclusive com proporções bem mais altas de todos os marcadores em comparação ao controle (Figura 13). A

quantidade de células inviáveis foi levemente maior (porcentagem de células positivas para o marcador 7-AAD), porém os marcadores eritróides CD71, CD117 e CD36 foram positivos em mais de 68% das células e o CD235a em mais de 51% delas. Este resultado está de acordo com o perfil citométrico de células pró-eritroblásticas (WESTERS et al., 2017).

Figura 12 - Porcentagem de células positivas (% Gated) do indivíduo controle para marcadores eritroides antes da nucleoporação. O marcador 7AAD foi utilizado para avaliação da viabilidade celular.

Figura 13 - Porcentagem de células positivas (% Gated) do paciente para marcadores eritroides antes da nucleoporação. O marcador 7AAD foi utilizado para avaliação da viabilidade celular.

5.4.2 Avaliação morfológica

Dez dias após a nucleoporação, foi possível identificar as primeiras colônias nas culturas do controle e do paciente (Figura 14), sendo o número de colônias maior na cultura do paciente.

Figura 14 - Colônias de iPSCs, identificadas por setas brancas, observadas 10 dias (D10) e 12 dias (D12) após a nucleoporação dos eritroblastos. Aumento: 10x.

Após o isolamento das colônias, foi realizada a expansão de um dos clones do paciente com sucesso, sendo capaz de expandi-lo por diversas passagens (Figura 15), mantendo-se o aspecto de colônias compactas e planas, assim como núcleos grandes e citoplasma escasso, como observado por Takahashi e cols. (2007) após a reprogramação de fibroblastos humanos (TAKAHASHI et al., 2007). Nenhum dos clones do controle, porém, sobreviveu a ponto de ser expandido e, então, para os experimentos subsequentes, foi utilizada uma iPSC controle, gerada pela mesma metodologia e gentilmente doada pela Aline Fernanda de Souza, aluna do professor Flávio Vieira Meirelles.

O processo de reprogramação tem, por si só, uma baixa eficiência, no qual a integração aleatória dos transgenes pode resultar em uma expressão heterogênea que é alcançada por poucas células (OMOLE; FAKOYA, 2018). O sucesso na geração de iPSCs não parece ter, porém, associação com a idade do doador, já tendo sido relatado inclusive a geração dessas células de indivíduos centenários (YAGI et al., 2012). Apesar disso, mutações no DNA nuclear e mitocondrial adquiridas durante a vida do doador e durante o processo de reprogramação podem persistir

(STRÄSSLER et al., 2018), o que de alguma forma pode afetar a eficiência da técnica. Mesmo que o doador saudável utilizado para este estudo não fosse idoso, é possível que mutações adquiridas possam ter influenciado na capacidade das suas células de reprogramarem.

Figura 15 - Células pluripotentes induzidas (iPSCs) geradas do paciente após três (P3) e quatro (P4) passagens. Aumento: 5x.

5.4.3 Avaliação de marcadores de pluripotência

A análise de marcadores de pluripotência das iPSCs do paciente por citometria de fluxo também evidenciou a alta expressão do marcador extracelular SSEA-4 e dos marcadores intracelulares Nanog, OCT3/4 e Sox2 (Figura 16), os quais todos se encontraram acima de 80%. Este resultado está de acordo com os parâmetros encontrados na literatura, de acordo com os quais > 70% das células devem ser positivas para a expressão de, ao menos, dois marcadores (um intra e um extracelular) para a cultura estar de acordo com um perfil de célula-tronco pluripotente humana (hPSC), sendo eles: OCT4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4, Sox2, Nanog (SULLIVAN et al., 2018).

Figura 16 - Avaliação da positividade das iPSCs geradas do paciente para os marcadores de pluripotência SSEA4, Nanog, OCT3/4 e SOX2 (% Gated).

5.4.4 Formação de corpos embrióides

Outro ensaio necessário para a caracterização das iPSCs geradas é o de formação de corpos embrióides, um ensaio alternativo ao ensaio de formação de teratoma *in vivo*, que consiste no cultivo das iPSCs em suspensão, levando-as à diferenciação estocástica em células dos três folhetos embrionários em um agregado tridimensional (SHERIDAN; SURAMPUDI; RAO, 2012). Já no primeiro dia de indução (D0) foi possível observar a formação dos EBs a partir das iPSCs do paciente (Figura 17B), caracterizados pelo formato esférico bem delimitado.

Figura 17 - Formação de corpos embriões (EBs) a partir das iPSCs geradas do paciente. (A) iPSCs antes da indução (D-1); (B) EBs (D0). Aumento: 5x.

A formação de EBs é a representação dos estágios iniciais de especificação de linhagem e, quanto à expressão gênica, deve se diferenciar tanto das células embrionárias quanto das células diferenciadas (BHATTACHARYA et al., 2005). Após 15 dias de indução dos EBs, foi realizada então a avaliação da expressão de marcadores dos 3 folhetos embrionários e de pluripotência. De uma forma geral, a expressão gênica observada nos EBs do paciente seguiu o mesmo padrão observado no controle positivo (H1), especialmente para os genes de pluripotência e para os genes da ectoderme (Figura 18), o que também está de acordo com o que foi encontrado por Donaires e cols. em trabalho recente (DONAIRES et al., 2019).

Figura 18 - Expressão de marcadores de pluripotência (OCT4, KLF4, MYC e SOX2), de endoderme (AFP e GATA4), mesoderme (RUNX1 e CD34) e ectoderme (NCAM e NES). H1: linhagem de célula-tronco embrionária humana; Paciente: iPSCs geradas do paciente; D0: dia 0 da indução dos EBs; D15: dia 15 de indução dos EBs.

A expressão de *AFP* já foi demonstrada como sendo variável em EBs de diferentes linhagens de hESCs, além do gene ser mais ou menos expresso a depender do tempo avaliado durante a

diferenciação (PEKKANEN-MATTILA et al., 2010). O tamanho dos EBs formados também parece ser um fator que influencia na expressão de genes marcadores da endo e da mesoderme (CHA et al., 2015). A expressão de *GATA-4* foi utilizada por Freitas e cols. (2011) como marcador da progressão de ESCs bovinas em EBs. Neste estudo, *GATA-4* não foi identificado até a sexta passagem das ESCs, última passagem antes da formação em EBs espontânea observada, caracterizando um estado pluripotente (FREITAS et al., 2011). Em outro estudo, *GATA-4* apresentou expressão crescente em EBs de 1 a 2 semanas em cultura, mas diminuindo após esse tempo (CHOI et al., 2005), o que indica sua expressão dinâmica. Além disso, pela localização externa da camada endodérmica dos EBs, as células com característica de endoderme começam a desaparecer após a quarta semana em cultura (CHOI et al., 2005). Essa camada também é possivelmente influenciada por processos apoptóticos, que por sua vez têm mais influência a depender do tempo em cultura dos EBs, assim como do tamanho dos mesmos (VALAMEHR et al., 2008). A ocorrência de apoptose nos EBs do paciente, porém, não foi testada e, apesar da baixa expressão dos marcadores endodérmicos avaliados ser um indicativo de um estado mais pluripotente, a expressão dos marcadores ecto e mesodérmicos seguiu o padrão das células controle, assim como a diminuição da expressão dos marcadores de pluripotência.

5.5 Diferenciação das iPSCs em células progenitoras neurais (NPCs) e neurônios

Foi realizado um experimento piloto de diferenciação em NPCs, utilizando as iPSCs do paciente e as do controle saudável. Desde o início do experimento, foi observado que houve diferença no tamanho dos EBs ao final dos quatro dias de indução entre os dois indivíduos, sendo eles maiores no controle, além de aparentarem possuir bordas mais lisas e regulares (Figuras 19 e 20C-D).

Figura 19 - Etapa de 4 dias de formação de corpos embrioides do protocolo (EBs) de diferenciação neural. Imagens representativas de cada dia (D). Aumento: 5x.

Outro aspecto interessante observado ao longo de todo o experimento com as células aderidas, foi que as células do paciente estavam se proliferando de forma muito mais acelerada do que as células controles, entrando em confluência rapidamente (Figura 20H, N e P). As células do controle, por sua vez, enquanto se dividiam mas devagar, apresentaram uma maior taxa de diferenciação, com visível mudança de morfologia: as células foram progressivamente se tornando menores e com prolongamentos cada vez maiores, com aspecto de neuritos (Figura 20K, M e O). Durante a diferenciação neural, foram identificados prolongamentos também nas células do paciente, porém eles não eram tão numerosos e a grande maioria deles eram curtos, enquanto os corpos celulares permaneciam grandes (Figura 20N e P).

Figura 20 - Experimento piloto de diferenciação neural. EBs, corpos embrioides; Dif. Neuroep., diferenciação neuroepitelial; Dif. Neural, diferenciação neural. Imagens A-J: Aumento 5x; imagens K-P: Aumento 20x.

Neste primeiro experimento não foram detectadas rosetas neurais em nenhuma das culturas, as quais são estruturas compostas de células alongadas formando um lúmen que originam a neuroectoderme e cuja formação é altamente dependente da densidade celular (KHLONGKHLAEO et al., 2016). Provavelmente devido à alta densidade de células deste primeiro experimento, não foi possível observar a formação dessas estruturas. De fato, a diminuição da densidade celular por poço permitiu, posteriormente, visualizar com clareza as estruturas de rosetas neurais como previsto no protocolo (Figura 21). É importante destacar que, no mesmo tempo avaliado, foram identificadas inúmeras rosetas espalhadas pela cultura do indivíduo controle (Figura 21A), algumas inclusive bem grandes (Figura 21B). Contrariamente, na cultura do paciente não foi possível identificar essas estruturas, na qual as células aparentavam ainda possuir uma característica pluripotente, como colônias de iPSCs (Figura 21C e D), demonstrando um claro atraso no processo de diferenciação.

As rosetas neurais representam os estágios iniciais de formação do tubo neural, que possuem a capacidade de se diferenciar em tipos neuronais específicos e células da glia, além de servirem de nicho para a manutenção e a proliferação de células-tronco neurais (FEDOROVA et al., 2019). Atraso no desenvolvimento dessas estruturas já foi identificado em linhagens de hESCs modelos da síndrome do X-Frágil, o que também levou a um baixo potencial neurogênico em estágios mais tardios da neurogênese (TELIAS; SEGAL; BEN-YOSEF, 2013). Desta forma, a ausência de rosetas neurais é um forte indicativo de que houve um atraso na diferenciação das células do paciente.

Figura 21 - Rosetas neurais identificadas na cultura do indivíduo controle (A e B) e em detalhe indicadas pelas setas brancas (B), enquanto a cultura do paciente permanecia com características indiferenciadas (C e D). Aumento: 5x (A e C) e 20x (B e D).

Tal indício de atraso no processo de diferenciação das células do paciente, que possuem a microdeleção na região 14q32.2, foi reforçado pelo fenótipo das células de ambos os indivíduos ao final do protocolo de diferenciação (Figura 22). A diferença entre o controle e o paciente se tornou mais acentuada nos últimos dias, sendo possível observar em cultura que as células controles já

estavam proliferando a uma taxa bem mais lenta e que elas, além de parecerem menores, apresentavam longos processos que se interconectavam (Figura 22A e B). Já as células do paciente, apesar de estarem no mesmo estágio do protocolo, apresentavam um fenótipo bem diferente do controle, o que estava bem claro mesmo pela avaliação qualitativa por microscopia de contraste de fase. Elas apresentavam um tamanho maior que as células controles, com poucos processos e rapidamente enchiam o poço da placa de cultura (Figura 22C e D).

Figura 22 - Aspecto das iPSCs em cultura após diferenciação neural. A e B: iPSCs do indivíduo controle, com estruturas semelhantes a neuritos e área celular pequena. C e D: iPSCs do paciente, mostrando menor quantidade de projeções semelhantes a neuritos, uma grande área celular e maior número de células. Aumento: 20x.

A partir da análise quantitativa por *High Content Screening* (HCS), feita em dois tempos durante o experimento (D35 e D53), pôde-se observar que, de fato, as células do paciente estavam proliferando mais rapidamente, além de apresentarem uma área celular maior que as células controle, o que foi estatisticamente significativo no D35 da diferenciação (Figura 23A e B). Adicionalmente, foram encontradas diferenças significativas na expressão do marcador de pluripotência OCT4, que se encontrava maior nas células do paciente (Figura 23C), e também nos marcadores de progenitores neurais SOX2 e Nestina, ambos mais expressos nas células controles (Figura 23D e E), mostrando que as células do paciente encontravam-se em um estágio mais pluripotente que as do indivíduo controle.

Figura 23 - Análise quantitativa das iPSCs do paciente e do indivíduo controle no D35 de diferenciação neural. (A) número de células, $p < 0.0001$; (B) da área celular, $p < 0.0001$; e da expressão de: (C) OCT4, $p < 0.0001$; (D) SOX2, $p = 0.0063$; e (E) Nestina, $p = 0.0028$.

No D53, observei que as diferenças no número de células e no tamanho das mesmas se mantiveram significativas entre os dois indivíduos (Figura 24A e B). Os níveis de OCT4 se mantiveram, porém não houve diferença entre as populações de células dos dois indivíduos (Figura 24C). A diferença na expressão dos marcadores de progenitores neurais continuou existindo no D53 (Figura 24D e E), se acentuando no caso de SOX2.

Figura 24 - Análise quantitativa das iPSCs do paciente e do indivíduo controle no D53 de diferenciação neural. (A) número de células, $p < 0.0001$; (B) da área celular, $p = 0.0015$; e da expressão de: (C) OCT4, $p = 0.3621$; (D) SOX2, $p < 0.0001$; e (E) Nestina, $p = 0.0018$.

Em mamíferos, a neurogênese é iniciada com a indução da neuroderme, constituindo a placa neural que depois se dobrará, dando origem ao tubo neural (SUTER et al., 2009). As células neuroepiteliais do tubo neural darão origem aos tipos celulares neurais diferenciados, iniciando pelos neurônios e, em estágios mais tardios, gerando células da glia (KINTNER, 2002). A sincronia temporal entre a interrupção da proliferação e o início da diferenciação é essencial para o desenvolvimento e crescimento normais de um organismo, além de ser de extrema importância para a manutenção da homeostase e reposição de células durante toda a vida (RUIJTENBERG; VAN DEN HEUVEL, 2016).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), há um período de extensa proliferação celular para gerar a quantidade de células progenitoras necessárias para a formação correta do órgão, seguida de uma perda gradual dessa capacidade proliferativa, concomitante com o aumento da restrição do destino celular de certas populações de progenitores (HARDWICK et al., 2015). Além disso, a desregulação de genes que estão envolvidos no controle do ciclo celular e proliferação de progenitores neurais está relacionada com o atraso na diferenciação neuronal, como demonstrado pelo estudo de Lalli e cols. (2019), onde a repressão de cinco genes específicos

levou à redução da proliferação de células progenitoras neurais e também de crescimento de neuritos (LALLI et al., 2019).

O comprometimento da neurogênese cortical durante a fase pré-natal, pode levar a conexões defeituosas entre o córtex e outras regiões do cérebro, o que pode levar a disfunções cognitivas e deficiência intelectual, como demonstrado por um estudo em modelo animal de Síndrome de Down (ISHIHARA et al., 2010). Outro estudo com células-tronco embrionárias murinas e humanas demonstrou que a expressão reduzida de um fator de transcrição, *Npas4*, prejudicou a capacidade das células de passarem por conversão neural, resultando em um fenótipo de diferenciação neural retardada (KLARIC et al., 2014). Tais estudos são exemplos de como alterações no processo de geração de neurônios podem ser prejudiciais durante o desenvolvimento embrionário.

O fator de transcrição Oct4 é um conhecido marcador de pluripotência que é importante para manter a correta orientação do eixo ântero-posterior durante o desenvolvimento embrionário, de acordo com um estudo em camundongos (MULAS et al., 2018). Além de ativar fatores de pluripotência, Oct4 impede a diferenciação de células pluripotentes por atuar como um repressor de fatores de transcrição linhagem-específicos (SHI; JIN, 2010).

A proteína SOX2 é um fator de transcrição que possui dupla função: a manutenção da pluripotência e a promoção da diferenciação neural de células-tronco embrionárias (ESCs) (ZHANG et al., 2019c). A interação de SOX2 com diferentes parceiros é o que determina a sua função como um fator de pluripotência ou como promotor de diferenciação, sendo OCT4 e PAX6 importantes parceiros de interação para a primeira ou segunda função, respectivamente (ZHANG et al., 2019c). Expresso em células-tronco e células progenitoras neurais, já foi demonstrado que SOX2, em modelo murino, induz a expressão de genes pró-neurais em células tronco adultas e células progenitoras, levando-as à diferenciação de novos neurônios e sendo também importante para o crescimento de dendritos, a formação da espinha dendrítica e a atividade neuronal (AMADOR-ARJONA et al., 2015).

Nestina é uma proteína classificada como filamento intermediário do tipo IV que é considerada, assim como SOX2, um marcador de células progenitoras neurais (CUI et al., 2020), sendo encontrada altamente expressa nessas células e também podendo ser detectada de forma transiente em neurônios (BOTT et al., 2019). Em um estudo de Síndrome de Down (SD), por

exemplo, foi constatado que o defeito na neurogênese estava associado com a diminuição da população de células progenitoras neurais nas neuroesferas de gêmeo com SD, pela diminuição significativa de células positivas para Nestina e SOX2 quando comparado com neuroesferas do gêmeo sem SD (HIBAOU et al., 2014).

Tal resultado indica, então, que as células do paciente encontravam-se atrasadas em relação ao controle quanto à diferenciação neural, uma vez que os marcadores de progenitores neurais em ambos os tempos analisados estavam menos expressos e elas permaneceram altamente proliferativas. Este atraso pode estar sendo causado por uma falha na mudança do estado proliferativo para o estado de células em diferenciação, o que possivelmente se deve à ausência do *locus* do RP11-1082A3.1.

5.6 Expressão de marcadores neurais após *knockdown* do lncRNA RP11-1082A3.1

Após observar que, de fato, existia um atraso na diferenciação das células do paciente em NPCs e neurônios, o próximo passo foi avaliar se o RP11-1082A3.1 poderia ser um dos fatores contribuintes para esse evento. Assim, foi realizado um ensaio de diminuição da expressão do lncRNA em uma linhagem de iPSC para avaliar marcadores neurais após a indução da diferenciação neural dessas células.

Primeiramente, foi realizado um experimento sem nenhuma perturbação na expressão gênica, para avaliar a expressão do RP11-1082A3.1 durante a diferenciação neural das iPSCs. Observou-se que o lncRNA se encontrava expresso nos 3 tempos avaliados (Figura 25), sem diferença nos níveis de expressão durante todo o processo. Esse resultado foi importante para saber que seria possível avaliar a expressão do lncRNA após o *knockdown* por CRISPRi.

Figura 25 - Níveis de expressão do RP11-1082A3.1 durante a diferenciação neural de linhagem de iPSC. D0, dia 0; D6, dia 6; D12, dia 12.

Foi realizada, então, a transfecção das células com os gRNAs desenhados para a região próxima ao sítio de início de transcrição do RP11-1082A3.1, avaliando em seguida a expressão do lncRNA para verificar os guias que efetivamente levaram ao seu *knockdown*. Dos 12 guias transfectados, foi avaliado com sucesso o efeito de 6 deles, pois as células transfectadas com os demais morreram durante a fase de seleção, não sendo então possível extrair RNA. Apesar disso, com os 6 guias avaliados, pôde-se obter um, o gRNA 6, que diminuiu a expressão do lncRNA significativamente (Figura 26).

Figura 26 - Nível de expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 após transfusão das iPSCs com os gRNAs. Em preto (-), células não tratadas com doxiciclina - CRISPRi inativado; em cinza (+), células tratadas com doxiciclina - CRISPRi ativado. *p-valor = 0,0219.

Dessa forma, foram utilizadas as células transfectadas com o gRNA 6 para realizar a diferenciação neural. Após os 12 dias de diferenciação, foi avaliada a expressão dos marcadores Nestina, PAX6 e SOX1 depois do *knockdown* do RP11-1082A3.1. Observa-se que, com a diminuição da expressão do lncRNA, os marcadores avaliados também tiveram sua expressão diminuída, sendo essa diminuição significativa para PAX6 (Figura 27). Além dos marcadores neurais, houve diminuição da expressão do *POU5F1*, também conhecido como *OCT3/4*, um conhecido marcador do estado indiferenciado de ESCs. A diminuição da sua expressão permite que NSCs se diferenciem e, de forma inversa, a manutenção da sua expressão previne a diferenciação neuronal (OKUDA et al., 2004).

Nestina é uma proteína de filamento intermediário tipo IV muito utilizada como marcador de células-tronco neurais (NSCs) (D'AIUTO et al., 2014; MAREI et al., 2017; MEYER et al., 2019) e como marcador de células progenitoras neurais (CUI et al., 2020). Ela está relacionada com o

desenvolvimento do SNC, sendo expressa no tubo neural antes de ocorrer a neurogênese e tendo sua expressão diminuída à medida que as NPCs se diferenciam em células da glia e neurônio maduros (JIN et al., 2009). Em um estudo de diferenciação de células embrionárias murinas, foi demonstrado que a expressão gênica de Nestina aumentou na primeira semana de cultura, diminuindo de forma constante após esse tempo (JOSHI et al., 2016). Apesar disso, já foi demonstrado que a diminuição da expressão de Nestina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, prejudicou o processo de neurogênese cortical pela diminuição da proliferação das NPCs (XUE; YUAN, 2010), o que mostra a sua importância nos estágios iniciais do desenvolvimento neuronal.

Figura 27 - Níveis de expressão dos marcadores neurais Nestina, PAX6 e SOX1, além do marcador de pluripotência Pou5f1, após diferenciação neural com o knockdown do lncRNA RP11-1082A3.1. D0: Dia 0 da diferenciação; D12: Dia 12 da diferenciação; (-): células sem tratamento com doxiciclina, CRISPRi desativado; (+): células tratadas com doxiciclina, CRISPRi ativado. * $p = 0.0379$.

Sox1 é um fator de transcrição pertencente à família SOX, que compreende aproximadamente 20 genes em mamíferos atuantes em variados processos do desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento do SNC (MALAS et al., 2003), no qual ele está envolvido com estágios iniciais da neurogênese (SUTER et al., 2009). Malas e cols. (2003) demonstraram que camundongos que não expressavam *SOX1* durante o desenvolvimento embrionário, apresentavam perda severa de neurônios no estriado ventral, região na qual a atividade neural é fundamental para aprendizagem espacial e consolidação da memória (TORROMINO et al., 2019), levando a quadros convulsivos (MALAS et al., 2003). Em estudo com ESCs murinas, foi demonstrado que a superexpressão de *SOX1* em células sem comprometimento de linhagem favorecia a diferenciação neuroectodérmica. Sua expressão aparenta ser negativamente correlacionada com a expressão de *PAX6*, uma vez que sua superexpressão diminui a expressão de *PAX6* durante a diferenciação neuronal. Dessa forma, nesse modelo, *SOX1* parece ter papel na manutenção das células neuroectodérmicas (SUTER et

al., 2009). Em humanos, *SOX1* também é utilizado como marcador de células-tronco neurais (NSCs) (PALM et al., 2015) e sua expressão não é identificável em hESCs indiferenciadas, mas sim no estágio de rosetas neurais e, diferentemente do que se encontra em camundongos, esse gene começa a ser expresso após o aparecimento de *PAX6* na linha do tempo da diferenciação neuronal (PANKRATZ et al., 2007).

O fator de transcrição *PAX6*, codificado por gene de mesmo nome, é altamente conservado e possui uma função importante no processo de diferenciação neural, podendo atuar, a depender dos seus níveis de expressão, tanto na manutenção da auto-renovação das NSCs como na indução da neurogênese (SANSOM et al., 2009). A sua expressão em células neuroectodérmicas iniciais humanas é crucial para inibir a expressão de genes de pluripotência e para induzir a expressão de genes neurais como *SOX1* e *SOX2* (SUZUKI; VANDERHAEGHEN, 2015). Sansom e cols. (2009) demonstraram, com um ensaio de ganho de função *in vivo*, que a superexpressão de *PAX6* comprometeu precocemente as células-tronco e progenitoras corticais ao destino de progenitores basais iniciais e de neurônios, reduzindo o número de células-tronco disponíveis para neurogênese em estágios mais tardios e gerando camundongos com tamanhos corticais reduzidos (SANSOM et al., 2009). Em outro estudo, foi realizada a análise do transcriptoma de NPCs diferenciadas a partir de células embrionárias de camundongos mutantes para *PAX6*. A análise de enriquecimento demonstrou que genes aos quais *PAX6* se liga e que se encontram diferencialmente expressos para baixo nas células mutantes foram enriquecidos exclusivamente para desenvolvimento neural. Além disso, a via de sinalização Notch, crítica para a auto-renovação das NSCs, foi a mais altamente enriquecida nesse mesmo grupo de genes (THAKURELA et al., 2016), o que indica que a alteração da expressão de *PAX6* influencia diretamente na capacidade das NSCs de se diferenciarem em neurônios.

Dessa forma, a redução significativa da expressão de *PAX6* com a diminuição da expressão do RP11-1082A3.1, assim como a redução da expressão de *Nestina* e *SOX1*, indica que as células tiveram sua capacidade de diferenciação reduzida, se mantendo por mais tempo em um estado de auto-renovação.

5.7 Avaliação da proliferação das iPSCs do paciente após superexpressão do lncRNA RP11-1082A3.1

Para verificar a influência do lncRNA RP11-1082A3.1 na manutenção do estado proliferativo das iPSCs do paciente, e consequente atraso da diferenciação, foi realizada a superexpressão do transcrito nas células tanto do paciente quanto nas de um indivíduo controle (Figura 28A e C). Observou-se que a superexpressão do lncRNA no indivíduo controle não afetou a capacidade proliferativa das células, mantendo os níveis de absorbância observados nas células com o vetor vazio (Figura 28B). No paciente, por outro lado, a superexpressão do RP11-1082A3.1 levou à diminuição significativa da proliferação celular no ponto 128h, quando comparadas às iPSCs com o vetor vazio (Figura 28D). Assim, a diminuição da proliferação causada pela superexpressão do RP11-1082A3.1 nas células do paciente demonstra que ele está envolvido na regulação desse processo.

Figura 28 - Avaliação da capacidade proliferativa das iPSCs após superexpressão do RP11-1082A3.1. A superexpressão do lncRNA nas iPSCs do indivíduo controle (A) não afetou a proliferação nos tempos analisados (B). Por outro lado, a superexpressão do lncRNA nas iPSCs do paciente (C) induziu uma diminuição significativa (**** $p < 0,001$) da proliferação no tempo 168h (D).

O processo de diferenciação envolve uma restrição crescente da capacidade proliferativa celular (YANG et al., 2018), desta forma, a coordenação entre os dois processos necessita de uma

regulação fina para que o tempo correto de mudança entre eles seja alcançado. Nesse sentido, o papel dos lncRNAs na diferenciação celular tem sido descrito na literatura. No estudo de Yang e cols. (2018) foram identificados dois grupos de lncRNAs durante a diferenciação de miócitos – transcritos específicos de proliferação ou diferenciação – tendo sido observado que a repressão daqueles relacionado à proliferação afetava ambos os processos (YANG et al., 2018). Outro estudo demonstrou que o lncRNA BLNCR tinha sua expressão diminuída durante a diferenciação de queratinócitos *in vitro*, sendo sugerido que a perda de expressão desse lncRNA pode estar associada com a perda do potencial proliferativo das células-tronco epidermais comprometidas com a diferenciação (TANIS et al., 2019). No cortex cerebral de camundongos já foi demonstrado que o lncRNA Sox2ot reprime a proliferação de progenitores neurais quando superexpresso, levando também a uma diminuição da neurogênese após o seu *knockdown* (KNAUSS et al., 2018).

Este resultado indica, então, que a deleção do lncRNA encontrada no paciente pode de fato estar causando o atraso na diferenciação neuronal, devido à manutenção do processo proliferativo.

6 Conclusões

- 6.1 A natureza testículo-específica do RP11-1082A3.1 foi validada, indicando uma possível nova isoforma, além de ter sido encontrada a sua expressão em linhagens tumorais, indicando seu possível envolvimento durante o desenvolvimento embrionário;
- 6.2 O lncRNA RP11-1-82A3.1 é um transcrito primata-específico que atua em vias do desenvolvimento embrionário e cerebral, como indicado pelas análises *in silico*;
- 6.3 Foi possível gerar iPSCs a partir do eritroblastos do paciente, o que foi confirmado pela avaliação da morfologia das células em cultura, de marcadores de pluripotência específicos e de ensaio de diferenciação em corpos embrióides;
- 6.4 As iPSCs do paciente apresentaram atraso no processo de diferenciação neuronal, quando comparadas às iPSCs do indivíduo controle, o que foi demonstrado pelo fenótipo das células, alta taxa de proliferação celular, atraso no aparecimento de rosetas neurais e pela menor expressão de marcadores de progenitores neurais;
- 6.5 A diminuição da expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 levou à diminuição da expressão de genes marcadores neuronais em uma linhagem de iPSC após diferenciação neuronal, o que indica que este lncRNA tem influência na diferenciação dessas células, possivelmente atrasando este processo;
- 6.6 A expressão do lncRNA RP11-1082A3.1 atua na regulação da proliferação celular, diminuindo a capacidade proliferativa das iPSCs do paciente

Assim, este trabalho indica pela primeira vez a possível influência do lncRNA RP11-1082A3.1, transcrito até o momento sem nenhuma função conhecida, no processo de diferenciação neuronal, sendo potencialmente importante para o correto tempo de desenvolvimento dos neurônios.

7 Referências

- ACHARYA, A. B.; SÁNCHEZ-MANSO, J. C. Anosognosia. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513361/>>. Acesso em: 14 maio. 2020.
- ADHYA, D. et al. Atypical Neurogenesis in Induced Pluripotent Stem Cells From Autistic Individuals. *Biological Psychiatry*, [s. l.], v. 0, n. 0, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.014>>. Acesso em: 14 set. 2020.
- AGIRRE, X. et al. Long non-coding RNAs discriminate the stages and gene regulatory states of human humoral immune response. *Nature Communications*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08679-z>>. Acesso em: 26 ago. 2020.
- ALESSIO, E. et al. A single cell but many different transcripts: A journey into the world of long non-coding RNAs. [s.l: s.n.]. v. 21
- AMADOR-ARJONA, A. et al. SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 112, n. 15, p. E1936–E1945, 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/112/15/E1936>>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- AMIN, M. A. et al. Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 360, n. 2, p. 320–326, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07012351>>. Acesso em: 17 abr. 2020.
- ANG, C. E. et al. The novel lncRNA lnc-NR2F1 is pro-neurogenic and mutated in human neurodevelopmental disorders. *eLife*, [s. l.], v. 8, 2019.
- ANNA HUPALOWSKA, A. et al. CARM1 and Paraspeckles Regulate Pre-implantation Mouse Embryo Development. *Cell*, [s. l.], v. 175, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.027>>. Acesso em: 8 maio. 2020.
- ARDHANAREESWARAN, K. et al. Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders, *Nature Publishing Group*, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28418023>>. Acesso em: 9 abr. 2020.
- ARÉVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: Many exciting surprises! In: *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* 2006, Anais... [s.l: s.n.] Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-006-6010-1>>. Acesso em: 24 abr. 2020.
- ARNAUD, K. et al. Choroid plexus trophic factors in the developing and adult brain. *Frontiers in Biology*, [s. l.], p. 10, 2016. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02379369>>. Acesso em: 5 jan. 2021.
- BHAT, S. A. et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA Research*, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 43–50, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468054016300063#bib11>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BHATTACHARYA, B. et al. Comparison of the gene expression profile of undifferentiated human embryonic stem cell lines and differentiating embryoid bodies. *BMC Developmental Biology*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 22, 2005. Disponível em: <<http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-5-22>>. Acesso em: 30 out. 2020.

BOTT, C. J. et al. Nestin in immature embryonic neurons affects axon growth cone morphology and Semaphorin3a sensitivity. *Molecular Biology of the Cell*, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 1214–1229, 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6724523/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6724523/?report=abstract)>. Acesso em: 13 ago. 2020.

BOUCKENHEIMER, J. et al. Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. *Human Reproduction Update*, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 19–40, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmw035>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

BUITING, K. et al. C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader–Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics*, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 588–595, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754306003703?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

CABILI, M. N. et al. Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biology*, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 20, 2015. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-015-0586-4>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

CHA, J. M. et al. Embryoid body size-mediated differential endodermal and mesodermal differentiation using polyethylene glycol (PEG) microwell array. *Macromolecular Research*, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 245–255, 2015. Disponível em: <www.springer.com/13233pISSN1598-5032eISSN2092-7673>. Acesso em: 30 out. 2020.

CHAN, S. L. et al. CPSF30 and Wdr33 directly bind to AAUAAA in mammalian mRNA 3' processing. *Genes and Development*, [s. l.], v. 28, n. 21, p. 2370–2380, 2014.

CHEN, H. et al. Human spermatogenesis and its regulation. In: *Contemporary Endocrinology*. Cham: Humana Press Inc., 2017. p. 49–72.

CHEN, X. et al. Flow cytometric analyses of the viability, surface marker expression and function of lymphocytes from children following cryopreservation. *Molecular Medicine Reports*, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 4301–4308, 2016. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2016.5780/abstract>>. Acesso em: 27 out. 2020.

CHOI, D. et al. In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells: Enrichment of Endodermal Cells in the Embryoid Body. *Stem Cells*, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 817–827, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2004-0262>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

CORRADI, P. F.; CORRADI, R. B.; GREENE, L. W. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urologic Clinics of NA*, [s. l.], v. 43, p. 151–162, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.001>>. Acesso em: 9 jun. 2020.

- COSKER, K. E. et al. The RNA-binding protein SFPQ orchestrates an RNA regulon to promote axon viability. *Nature Neuroscience*, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 690–696, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.4280>>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- COSTANZO, V. et al. Exploring the links between cancer and placenta development. *Open Biology*, [s. l.], v. 8, n. 6, 2018.
- CUI, K. et al. Neurodevelopmental impairment induced by prenatal valproic acid exposure shown with the human cortical organoid-on-a-chip model. *Microsystems and Nanoengineering*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–14, 2020. Disponível em: <www.nature.com/micronano>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- D'AIUTO, L. et al. Large-scale generation of human ipsc-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation. *Organogenesis*, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 365–377, 2014. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4594592/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24594592/)>. Acesso em: 1 out. 2020.
- DAY, J. W. et al. Spinocerebellar ataxia type 8 : Clinical features in a large family. *Neurology*, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 649–657, 2000. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.55.5.649>>. Acesso em: 14 maio. 2020.
- DE KRETZER, D. M. et al. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, [s. l.], v. 13, n. suppl 1, p. 1–8, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/13.suppl_1.1>. Acesso em: 9 jun. 2018.
- DE MELLO, J. C. M. et al. Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.
- DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development*, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1010–1022, 2011.
- DICICCO-BLOOM, E. et al. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder, *Society for Neuroscience*, 2006.
- DIEDERICH, S. The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends in Genetics*, [s. l.], v. 30, p. 121–123, 2014. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/genetics/pdf/S0168-9525\(14\)00015-8.pdf](http://www.cell.com/trends/genetics/pdf/S0168-9525(14)00015-8.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2018.
- DJEBALI, S. et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*, [s. l.], v. 488, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature11233.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2017.
- DONAIRES, F. S. et al. Telomere dynamics and hematopoietic differentiation of human DKC1-mutant induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, [s. l.], v. 40, p. 101540, 2019.
- ESPOSITO, D. et al. Non-functioning pituitary adenomas: indications for pituitary surgery and post-surgical management, Springer New York LLC, 2019.
- FALCÃO, A. M. et al. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: Go with the flow!, *Frontiers*, 2012. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 5 jan. 2021.
- FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 42–54, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022916000371>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

FEDOROVA, V. et al. Differentiation of neural rosettes from human pluripotent stem cells in vitro is sequentially regulated on a molecular level and accomplished by the mechanism reminiscent of secondary neurulation. *Stem Cell Research*, [s. l.], v. 40, p. 101563, 2019.

FERRETTI, C. et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Human Reproduction Update*, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 121–141, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-abstract/13/2/121/661135>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

FRAIETTA, R.; ZYLBERSTEJN, D. S.; ESTEVES, S. C. Hypogonadotropic Hypogonadism Revisited. *Clinics*, [s. l.], v. 68, n. Suppl 1, p. 81, 2013.

FREITAS, E. R. L. De et al. Embryonic stem-like cells derived from in vitro produced bovine blastocysts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 495–502, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000300009&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 28 dez. 2020.

FU, K. et al. Biological and RNA regulatory function of MOV10 in mammalian germ cells. *BMC Biology*, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–24, 2019.

GOFF, L. A. et al. Spatiotemporal expression and transcriptional perturbations by long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 112, n. 22, p. 6855–6862, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1411263112>>. Acesso em: 24 out. 2019.

GROTE, P. et al. The Tissue-Specific lncRNA Fendrr Is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Developmental Cell*, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 206–214, 2013. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC4149175/?report=abstract>>. Acesso em: 13 out. 2020.

GROVE, M. et al. Abi2-Deficient Mice Exhibit Defective Cell Migration, Aberrant Dendritic Spine Morphogenesis, and Deficits in Learning and Memory. *Molecular and Cellular Biology*, [s. l.], v. 24, n. 24, p. 10905–10922, 2004.

HARDWICK, L. J. A. et al. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, [s. l.], v. 359, n. 1, p. 187–200, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-014-1895-8>>. Acesso em: 2 ago. 2020.

HELFERICH, A. M. et al. Dysregulation of a novel miR-1825/TBCB/TUBA4A pathway in sporadic and familial ALS. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [s. l.], v. 75, n. 23, p. 4301–4319, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2873-1>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

HEZRONI, H. et al. Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell reports*, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1110–22, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959816>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

HIBAOUI, Y. et al. Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of α -mannosidosis syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21. *EMBO Molecular Medicine*, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 259–277, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/emmm.201302848>>. Acesso em: 14 ago. 2020.

- HONG, S. H. et al. Profiling of testis-specific long noncoding RNAs in mice. *BMC Genomics*, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 539, 2018. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4931-3>>. Acesso em: 28 maio. 2020.
- HOSSEINI, E. et al. The importance of long non-coding RNAs in neuropsychiatric disorders, Elsevier Ltd, 2019.
- HSUEH, Y.-P. Synaptic Formation, Neural Circuits and Neurodevelopmental Disorders Controlled by Signaling, Translation, and Epigenetic Regulation. *Developmental Neurobiology*, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 2–7, 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.22655>>. Acesso em: 1 set. 2020.
- HU, C. et al. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders, Japanese Pharmacological Society, 2016.
- HU, G. et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis, Impact Journals LLC, 2018. Disponível em: <pmc/articles/PMC5915100/?report=abstract>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- HWANG, B.; LEE, J. H.; BANG, D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines, Nature Publishing Group, 2018.
- ISHIHARA, K. et al. Enlarged Brain Ventricles and Impaired Neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje Mouse Models of Down Syndrome. *Cerebral Cortex*, [s. l.], v. 20, p. 1131–1143, 2010. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 5 ago. 2020.
- ITOKAZU, Y. et al. Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat. *Glia*, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 32–42, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20255>>. Acesso em: 5 jan. 2021.
- JAIN, A. K. et al. LncPRESS1 Is a p53-Regulated LncRNA that Safeguards Pluripotency by Disrupting SIRT6-Mediated De-acetylation of Histone H3K56. *Molecular cell*, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 967–981, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912097>>. Acesso em: 11 jan. 2018.
- JALALI, S. et al. Systematic Transcriptome Wide Analysis of lncRNA-miRNA Interactions. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e53823, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053823>>. Acesso em: 21 abr. 2020.
- Ji, Z. et al. Many lncRNAs, 5'UTRs, and pseudogenes are translated and some are likely to express functional proteins. *eLife*, [s. l.], v. 4, n. DECEMBER2015, 2015. Disponível em: <pmc/articles/PMC4739776/?report=abstract>. Acesso em: 11 dez. 2020.
- JIN, Z. et al. Different Transcription Factors Regulate nestin Gene Expression during P19 Cell Neural Differentiation and Central Nervous System Development. *Journal of Biological Chemistry*, [s. l.], v. 284, n. 12, p. 8160–8173, 2009. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M805632200>>. Acesso em: 2 out. 2020.
- JOHNSSON, P. et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et biophysica acta*, [s. l.], v. 1840, n. 3, p. 1063–71, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184936>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

JOSHI, R. et al. Molecular Analysis of Stromal Cells-Induced Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE*, [s. l.], v. 11, n. 11, p. e0166316, 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166316>>. Acesso em: 2 out. 2020.

KARWACKI-NEISIUS, V. et al. Cell Stem Cell Article Reduced Oct4 Expression Directs a Robust Pluripotent State with Distinct Signaling Activity and Increased Enhancer Occupancy by Oct4 and Nanog. *Stem Cell*, [s. l.], v. 12, p. 531–545, 2013. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

KAUR, C.; RATHNASAMY, G.; LING, E. A. The choroid plexus in healthy and diseased brain, Lippincott Williams and Wilkins, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnen/article/75/3/198/1848403>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

KHLONGKHLAEO, A. et al. Comparison of methods for deriving neural progenitor cells from nonhuman primate embryonic stem cells. *Asian Biomedicine*, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 423–433, 2016. Disponível em: <<https://content.sciendo.com/view/journals/abm/10/5/article-p423.xml>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

KINTNER, C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells, Society for Neuroscience, 2002. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/22/3/639>>. Acesso em: 6 out. 2020.

KLARIC, T. S. et al. A reduction in Npas4 expression results in delayed neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 64, 2014. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/5/3/64>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

KNAUSS, J.L., MIAO, N., KIM, S.N. et al. Long noncoding RNA Sox2ot and transcription factor YY1 co-regulate the differentiation of cortical neural progenitors by repressing Sox2. *Cell Death & Disease*, v. 9, n. 799, 2018.

KNOTT, G. J.; BOND, C. S.; FOX, A. H. SURVEY AND SUMMARY The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 3989–4004, 2016.

LAI, F.; SHIEKHATTAR, R. Where long noncoding RNAs meet DNA methylation. *Cell Research*, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 263–264, 2014.

LALLI, M. et al. High-throughput single-cell functional elucidation of neurodevelopmental disease-associated genes reveals convergent mechanisms altering neuronal differentiation. *bioRxiv*, [s. l.], p. 862680, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/862680>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

LARSON, M. H. et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2180–2196, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2013.132>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

LEE, H.; ZHANG, Z.; KRAUSE, H. M. Long Noncoding RNAs and Repetitive Elements: Junk or Intimate Evolutionary Partners?, Elsevier Ltd, 2019.

LI, F. et al. Spatiotemporal-specific lncRNAs in the brain, colon, liver and lung of macaque during development. *Molecular BioSystems*, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 3253–3263, 2015. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/mb/c5mb00474h>>. Acesso em: 23 jun. 2020.

- LI, G. et al. Dysregulation of the SIRT1/OCT6 Axis Contributes to Environmental Stress-Induced Neural Induction Defects. *Stem Cell Reports*, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1270–1286, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.017>>. Acesso em: 30 ago. 2020.
- LI, H. et al. A novel small deletion in the NHS gene associated with Nance-Horan syndrome. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.
- LI, X.-J.; ZHANG, S.-C. In Vitro Differentiation of Neural Precursors From Human Embryonic Stem Cells. In: *Human Embryonic Stem Cell Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2006. v. 331p. 168–178.
- LIANG, M. et al. Sequential expression of long noncoding RNA as mRNA gene expression in specific stages of mouse spermatogenesis. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–6, 2014.
- LIDDELOW, S. A. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier, *Frontiers Media S.A.*, 2015. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 5 jan. 2021.
- LIN, N. et al. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular Cell*, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1005–1019, 2014.
- LINDSAY, S. J. et al. HDBR Expression: A Unique Resource for Global and Individual Gene Expression Studies during Early Human Brain Development. *Frontiers in Neuroanatomy*, [s. l.], v. 10, p. 86, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2016.00086/full>>. Acesso em: 4 dez. 2018.
- LIU, G. et al. *Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications*, Springer, 2020.
- LIU, S. J. et al. Single-cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex. *Genome Biology*, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 67, 2016. Disponível em: <<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-0932-1>>. Acesso em: 23 out. 2019.
- LUN, M. P.; MONUKI, E. S.; LEHTINEN, M. K. Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system. *Nature Reviews Neuroscience*, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 445–457, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn3921>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- MALAS, S. et al. Sox1-deficient mice suffer from epilepsy associated with abnormal ventral forebrain development and olfactory cortex hyperexcitability. *Neuroscience*, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 421–432, 2003.
- MAO, B. et al. Early Development of Definitive Erythroblasts from Human Pluripotent Stem Cells Defined by Expression of Glycophorin A/CD235a, CD34, and CD36. *Stem Cell Reports*, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 869–883, 2016. Disponível em: <pmc/articles/PMC5106477/?report=abstract>. Acesso em: 26 out. 2020.
- MARAHRENS, Y. et al. Xis t-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes & development*, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 156–66, 1997. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/11/2/156.full.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- MARCHETTO, M. C. N. et al. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, [s. l.], v. 143, n. 4, p. 527–539, 2010. Disponível em: <pmc/articles/PMC3003590/?report=abstract>. Acesso em: 13 set. 2020.

MAREI, H. E. et al. Genetically unmatched human iPSC and ESC exhibit equivalent gene expression and neuronal differentiation potential. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports/>. Acesso em: 1 out. 2020.

MARTINEZ, F. J. et al. Protein-RNA Networks Regulated by Normal and ALS-Associated Mutant HNRNPA2B1 in the Nervous System. *Neuron*, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 780–795, 2016.

MASOTTI, A. et al. Keppen-lubinsky syndrome is caused by mutations in the inwardly rectifying K⁺ channel encoded by KCNJ6. *American Journal of Human Genetics*, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 295–300, 2015.

MATTIAZZI USAJ, M. et al. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology, Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892416300010>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

MCKINNEY, C. E. Using induced pluripotent stem cells derived neurons to model brain diseases, Medknow Publications, 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5558480/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35558480/)>. Acesso em: 13 set. 2020.

MEISSNER, A. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, [s. l.], v. 454, n. 7205, p. 766–770, 2008.

MEYER, K. et al. REST and Neural Gene Network Dysregulation in iPSC Models of Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1112–1127.e9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.023>>. Acesso em: 1 out. 2020.

MEYERS, E. A.; KESSLER, J. A. TGF- β family signaling in neural and neuronal differentiation, development, and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [s. l.], v. 9, n. 8, 2017.

MIRCISO, D. et al. Mutations in NONO lead to syndromic intellectual disability and inhibitory synaptic defects. *Nature Neuroscience*, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1731–1736, 2015.

MONDAL, T. et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nature Communications*, [s. l.], v. 6, 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4525211/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2525211/)>. Acesso em: 25 ago. 2020.

MULAS, C. et al. Oct4 regulates the embryonic axis and coordinates exit from pluripotency and germ layer specification in the mouse embryo. *Development (Cambridge)*, [s. l.], v. 145, n. 12, 2018. Disponível em: <<https://dev.biologists.org/content/145/12/dev159103>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

NG, S.-Y.; JOHNSON, R.; STANTON, L. W. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *The EMBO Journal*, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 522–533, 2012. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.459>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

OHATA, T. et al. Lineage-specific function of the noncoding Tsix RNA for Xist repression and Xi reactivation in mice. *Genes and Development*, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 1702–1715, 2011.

OKUDA, T. et al. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo. *Molecular Brain Research*, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 18–30, 2004.

OMOLE, A. E.; FAKOYA, A. O. J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: Historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*, [s. l.], v. 2018, n. MAY, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29770269/>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

PALM, T. et al. Rapid and robust generation of long-term self-renewing human neural stem cells with the ability to generate mature astroglia. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 5, p. 16321–16321, 2015. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 7 out. 2020.

PANKRATZ, M. T. et al. Directed Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells via an Obligated Primitive Anterior Stage. *Stem Cells*, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1511–1520, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0707>>. Acesso em: 7 out. 2020.

PARASKEVOPOULOU, M. D. et al. DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 44, 2015.

PARASKEVOPOULOU, M. D.; HATZIGEORGIOU, A. G. Analyzing MiRNA–LncRNA interactions. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l.] : Humana Press Inc., 2016. v. 1402p. 271–286.

PARENTI, I. et al. *Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways*, Elsevier Ltd, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>>. Acesso em: 2 set. 2020.

PARK, Y. et al. NonO binds to the CpG island of oct4 promoter and functions as a transcriptional activator of oct4 gene expression. *Molecules and Cells*, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 61–69, 2013.

PASTORI, C. et al. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Human Genetics*, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 59–67, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00439-013-1356-6>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

PEKKANEN-MATTILA, M. et al. Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies. *Histochemistry and Cell Biology*, [s. l.], v. 133, n. 5, p. 595–606, 2010. Disponível em: <<http://www.ge.com>>. Acesso em: 30 out. 2020.

PEREIRA, M. A.; IMADA, E. L.; GUEDES, R. L. M. RNA-seq: Applications and Best Practices. In: *Applications of RNA-Seq and Omics Strategies - From Microorganisms to Human Health*. [s.l.] : InTech, 2017.

PERRON, U.; PROVERO, P.; MOLINERIS, I. In silico prediction of lncRNA function using tissue specific and evolutionary conserved expression. *BMC bioinformatics*, [s. l.], v. 18, n. Suppl 5, p. 144, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28361701>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

PERRY, R. B. T.; ULITSKY, I. *The functions of long noncoding RNAs in development and stem cells*, Company of Biologists Ltd, 2016.

PESCHANSKY, V. J. et al. The long non-coding RNA FMR4 promotes proliferation of human neural precursor cells and epigenetic regulation of gene expression in trans. *Molecular and Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 74, p. 49–57, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743116300227>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

PIRIYAPONGSA, J.; JORDAN, I. K. A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 2, n. 2, 2007.

PLATZER, K.; LEMKE, J. R. GRIN2B-Related Neurodevelopmental Disorder. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29851452>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

PRASONGCHEAN, W. et al. The neural milieu of the developing choroid plexus: Neural stem cells, neurons and innervation. *Frontiers in Neuroscience*, [s. l.], v. 9, n. MAR, 2015.

QIU, J. et al. Identification and functional analysis of long non-coding RNAs in human and mouse early embryos based on single-cell transcriptome data. *Oncotarget*, [s. l.], v. 7, n. 38, p. 61215–61228, 2016. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/11304>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

RAMOS, A. D. et al. Integration of genome-wide approaches identifies lncRNAs of adult neural stem cells and their progeny in vivo. *Cell Stem Cell*, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 616–628, 2013.

RAMOS, A. D. et al. The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells. *Cell stem cell*, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 439–447, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25800779>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

RASKIN, J. et al. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Current Alzheimer Research*, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 712–722, 2015.

RAY, P. F.; WINSTON, R. M. L.; HANDYSIDE, A. H. XIST expression from the maternal X chromosome in human male preimplantation embryos at the blastocyst stage *Human Molecular Genetics*. [s.l.] : Oxford University Press, 1997.

RODRÍGUEZ-LORENZO, S. et al. Altered secretory and neuroprotective function of the choroid plexus in progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 35, 2020. Disponível em: <<https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-020-00903-y>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

ROLLAND, A. D. et al. RNA profiling of human testicular cells identifies syntenic lncRNAs associated with spermatogenesis. *Human Reproduction*, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1278–1290, 2019.

RUIJTENBERG, S.; VAN DEN HEUVEL, S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression, Taylor and Francis Inc., 2016.

RUIZ-ORERA, J. et al. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife*, [s. l.], v. 3, 2014.

SAMSEL, L.; MCCOY, J. P. Imaging flow cytometry for the study of erythroid cell biology and pathology. *Journal of Immunological Methods*, [s. l.], v. 423, p. 52–59, 2015. Disponível em: <pmc/articles/PMC4522225/?report=abstract>. Acesso em: 26 out. 2020.

SÁNCHEZ, M. P. et al. Brain atrophy as a marker of cognitive impairment in mildly disabling relapsing-remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1091–1099, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2008.02259.x>>. Acesso em: 14 maio. 2020.

SANSOM, S. N. et al. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genetics*, [s. l.], v. 5, n. 6, 2009. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2686252/?report=abstract](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000452)>. Acesso em: 3 out. 2020.

SAUVAGEAU, M. et al. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *eLife*, [s. l.], v. 2013, n. 2, 2013.

SHAH, K. et al. Unravelling the link between embryogenesis and cancer metastasis. *Gene*, [s. l.], v. 642, p. 447–452, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811191731020X>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

SHEN, M. D. et al. Early brain enlargement and elevated extra-axial fluid in infants who develop autism spectrum disorder. *Brain*, [s. l.], v. 136, n. 9, p. 2825–2835, 2013. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3754460/?report=abstract](https://doi.org/10.1093/brain/aww282)>. Acesso em: 5 jan. 2021.

SHERIDAN, S. D.; SURAMPUDI, V.; RAO, R. R. Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells International*, [s. l.], v. 2012, 2012.

SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency, *BioMed Central*, 2010. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/1/5/39>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

SHI, Y. et al. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, [s. l.], v. 75, p. 111–116, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332215001717>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

SKARIAH, G. et al. Mov10 suppresses retroelements and regulates neuronal development and function in the developing brain. *BMC Biology*, [s. l.], v. 15, n. 1, 2017.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. *Neuropsychology review*, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 327–48, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042938>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

STRÄSSLER, E. T. et al. Age Is Relative–Impact of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cell Functionality. *Frontiers in cardiovascular medicine*, [s. l.], v. 5, p. 4, 2018. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29423397](https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00042)>. Acesso em: 15 fev. 2019.

SULLIVAN, S. et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Medicine*, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 859–866, 2018. Disponível em: <[https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/rme-2018-0095](https://doi.org/10.1016/j.rme.2018.00095)>. Acesso em: 16 out. 2018.

SUTER, D. M. et al. A Sox1 to Pax6 Switch Drives Neuroectoderm to Radial Glia Progression During Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 49–58, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2008-0319>>. Acesso em: 6 out. 2020.

SUZUKI, I. K.; VANDERHAEGHEN, P. Is this a brain which i see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells, *Company of Biologists Ltd*, 2015. Disponível em: <<https://dev.biologists.org/content/142/18/3138>>. Acesso em: 7 out. 2020.

SUZUKI, T. et al. Molecular Cloning of a Novel Apoptosis-Related Gene, Human Nap1 (NCKAP1), and Its Possible Relation to Alzheimer Disease. *Genomics*, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 246–254, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754399960536>>. Acesso em: 14 maio. 2020.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, [s. l.], v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TANIS, S.E.J., KÖKSAL, E.S., VAN BUGGENUM, J.A.G.L. et al. BLNCR is a long non-coding RNA adjacent to integrin beta-1 that is rapidly lost during epidermal progenitor cell differentiation. *Scientific Reports*, v. 9, n. 31, 2019.

TELIAS, M.; SEGAL, M.; BEN-YOSEF, D. Neural differentiation of fragile X human embryonic stem cells reveals abnormal patterns of development despite successful neurogenesis. *Developmental Biology*, [s. l.], v. 374, n. 1, p. 32–45, 2013.

TENG, X. et al. NPInter v4.0: an integrated database of ncRNA interactions. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 48, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-abstract/48/D1/D160/5610361>>. Acesso em: 13 abr. 2020.

TERAI, G. et al. Comprehensive prediction of lncRNA–RNA interactions in human transcriptome. *BMC Genomics*, [s. l.], v. 17, n. S1, p. 12, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818453>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

THAKURELA, S. et al. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discovery*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–22, 2016. Disponível em: <www.nature.com/celldisc>. Acesso em: 3 out. 2020.

THAPAR, A.; COOPER, M.; RUTTER, M. *Neurodevelopmental disorders*, Elsevier Ltd, 2017. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S2215036616303765/fulltext>>. Acesso em: 1 set. 2020.

THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM. A User's Guide to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). *PLoS Biol*, [s. l.], v. 9, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.1001046&type=printable>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

TORROMINO, G. et al. Offline ventral subiculum-ventral striatum serial communication is required for spatial memory consolidation. *Nature Communications*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13703-3>>. Acesso em: 7 out. 2020.

TOUTAIN, A.; AYRAULT, A.-D.; MORAIN, C. Mental retardation in Nance-Horan syndrome: Clinical and neuropsychological assessment in four families. *American Journal of Medical Genetics*, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 305–314, 1997. Disponível em: <[https://sci-hub.tw/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19970822\)71:3%3C305::aid-ajmg11%3E3.0.co;2-o](https://sci-hub.tw/10.1002/(sici)1096-8628(19970822)71:3%3C305::aid-ajmg11%3E3.0.co;2-o)>. Acesso em: 9 maio. 2020.

TROVERO, M. F. et al. Revealing stage-specific expression patterns of long noncoding RNAs along mouse spermatogenesis. *RNA Biology*, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 350–365, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2019.1700332>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

ULITSKY, I. Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.weizmann.ac.il/Biological_Regulation/IgorUlitsky/sites/Biological_Regulation/IgorUlitsky/files/publications/ulitsky.nrg_.2016.85.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2018.

VALAMEHR, B. et al. Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 105, n. 38, p. 14459–14464, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807235105>>. Acesso em: 28 dez. 2020.

VAN DEN BERGE, K. et al. Annual Review of Biomedical Data Science RNA Sequencing Data: Hitchhiker's Guide to Expression Analysis INTRODUCTION: OVERVIEW OF THE RNA SEQUENCING ASSAY. *Annu. Rev. Biomed. Data Sci*, [s. l.], v. 2, p. 139–173, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-072018->>. Acesso em: 13 jun. 2020.

WAHEEB, R.; HOFMANN, M. C. Human spermatogonial stem cells: A possible origin for spermatocytic seminoma, NIH Public Access, 2011.

WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 904–14, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925379>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

WANG, S.; MAO, C.; LIU, S. Peptides encoded by noncoding genes: Challenges and perspectives, Springer Nature, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41392-019-0092-3>>. Acesso em: 4 nov. 2020.

WANG, W.; WHORTON, M. R.; MACKINNON, R. Quantitative analysis of mammalian GIRK2 channel regulation by G proteins, the signaling lipid PIP2 and Na⁺ in a reconstituted system. *eLife*, [s. l.], v. 3, p. e03671, 2014.

WANG, Y. et al. Genome-wide differential expression of synaptic long noncoding RNAs in autism spectrum disorder. *Translational Psychiatry*, [s. l.], v. 5, n. 10, p. e660–e660, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/tp2015144>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

WASHIETL, S.; KELLIS, M.; GARBER, M. Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals. *Genome Research*, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 616–628, 2014.

WESTERS, T. M. et al. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica*, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 308–319, 2017. Disponível em: <pmc/articles/PMC5286938/?report=abstract>. Acesso em: 26 out. 2020.

WU, P. et al. Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA, BioMed Central Ltd., 2020. Disponível em: <pmc/articles/PMC6998289/?report=abstract>. Acesso em: 7 dez. 2020.

WU, Z. et al. Long noncoding RNAs of single hematopoietic stem and progenitor cells in healthy and dysplastic human bone marrow. *Haematologica*, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 894–906, 2019. Disponível em: <www.haematologica.org/content/104/5/894>. Acesso em: 27 ago. 2020.

XING, W.; ZENG, C. A novel serum microRNA-based identification and classification biomarker of human glioma. *Tumor Biology*, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 101042831770533, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317705339>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

- XU, C. et al. Long non-coding RNA GAS5 controls human embryonic stem cell self-renewal by maintaining NODAL signalling. *Nature Communications*, [s. l.], v. 7, p. 13287, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms13287>>. Acesso em: 11 jan. 2018.
- XU, Z. et al. The temporal expression patterns of brain transcriptome during chicken development and ageing. *BMC Genomics*, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 917, 2018. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5301-x>>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- XUE, X. J.; YUAN, X. B. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 26–36, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743110001089>>. Acesso em: 28 dez. 2020.
- YAGI, T. et al. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 7, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22848530/>>. Acesso em: 1 jul. 2020.
- YANG, Q. et al. Analysis of LncRNA expression in cell differentiation. *RNA Biology*, v. 5, n. 3, p. 413–422, 2018.
- YOKOTA, Y. et al. Nap1-Regulated Neuronal Cytoskeletal Dynamics Is Essential for the Final Differentiation of Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 429–445, 2007.
- YOUSEFI, H. et al. Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance, Springer Nature, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41388-019-1040-y>>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- YUNUSOV, D. et al. HIPSTR and thousands of lncRNAs are heterogeneously expressed in human embryos, primordial germ cells and stable cell lines. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 32753, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605307>>. Acesso em: 11 jan. 2018.
- ZHANG, H. et al. Long noncoding RNA and protein interactions: From experimental results to computational models based on network methods. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 20, n. 6, 2019. a.
- ZHANG, L. et al. LncRNA Riken-201 and Riken-203 modulates neural development by regulating the Sox6 through sequestering miRNAs. *Cell Proliferation*, [s. l.], v. 52, n. 3, p. e12573, 2019. b. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cpr.12573>>. Acesso em: 30 ago. 2020.
- ZHANG, S. et al. OCT4 and PAX6 determine the dual function of SOX2 in human ESCs as a key pluripotent or neural factor. *Stem Cell Research & Therapy*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 122, 2019. c. Disponível em: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1228-7>>. Acesso em: 19 jul. 2020.
- ZHANG, X. et al. LncRNA MACC1-AS1 sponges multiple miRNAs and RNA-binding protein PTBP1. *Oncogenesis*, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1–13, 2019. d. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41389-019-0182-7>>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- ZHANG, Y.; YANG, L.; CHEN, L.-L. Life without A tail: New formats of long noncoding RNAs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, [s. l.], v. 54, p. 338–349, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272513003269?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

ZHONG, J. et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, [s. l.], v. 65, p. 183–194, 2017.

8 Anexos

8.1 Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 24 de janeiro de 2019.

Ofício nº 236/2019
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 11885/2018

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado “**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO RNA LONGO NÃO CODIFICADOR RP11-1082A3.1**” – Projeto de Pesquisa Versão 2 data 29/11/1, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Biorrepositório versão 2 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 data 29/11/1.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRA. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

ISABELA ICHIHARA DE BARROS

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON ARAÚJO DA SILVA JÚNIOR

Depto. de Genética – FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016)3602-2228/ e-mail cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

8.2 Anexo B – Manuscrito aceito para publicação

Review

Non-syndromic intellectual disability and its pathways: a long noncoding RNA perspective

Isabela I. Barros ¹, Vitor Leão ¹, Jessica O. Santis ¹, Reginaldo C. A. Rosa ¹, Danielle B. Brotto ¹, Camila B. Storti ¹, Ádamo D. D. Siena ¹, Greice A. Molfetta ¹, Wilson A. Silva Jr ^{1, 2, 3, *}

¹ Department of Genetics – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil, CEP: 14049-900; isabelaib@usp.br, vitor.leao.vleao@gmail.com, jolisantis@gmail.com, reginaldo.usp@gmail.com, daniellebrotto@gmail.com, camilabaldin.s@gmail.com, adamo@usp.br, gamolf@gmail.com, wilsonjr@usp.br

² National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy and Center for Cell Based Therapy, Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil, CEP: 14051-140; wilsonjr@usp.br

³ Center for Integrative Systems Biology - CISBi, NAP/USP, Rua Catão Roxo, 2501, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil, CEP: 14051-140; wilsonjr@usp.br

⁴ Institute for Cancer Research, Guarapuava, Rua Fortim Atalaia, nº 1900, Cidade dos Lagos, Guarapuava, PR, Brazil, CEP: 85.100-000, wilsonjr@usp.br

* Correspondence: wilsonjr@usp.br; Tel.: +55 16 3315-3293

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Non-syndromic intellectual disability (NS-ID or idiopathic) is a complex neurodevelopmental disorder that represents a global health issue. Although many efforts have been made to characterize it and distinguish it from syndromic intellectual disability (S-ID), the highly heterogeneous aspect of this disorder makes it difficult to understand its etiology. Long noncoding RNAs (lncRNAs) comprise a large group of transcripts that can act through various mechanisms and be involved in important neurodevelopmental processes. In this sense, comprehending the roles they play in this intricate context is a valuable way of getting new insights about how NS-ID can arise and develop. In this review, we attempt to bring together knowledge available in the literature about lncRNAs involved with molecular and cellular pathways already described in intellectual disability and neural function, to better understand their relevance in NS-ID and the regulatory complexity of this disorder.

Keywords: Long noncoding RNA; Non-syndromic Intellectual disability; Molecular and cellular pathways; Neurodevelopment; Neural function.

1. Intellectual disability

Intellectual disability (ID) is characterized by significant intellectual functioning limitation and adaptive behavior occurring before the age of 18 [1]. It is usually defined by an intelligence quotient (IQ) of less than 70 and severe deficiency in the environment and social milieu adaptation [2], which can be caused

by genetic, prenatal, and environmental factors, representing a health issue in both developed and developing countries [3].

ID can be classified by severity into five categories (mild, moderate, severe, profound, and unable to classify), and it is also divided into syndromic intellectual disability, which includes patients with one or more clinical co-morbidities in addition to ID, and non-syndromic intellectual disability, where ID is the exclusive clinical feature [4]. Distinguishing NS-ID from S-ID is not easy because subtle neurological anomalies and psychiatric disorders are more difficult to diagnose due to the non-specific cognitive impairment [5]. Despite that, many mutations have been identified in genes related to non-syndromic intellectual disability [6-9]. More than 200 candidate genes have been associated with NS-ID, most of which are not shared between NS-ID and S-ID and/or neurological and neuropsychiatric diseases [10]. Taken all together, these show the efforts being made to understand the etiology of NS-ID and demonstrate the complexity of trying to define this heterogeneous disorder.

2. LncRNAs

Long noncoding RNAs form a large and miscellaneous group of non-protein-coding RNAs, defined as transcripts of more than 200 nucleotides in length. They can regulate gene transcription through a great variety of mechanisms, such as: by the interaction with chromatin-modifying complexes, by binding to other RNA-binding factors which can induce or repress transcription, by acting as enhancers, and by acting as decoys [11]. Because of this wide variety of possible functions, they have been identified and described as acting in countless biological processes, including human embryonic development and neurodevelopment.

In the early stages of human fetal growth, it has been shown that lncRNAs represent the most abundant class of transcripts, both during and after embryonic gene activation [12]. Many of them also have been described as human embryonic stem cells (hESCs) pluripotency regulators, like lncPRESS1, that controls a gene network that controls pluripotency [13], and GAS5, a lncRNA that is directly regulated by pluripotency factors and acts on hESCs self-renewal [14]. Additionally, they have also been described during brain development, a very genetically organized and dynamic process [15], where neural induction takes place. Failures in any step of this process can lead to neurological and cognitive impairments [16], highlighting the importance of a fine and coordinated regulation for healthy brain development. Some lncRNAs have already been associated with neural development, such as PNKY, a transcript involved in the suppression of neuronal commitment of neural stem cells (NSCs) [17], and FMR4, a lncRNA that promotes the proliferation of human neural precursor cells (NPCs) [18].

In this context, some lncRNAs have also been directly associated with several neurodevelopmental disorders that have an intellectual disability as one of their characteristics, like autism spectrum disorder (ASD) [19-21], Fragile X syndrome [22], Prader-Willi syndrome [23], Rett syndrome [24], and Angelman syndrome [25]. However, many neurodevelopmental disorders are associated with defective neural differentiation and circuit formation [26], most genes known to cause these diseases belong to a few molecular pathways that are commonly affected [27]. Additionally, little is known about how lncRNAs may be regulating those pathways and how they can be involved in ID. Indeed, scientific articles regarding “lncRNA and intellectual disability” in the PubMed database returns less than 100 articles spanning the last 27 years, and, in a more stringent search, less than 20 articles if the query is specified for “Text word” or “Title/Abstract”.

In this review, we sought to explore the roles of lncRNAs in the main pathways involved in NS-ID [4,28] to contribute to the elucidation of its complex regulation network.

3. LncRNAs and pathways involved in non-syndromic intellectual disability and neural development

3.1. *Wnt/β-catenin pathway*

The Wingless (Wnt) gene family encodes secreted signaling proteins that direct cell proliferation, cell polarity, and cell fate determination during embryonic development and tissue homeostasis [29]. The canonical Wnt signaling pathway (Wnt/β-catenin) governs a developmental cascade by regulating the amount of the transcriptional co-regulator β-catenin within the cell, controlling critical gene expression programs involved in cell proliferation, differentiation, cell adhesion [30], as well as epigenetic/transcriptional regulation [31]. Disbalanced expression of these proteins can disrupt the central nervous system's normal development and cause loss of neurons, fostering neurological disorders [32,33].

Next-generation sequencing enabled better comprehension of multiple dominant mutations in the gene encoding β-catenin, clarifying its role in cognitive impairment and bringing in vivo evidence that deregulation of this pathway leads to intellectual disability [32,34]. Despite the lncRNAs inability to code for proteins, it is widely accepted that these molecules can modulate a diverse range of biological processes, including the Wnt/β-catenin signaling pathway [35,36].

Notably, the central nervous system expresses a great diversity of lncRNAs, suggesting that their dysregulation plays a critical role in neurological conditions [37,38]. A few lncRNAs have been described to regulate coding genes that are part of the canonical Wnt signaling pathway. For instance, mice experiments showed that downregulation of the Maternally Expressed Gene 3 (MEG3), a lncRNA commonly found overexpressed in neurons of the forebrain of mice [39], modulates Wnt/β-catenin signaling pathway, enhancing nerve growth and alleviating neurological impairment of rats after brain injury [40]. The lncRNA Neat1 was recently reported to enhance the protein levels of core factors of the Wnt/β-catenin signaling pathway affecting neuroinflammation damage [41]. Further evidence points out that the signaling axis miR-124-Neat1-Wnt/β-catenin plays an essential role in regulating neuronal differentiation, apoptosis, and migration of mouse spinal cord progenitor cells (SC-NPCs) [42]. This study showed that overexpression of miR-124 enhanced the expression of the lncRNA Neat1 and positively regulated mRNAs involved in the Wnt/β-catenin pathway. Although the focus is on the therapeutic effectiveness of miR-124/Neat1 for spinal cord injury, clarifying the role of lncRNAs in promoting neuronal differentiation may be relevant to unravel ID pathways [42].

A modulator of the canonical Wnt/β-catenin signaling pathway, the SOX family of transcription factors, is widely known for its role in the developing nervous system. For instance, Sox2 is expressed in neural stem cells regulating self-renewal and differentiation into neurons [43,44]. However, Sox genes suffer regulation by lncRNAs, as shown by Shi-Yan Ng et al. (2013), that nuclear lncRNA RMST regulates neuronal differentiation and associates with transcription factor SOX2. The author also reported that Sox2, and RMST regulate common targets and RMST downregulation affects SOX2 genome binding [45]. Other lncRNAs that have also been described interfering in SOX regulation include Sox2ot [46] and lincRNA-RoR [47]. The study of genes that affect neurodevelopment, and are associated with diseases that do not start in childhood, is also useful to understand intellectual disorders. DISC1 gene, initially described in schizophrenia [48], interacts directly with the GSK3β, inhibiting its activity and leading to β-catenin stabilization. This cascade exerts an influence on neural progenitor proliferation [48]. DISC1 was reported to have the alternative

splicing induced by the long non-coding RNA MIAT, leading to its downregulation and disturbing neurodevelopmental mechanisms [49,50].

As shown in this review, much still needs to be unraveled about how long non-coding RNAs regulate genes related to intellectual deficiency. These findings corroborate these molecules' critical role in controlling different components of the Wnt/B-signaling pathway during the earliest stages of neural development.

3.2. Notch pathway

In the developing nervous system, the Notch signaling pathway is involved in repressing neural differentiation-inducing genes, thus preventing NSCs from differentiating and maintaining these embryonic cells [51]. This pathway is important in regulating the balance between stem cell maintenance and proper neuronal differentiation, so the correct timing is achieved, and the necessary quantity of neurons is produced [52]. It is a highly conserved pathway that, in mammals, contains four receptors (Notch 1-4) and five ligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jagged-1, and Jagged-2). Upon ligation of the ligand with the receptor, a proteolytic cleavage occurs, releasing the Notch intracellular domain that translocates to the nucleus and promotes transcription of target genes by interacting with the protein RBPJ [53].

It has already been demonstrated that the ablation of the receptor Notch1 in neuroepithelial cells leads to premature differentiation and apoptosis, failing to generate neural cells [54], which may significantly impact the central nervous system (CNS) development. It was also demonstrated that two essential effectors of the Notch signaling are crucial for maintaining the embryonic nervous system structure, keeping the organization and morphology of the cells [55]. Additionally, pathogenic variants of the Notch ligand Dll1 have recently been suggested as causative of a neurodevelopmental phenotype in a cohort whose individuals presented with developmental delay, intellectual disability, and brain malformations [56].

Understanding how lncRNAs may regulate the Notch signaling pathway can bring important highlights about their roles in ID. In 2006, Rani et al. functionally characterized a novel lncRNA, LncND, in a neurodevelopmental disorder related to a microdeletion at 2p25.3, including the LncND locus, and showing ID as one of its phenotypic characteristics. This primate-specific transcript is highly expressed in early neural progenitor cells, and it was demonstrated that it acts as a miRNA sponge. Furthermore, this lncRNA sequesters miR-143-3p and regulates Notch signaling since this miRNA targets NOTCH-1 and NOTCH-2 mRNAs. Through LncND knockdown experiments, they showed that cells underwent premature differentiation of neural precursor cells, and through an in vivo overexpression assay, they observed that this lncRNA regulates the expansion of radial glial cells in the murine developing cortex [57].

In an investigation of the transcriptional landscape of embryonic and adult brains, Goff et al. (2015) generated a cohort of 13 lncRNA-null mutant mouse models, which had evidence of expression in neural stem cells and the brain. They observed a more significant number of differentially expressed genes at mouse embryonic day 14.5 (E14.5) compared to adult brains, with significant enrichment of gene sets related to neuronal differentiation and cell fate commitment. In this cohort, one of the mutant strains was a knockout (KO) of KANTR locus. A differential expression analysis between KO and wild-type (WT) for this strain showed a significant increase in gene sets involved in Notch signaling and neural development in the E14.5 brain. Similarly, the deletion of the lncRNA PERIL locus in the E14.5 brain led to a significant increase in the neural stem cell marker genes Notch 1-3, which was also observed with the ablation of the lncRNA PANTR1 locus [58].

The trisomy 21 found in Down Syndrome (DS) is suggested as associated with delayed neuron formation. Recently, it was shown that the lncRNA XIST, a very well known transcript in the X-chromosome silencing process, is capable of silencing the extra chromosome 21 (chr21) in DS iPSCs. The silencing of the extra chr21 allows a higher rate of neuron production when compared to the non-silenced cells. Through scRNA-seq analysis, it was revealed that the extra chr21 silencing by XIST significantly dysregulated the Notch signaling pathway and also led to differential expression of TTYH1, an enhancer of this pathway. The elevated expression of Notch signaling genes is then suggested to keep NSCs in the proliferative state, delaying their terminal differentiation into neurons [59].

In summary, these studies highlight how lncRNAs may regulate the Notch signaling pathway and play important roles in neuronal differentiation, which is shown to be strongly related to ID development.

3.3. *Sonic hedgehog pathway*

The Sonic hedgehog (Shh) pathway plays a role in the development of tissues and organs, including the CNS, and the determination of tissue polarity. Its role in forming the ventral spinal cord model and early embryonic development has been previously observed [60]. Signaling in this pathway is indispensable for a cell's pattern and fate, especially in the CNS. Throughout vertebrates CNS development, Shh is required and acts as a morphogenic factor in proliferation, differentiation, and survival of neural precursor cells [61]. In the brain, Shh protein is first expressed ventrally at the early development stages [62].

Shh pathway is classified as canonical when it involves three main components: begins with the Shh ligand binding to Patched (Ptch) protein receptor, which then interacts with and inhibits smoothened (Smo) protein, and ends with the regulation of transcriptional effectors from the Gli family. Non-canonical Shh occurs when the activation of Ptch/SMO independent of Gli or when the transcriptional factor Gli is activated regardless of Shh ligand of Ptch/SMO [63]. Shh plays an important role in neurogenesis in the adult mammalian brain, while its receptors, Ptch and Smo, are more expressed in the adult hippocampus and progenitors from this region [64].

Studies of gain and loss of function demonstrated that Shh is essential to induce ventral-neural-cell types, and its deficiency affects the establishment of spinal cord structures and brain development. In the brain, altered regulations of the Shh signaling can lead to an extensive range of neurological disorders, brain tumors, and intellectual disability [65,66]. Variants in the Shh gene have also been found in patients showing development abnormalities, and speech and learning delays [67,68]. Several non-coding RNAs have been reported as having a role of regulation of the Shh pathway, including lncRNAs, which were shown to function in modulation of neural development and differentiation, with possible effect in the intellectual disability phenotype [69].

The lncRNA AK053922, which is transcribed from the Gli3 locus, is expressed in the early stages of brain development and was shown to have the ability to help specify distinct neuronal cell types by working as a bifunctional transcriptional switch that can either repress or activate Shh signaling [70-72]. Also involved in neurogenesis, lncRNA Gm15577 was identified in the Nbs1-deficient mouse model. Yue et al. (2015) [73] demonstrated that Gm15577 regulates the RNA expression of Shh, Nerg1, and β -catenin, and has important functions in neuronal growth and neuroplasticity [74].

One thoroughly studied lncRNA that regulates brain development is Evf2 (embryonic ventral forebrain-2), which is transcribed antisense to the Dlx6 gene, and therefore also known as Dlx6as1. The locus from which is transcribed is a homeobox-containing transcription factor, essential for forebrain

neurogenesis [75,76]. Evf2 is upregulated during GABAN neurogenesis [72] and is expressed in the telencephalon's Shh-responsive cells during embryonic development [75].

Bond et al. (2009) [77] used Evf2 loss-of-function mice to study its role in vivo and reported that Evf2 regulates Dlx6 with mediated concentration-dependent transcriptional control by competition, using both trans and cis mechanisms. The paper also demonstrated that Shh signaling in the embryonic ventral forebrain initiates a transcriptional cascade that requires Evf2 and other lncRNAs for proper GABAergic interneuron development. Other authors also found that Shh activates Evf2 in the embryonic forebrain [78] and is expressed at sonic hedgehog-activated interneuron birth sites in mice [79]. Molecular disturbance of the expression of Evf2 in mice caused a reduction in the number of interneurons in the hippocampus. Even though this decrease was resolved in the mature mice, it was perceived as reducing the inhibition of CA1 pyramidal neuron activity, which suggests a functional defect in these cells [77,80].

3.4. Growth factors and neurotrophic factors

Growth factors represent a family of extracellular proteins that induces cell growth and support biological settings [81]. Various growth factors have been demonstrated to play a role in the regulation of the adult brain development, in highlighting Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and Vascular endothelial growth factor (VEGF). These factors bind to a ligand-specific receptor from the tyrosine kinase family, resulting in the autophosphorylation and activation of its receptors, followed by the activation of signaling pathways, such as PI3K/Akt and MAPK/ERK [82]. Several lncRNAs associated with growth factors have been reported as affecting the brain in conditions of oxygen-glucose deprivation and ischemic stroke, namely MALAT1 [83], Neat1 [84], SNHG12 [85], FENDRR [86], and MEG3 [40].

Neurotrophic factors are signaling proteins playing a role during development, and later, in the adult nervous system. Five neurotrophic factors have been identified in mammals, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin 3 (NT-3), and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). In this pathway, those proteins interact with tyrosine kinases (Trk) receptors and their co-receptor p75NTR [87]. Neurotrophins play an essential role in the moderation of neuronal survival, growth, and differentiation [88], and the lack of these factors may lead to neurodegeneration [89]. Neurotrophins have been associated with several psychiatric disorders, like depression, bipolar disorder, anxiety, and autism spectrum disorders [90-93]. Its upregulation is shown to have beneficial effects on a large range of neurological disorders [94] and even work as therapeutic options for neurodegeneration [95]. BDNF, NGF, and NT-3 have also been considered possible etiologies for attention-deficit/hyperactivity disorder [96].

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is an important protein for neurodevelopment and maintenance and is one of the most abundant growth factors in the human brain [97]. BDNF plays a role in the coordination of neuronal and glial maturation, participating in axonal, dendritic differentiation and protecting and enhancing neuronal cell survival [98], and is involved in the learning and memory process [99].

The BDNF locus originates the antisense lncRNA named BDNF-AS, which regulates BDNF mRNA and protein levels in cis [100]. Both transcripts are expressed in several tissues, like the brain, muscle, and embryonic tissues, with the BDNF mRNA having 10 to 100-fold higher expression. Inhibition of BDNF-AS caused a 2 to 7-fold increase in BDNF levels, which resulted in elevated neuronal growth, differentiation, survival, and proliferation, both in vitro and in vivo [94,101]. However, the magnitude of the increase of

BDNF protein was less than the extent of mRNA upregulation [94]. Thus, BDNF-AS is a promising therapeutic target for neurodegenerative and neurodevelopmental disorders in which BDNF is downregulated [102].

Localized in a novel nuclear compartment enriched in pre-mRNA splicing factors [103], lncRNA MIAT, also known as GOMAFU/Gomafu (in humans) and RNCR2, have been shown to play a role in retinal development, postmitotic neuronal function [104], and brain development [72], however, these functions need further explanation. Overexpression of MIAT was associated with reduced apoptosis of neuronal cells through miR-211 and the neurotrophin GDNF, resulting in relief of hypoxic-ischemic injury in mice [105]. MIAT also plays a role as a regulator of neural and vascular cell function via MIAT/miR-150-5p/VEGF network, and its knockdown causes cerebral microvascular degeneration, progressive neuronal loss and neurodegeneration, and behavioral deficits in Alzheimer's disease [106].

MIAT is expressed in a subset of adult mice neurons, including the hippocampus' CA1 region, which suggests the lncRNA role in neuronal excitatory transmission [104]. In two separate studies, MIAT was found upregulated in the nucleus accumbens of cocaine heroin users, suggesting an effect of the lncRNA in addictive behaviors [39,107]. The dysregulation of MIAT can lead to neurological disorders and has also been implicated in the pathogenesis of schizophrenia, being downregulated upon neuronal activation [108].

Mercer et al. (2010) studied lncRNAs expression in neuronal-glial fate specification and oligodendrocyte (OL) lineage maturation and found that MIAT was differentially expressed, being downregulated in neuronal-OL progenitor, while upregulated during neurogenesis and all stages of oligodendrocytes lineage specification and maturation [72]. Using MIAT lncRNA knockout mice, Ip et al. (2016) observed that the animals exhibited no gross development defects. However, results from behavioral tests suggested that the animals displayed a mild hyperactivity phenotype accompanied by an increased level of dopamine in comparison with wild-type controls [109].

3.5 RHO pathway

Small GTPases of the Rho family comprise 20 proteins distributed in subfamilies: Cdc42, Rac, Rho, Rnd, RhoD, RhoBTB, and RhoH [110]. These proteins play a key role in numerous neuronal development processes, mainly in neuronal morphology controlling dynamic events of the actin cytoskeleton as well as dendritic and synaptic plasticity. Therefore, it is not surprising that the dysfunction of Rho GTPases is associated with intellectual disability. Also, several ID-related mutations have been found in genes that encode effectors or regulators of the Rho GTPases: ARHGEF9 (Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 9), FGD1 (FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1), OPHN1 (oligophrenin 1), PAK3 (p21 (RAC1) activated kinase 3), aPIX (Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6), and TRIO (trio Rho guanine nucleotide exchange factor) [111,112]. However, no data were found in the literature corroborating the association between lncRNAs and the RHO pathway in ID.

3.6. MAPK/ERK pathway

The MAPK/ERK pathway, also known as the Ras-Raf-MEK-ERK, acts on the transduction from extracellular information to the intracellular environment, regulating various intracellular functions, including cell proliferation, differentiation, and survival [113-115]. This pathway has been described as acting in the development of the central nervous system; for example: in the embryonic and early postnatal phases, the cascade signals transmitted by MAPK/ERK to progenitor cells inhibit gliogenesis and promote

neurogenesis [116]; in neurons, it acts on the dendritic spine stabilization, since it encodes scaffold proteins and adhesion molecules, and participates in the modulation of ionic changes and receptor insertion as well [117].

MAPK/ERK pathway dysfunction has been associated with many neurological pathologies, including ASD [118-120]. It was already reported that transient blockade of the MAPK/ERK pathway on postnatal day 6 in mice caused an increase in apoptosis in the forebrain, and in the long term induced autistic behavioral phenotypes, including social deficits, impaired memory, and reduced long-term potentiation (LTP) in adulthood [121].

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are glutamate-gated ion channels widely expressed in the CNS, regulating neuronal communication and synaptic function [122]. Functional NMDARs are heterotetramers formed by two GluN1 subunits and two glutamate binding GluN2 subunits. The GluN2 subunits can be GluN2A-GluN2D, as well as GluN3A and GluN3B, all of which have distinguishing properties and expression patterns in the CNS [123,124]. Several human genetic studies have reported alterations in NMDARs subunits genes in a variety of brain diseases, such as intellectual disability, ASD, and epilepsy [125]. Regulation of NMDARs function is a complex process involving numerous proteins in the cell, particularly various protein kinases [126]. The long nucleolus-specific lncRNA (LoNA) has been reported as a regulator of some NMDAR components in mice [127]. LoNA was shown to inhibit rRNA production and ribosome biosynthesis in nucleoli, and eventually, protein synthesis. Additionally, Li et al. (2018) showed that levels of synaptic proteins, including NMDA receptor NR1, NR2A, and NR2B, were significantly elevated in the synaptosome fraction isolated from LoNA knockdown mice, ultimately leading to improved neuronal plasticity and long-term potentiation (LTP) [127]. Further studies are required to evaluate whether LoNA may regulate NMDAR components in the context of human neurologic diseases.

SynGAP is a GTPase-activating protein (GAP) selectively expressed in the brain, and that regulates the biochemical signaling in neurons and plays critical roles in neuronal function and brain development [128,129]. This protein is a component of the NMDA-receptor complex and acts downstream of the receptor, blocking the AMPA receptor's insertion at the postsynaptic membrane by inhibition of the RAS-ERK pathway [130]. SynGAP is a negative regulator of small GTPases, such as Ras and Rap, and is essential for synaptic development, structure, function, and plasticity [131,132]. Mutations in SYNGAP1, which encodes the SynGAP protein, are a major cause of genetically defined childhood brain disorders and are found in individuals with ID, ASD, severe epilepsy, and schizophrenia [133,134]. Alongside mutations, non-coding RNAs may play a role in the regulation of SynGAP. An antisense lncRNA to SYNGAP1 (SYNGAP1-AS) was upregulated in the ASD postmortem prefrontal cortex and superior temporal gyrus. These findings raised the idea of regulation by the expression of SYNGAP1 mRNA while affecting epigenetic modification of transcription factors and playing a role in ASD pathology and other neurological diseases related to SynGAP deficiency [129,135].

The metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1), also known as nuclear-enriched transcript 2 (NEAT2), is a lncRNA consisting of more than 8700 nt located on chromosome 11q13 and discovered as a predictive marker for metastasis in early-stage, non-small cell lung cancer [136,137]. MALAT1 is involved in several biological processes, including cell proliferation, migration, and apoptosis [138,139]. Regarding its role in the nervous system and its related pathologies, MALAT1 was expressed in neurons and induced in response to membrane depolarization [140]. In addition, MALAT1 was described as regulating synapse formation by modulating the expression of genes involved in synapse formation or maintenance [141]. MALAT1 has been related to the pathology of several human neurological diseases, including stroke and Alzheimer's disease [142]. Concerning the role of MALAT1 in the regulation of the

ERK/MAPK pathway, Chen et al. (2016), using in vitro differentiation of neuroblastoma-derived Neuro-2a (N2a) cell as a model for the investigation of lncRNAs in neurogenesis, identified that MALAT1 was one of the most significantly up-regulated lncRNAs during N2a cell differentiation. The authors also observed that MALAT1 knockdown resulted in defects in neurite outgrowth as well as enhanced cell death and inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway. Therefore, it was found to maintain the survival and synaptic formation of neurocytoma cells by activating the ERK/MAPK signaling pathway [143]. In contrast to the finding reported by Chen et al. [143], a recent study conducted by Shi et al. (2019) showed the inhibitory effect of lncRNA-MALAT1 on the MAPK/ERK signaling pathway and its influence on neuronal apoptosis in a rat model of cerebral infarction [144].

In addition to MALAT1, other lncRNAs have been described as interacting molecules with the MAPK/ERK signaling pathway in the nervous system's cells. The long intergenic non-protein-coding RNA p53-induced transcript (LINC-PINT) is a long noncoding RNA induced by p53 and located on the human chromosome 7 [145]. In mouse cells, LINC-PINT homologous (LincPint) is involved in Polycomb repressive complex 2 (PRC2) and promotes cell proliferation and survival by regulating the expression of genes of the TGF- β , MAPK, and p53 pathways [146]. Additionally, Blüthgen et al. (2017) identified that the transcription of LincPint and other lncRNAs is hampered by MEK inhibition in the murine hippocampus, suggesting that this lncRNA could be a candidate for conveying epigenetic changes initiated by MAPK/ERK [147]. Interestingly, in normal human tissues, LINC-PINT expression presents a positive correlation with members of the MAPK pathway and others [146].

The Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1 (Neat1) is a ubiquitous, highly expressed, nuclear-retained regulatory lncRNA with essential roles in cellular physiology and pathophysiology [148]. This lncRNA can be processed into two isoforms (NEAT1_1 and NEAT1_2) that accumulate in high levels in the nucleus [149,150] and are involved in carcinogenesis [151] and non-cancerous diseases as well, including neurodegeneration and inflammation [152]. In addition to LincPint, Blüthgen et al. (2017) also detected that the two alternatively spliced variants of the lncRNA Neat1 were differentially regulated by MAPK/ERK in their murine model, linking this signaling pathway to the regulation of activity-dependent alternative splicing [147].

3.7. *Synaptic vesicle trafficking and exocytosis*

Defects on the regulation of synaptic vesicle fusion and exocytosis may be associated with neurodevelopmental disorders, since this is a tightly controlled process necessary for neurotransmitters release and neuronal communication [153]. Neurotransmitter signaling may influence early developmental events, such as proliferation, migration, and differentiation, once they serve as chemical signals in the nervous tissue [154]. The binding of neurotransmitters to neuron receptors generates electrical signals that alter the neighboring neuron's morphology and behavior. This process involves gene expression changes that must be maintained for proper maturing neuron development [155].

Alterations that lead to impaired neurotransmission and vesicle trafficking may have a great impact on healthy development. A novel missense mutation identified in the SYN1 gene, for example, was shown to affect synaptic vesicle (SV) clustering at presynaptic terminals of neurons and also spontaneous SV release and mobility causing synaptic function alterations and inducing an X-linked ID phenotype [8]. A further study showed that the most affected KO mice proteins for the FMR1 gene were associated with signal transduction, neuronal development, and GABA/glutamate neurotransmission. The lack of its

encoded protein, FMRP, led to alterations in synaptic vesicles unloading dynamics, contributing to the aberrant synaptic transmission in Fragile-X syndrome patients [156].

It has been demonstrated that some lncRNAs could affect intellectual development by modulating synaptic vesicle trafficking and exocytosis. Wang et al. (2015) analyzed blood samples of ASD children and compared them with controls. Through differential expression analysis, they demonstrated that the lncRNA SNAP25-AS1, which is derived from the SNAP25 locus, is upregulated and associated with the synaptic vesicle cycling pathway [20]. It is known that the synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25), together with syntaxin-1A (STX1A) and vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2), mediates neurotransmitters released by the fusion of synaptic vesicles [157,158]. It was also already reported that alterations in gene expression of SNAP25 in mammals are associated with schizophrenia-like behavior [159], and sequence variations in the SNAP25 locus are associated with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [160-162].

It was recently shown that the lncRNA neuroLNC is conserved in mammals and it is tuned by synaptic activity. It was also demonstrated that neuroLNC affects synaptic release due to its interaction with RNA-binding protein TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) [163]. This protein colocalizes strongly with endocytic proteins, and it is known to bind several mRNAs that encode synaptic vesicle proteins (e.g., members of syntaxin and synaptotagmin) [164,165]. In addition to TDP-43 participating in diverse RNA processes such as synthesis, splicing, stability, and transport [166,167], its importance is highlighted by the inhibition of the endocytosis process, which may be an underlying cause of disrupted neuronal trafficking causing amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [165]. In this sense, it was demonstrated by loss-of-function experiments that TDP-43 might impact signaling and endosomal trafficking in neurons [168].

3.8. Transcriptional regulation and chromatin remodeling

Long non-coding RNAs promote transcriptional regulation by different mechanisms [11,169]. A typical function of lncRNAs is to modulate the proteins' activity by recruiting chromatin-modifying complexes and specifying histone modifications patterns [170]. A recent report demonstrates that the long non-coding FMR4 plays a role as a chromatin-associated transcript with evidence of functioning as a trans-acting lncRNA in neural precursor cells, regulating distant genomic loci [18]. Evidence pointed out that overexpression of FMR4 significantly altered genome-wide histone methylation status regarding H3K4Me3 and H3K27Me3 marks. The FMR4-mediated histone methylation changes affected the expression of neurodevelopmental genes; besides, the authors suggest the FMR4 putative targets may be related to its function as a positive regulator of neural precursor cell proliferation [18].

The lincRNA Dali study showed the first evidence of an intergenic long noncoding RNA modulating transcriptional programs of genomically distal regulatory elements [171]. Dali controls the expression of a 50kb upstream transcription factor gene, Pou3f3 (also known as BRN1 or Oct8), which plays a role in developing the nervous system [172]. Dali and Pou3f3 share transcriptional targets, regulating gene expression during neural differentiation. Moreover, Dali directly binds to DNA methyltransferase DNMT1, the BRG1 core component of the SWI/SNF family chromatin remodeling BAF complex, the P66beta, and SIN3A transcriptional co-factors, validating its role in chromatin-modifying proteins regulation [171].

A widely known gene to play a role in gene regulation during neurodevelopment is the MeCP2. The encoded protein can bind DNA and regulate gene expression; moreover, MECP2 mutations and dysfunctions have been associated with intellectual disability in several neurodevelopmental disorders [173-175]. The function of MECP2 has been proven broader than a mere transcriptional repressor, as initially believed [174]. MeCP2/lncRNAs-mediated chromatin remodeling received a closer look. Physical

association with the lncRNA RNCR3 (retinal non-coding RNA 3) confers new gene regulation mechanisms by affecting chromatin structure [176].

An alternative mechanism used by lncRNAs to perform transcriptional regulation is by targeting splicing factors. The lncRNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells by binding to the polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1), a critical splicing factor during neuronal development [17,177]. In NSCs, Pnky binding to PTBP1 regulates neurons' production by controlling key transcripts related to cell differentiation. The lncRNA Tuna, which also binds to PTBP1, has a role in neurogenesis. However, further clarification is needed if their mechanism is by affecting splicing machinery [178].

The lncRNA MIAT is involved in a neurogenic commitment by controlling the differentiation of neural progenitors and newborn neurons' survival. In vivo experiments showed that Miat overexpression or RNAi silencing altered the splicing pattern of *Wnt7b*, promoting changes in variants proportion [179]. The lncRNA CAT7 interacts with the Polycomb Repressive Complex (PRC1) by co-immunoprecipitation. The evidence shows that Cat7 cooperates with the PRC1 to promote gene regulation during neuronal differentiation [180].

In respect to lncRNAs binding directly to chromatin to promote transcriptional regulation, experiments of chromatin isolation by RNA precipitation followed by sequencing (ChIRP-seq) showed that the *lnc-Nr2f1* binds to chromatin in an isoform-specific form to distinct genomic loci, regulating neuronal genes in mouse, for instance, the gene *Nrp2* involved in neural pathfinding [21].

Table 1. Overview of lncRNAs roles in each non-syndromic intellectual disability-related pathway.

Pathway	lncRNA	Ensembl Gene ID	Biotype	Role in the pathway	Reference
Wnt/ β -catenin pathway	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548	Intergenic	It modulates Wnt/ β -catenin signaling pathway, enhancing nerve growth and alleviating neurological impairment of rats after brain injury	[40]
	<i>Neat1</i>	ENSG00000245532	Intergenic	The signaling axis miR-124-Neat1-Wnt/ β -catenin playing an important role in regulating neuronal differentiation, apoptosis, and migration of mouse spinal cord progenitor cells	[42]
	<i>RMST</i>	ENSG00000255794	Intergenic	Nuclear lncRNA <i>RMST</i> regulates neuronal differentiation and associates with transcription factor SOX2	[45]
	<i>Sox2ot</i>	ENSG00000242808	Sense overlapping	Its expression is inversely correlated to Sox2 expression during neural differentiation of mouse ESCs.	[46]
	<i>lincRNA-RoR</i>	ENSG00000258609	Intergenic	<i>lincRNA-RoR</i> participates of a regulatory loop, together with Sox2, to help maintain hESC self-renewal balance and may contribute to genetic networks regulation during development.	[47]
	<i>Gomafu</i>	ENSG00000225783	Intergenic	The long non-coding RNA <i>Gomafu</i> induces alternative splicing of DISC1, leading to its downregulation and disturbing neurodevelopmental mechanisms	[49, 50]
Notch	<i>LncND</i>	NA	Intergenic	It sequesters miR-143-3p, which targets NOTCH1 and NOTCH2 mRNAs. Knockdown of this lncRNA led to premature precursor cells differentiation in humans and its overexpression regulates radial glial cells expansion in murine developing cortex.	[57]
	<i>KANTR</i>	ENSG00000232593	Sense overlapping/ Sense intronic	Knockout mice of <i>KANTR</i> locus increased gene sets involved in Notch signaling and neural development.	[58]
	<i>PERIL</i>	NA	NA		

	<i>PANTR1</i>	ENSG00000233639	Intergenic	Knockout mice of these lncRNAs locus increased the neural stem cell marker genes NOTCH1-3.	[58]
	<i>XIST</i>	ENSG00000229807	Intergenic	<i>XIST</i> silencing of the extra chr21 in Down Syndrome hiPSCs led to diminished Notch pathway signaling and higher rate of neuron production.	[59]
	<i>AK053922</i>	NA	NA	It helps to specify distinct neuronal cell types through acting as a bifunctional transcriptional switch which can either repress or activate sonic hedgehog (Shh) signaling.	[70, 71]
Sonic hedgehog	<i>Gm15577</i>	ENSMUSG00000086708	Antisense	In mice, it modulates <i>Shh</i> mRNA expression, playing important roles in neuronal growth and neuroplasticity.	[73]
	<i>Evf2/DLX6-AS1</i>	ENSG00000231764	Antisense	<i>Evf2</i> is required for proper GABAergic interneuron development, through a transcriptional cascade initiated by Shh signaling in embryonic ventral forebrain.	[75, 79]
Growth and neurotrophic factors	<i>BDNF-AS</i>	ENSG00000245573	Antisense	Regulates BDNF mRNA and protein levels, that are critical for the development, survival and maintenance of neurons in the nervous system.	[101, 102]
	<i>MIAT/Gomafu</i>	ENSG00000225783	Intergenic	It is involved in brain development and regulation of neural and vascular cell function via <i>Gomafu</i> /miR-150-5p/VEGF network.	[103, 104]
MAPK/ERK	<i>LoNA</i>	NA	NA	Knockdown of <i>LoNA</i> led to increase of NR1, NR2A and NR2B proteins in mice and was found in association with improved neuronal plasticity and long-term potentiation.	[127]
	<i>SYNGAP1-AS1</i>	ENSG00000274259	Antisense	<i>SYNGAP1-AS</i> is supposed to regulate the expression of <i>SYNGAP1</i> mRNA in prefrontal cortex and superior temporal gyrus of patients with autism spectrum disorders.	[129]
	<i>MALAT1</i>	ENSG00000251562	Intergenic		[143, 144]

				Knockdown of <i>MALAT1</i> resulted in the inhibition of the MAPK/ERK pathway in mouse N2a cells and also could inhibit this signaling pathway in a rat model of cerebral infarction.	
	<i>LINC-PINT</i>	ENSG00000231721	Intergenic	In mice, its homologous (LincPint) regulates genes of the MAPK pathway and its transcription is hampered by MEK inhibition in the murine hippocampus. In human normal tissues, the expression of <i>LINC-PINT</i> was positively correlated with expression of MAPK pathway genes.	[146, 147]
	<i>Neat1</i>	ENSG00000245532	Intergenic	This transcript is processed into two isoforms that are involved in the pathogenesis of human neurodegenerative diseases and, in mice, its alternatively spliced variants are differentially regulated by MAPK/ERK pathway.	[152]
Synaptic vesicle trafficking and exocytosis	<i>SNAP25-AS1</i>	ENSG00000227906	Antisense	In ASD patients, it is upregulated and associated to the synaptic vesicle cycling pathway.	[20]
	<i>NeuroLNC</i>	NA	NA	It interacts with TDP-43, affecting synaptic vesicles release, which may be the cause of disrupted neurotrafficking in amyotrophic lateral sclerosis.	[163]
Transcriptional regulation and chromatin remodeling	<i>FMR4</i>	ENSG00000268066	Antisense	The <i>FMR4</i> -mediated histone changes affected expression of neurodevelopmental genes and its targets may be related to its function as a positive regulator of neural precursor cell proliferation.	[18]
	<i>Dali</i>	NA	Intergenic	<i>Dali</i> controls expression of the transcription factor gene Pou3f3 (also known as BRN1 or Oct8), which in turn plays a role in development of the nervous system.	[172]
	<i>RNCR3</i>	ENSG00000253230	Intergenic	Physical association of MECP2 with the lncRNA <i>RNCR3</i> confers new mechanisms of gene regulation by affecting chromatin structure.	[176]
	<i>Pnky</i>	ENSMUSG00000107859	NA	It regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells by binding to the PTBP1 protein.	[17, 177]

<i>Tuna</i>	ENSG00000250366	Intronic	The lncRNA <i>Tuna</i> binds to PTBP1, with a possible role in neurogenesis. However, the mechanism needs to be further investigated.	[178]
<i>MIAT</i>	ENSG00000225783	Intergenic	It is involved in neurogenic commitment by controlling differentiation of neural progenitors and the survival of newborn neurons.	[179]
<i>CAT7</i>	NA	NA	<i>CAT7</i> cooperates with PRC1 to promote gene regulation during neuronal differentiation.	[180]
<i>lnc-Nr2f1</i>	ENSG00000248588	Antisense	<i>lnc-Nr2f1</i> binds to chromatin in an isoform-specific way to distinct genomic loci, regulating neuronal genes in mouse.	[21]

¹ Biotypes were accessed with LNCipedia database (<https://lncipedia.org/>). NA: Not available.

Figure 1. Schematic representation of the mechanisms of action by which lncRNAs may regulate molecular and cellular pathways already associated to non-syndromic intellectual disability and neural function. They play important roles in neurodevelopmental processes which may have relevant implications for the disease origins and evolution.

4. Concluding remarks

LncRNAs have been extensively explored in many biological pathways in recent years and their regulatory importance has been increasingly recognized. Although, their roles in ID are still not deeply understood, leaving a gap in its transcriptional network. This review shows that many lncRNAs acting in pathways involved in NS-ID (Figure 1). Some transcripts were shown to participate in more than one pathway, reinforcing their versatile mechanisms of action, and some new transcripts were also evidenced. We found a large number of lncRNAs in the transcriptional regulation and chromatin remodeling pathway, followed by Wnt/ β -catenin, Notch and MAPK/ERK pathways (Table 1), possibly representing the main biological pathways in which lncRNAs act during neurodevelopment. On the other side, the remaining pathways might not have been explored as the first ones, therefore being potential discovery fields. Altogether, this evidence emphasizes the relevance of lncRNAs in pathways involved in NS-ID, which strongly indicates their relevance in this disorder. Additionally, these studies expand the knowledge about lncRNAs regulatory roles during neurodevelopmental events and demonstrate the highly complex gene networks involved in this process, making it necessary to assess further and validate their NS-ID roles.

Author Contributions: Conceptualization, Barros, I.I and Silva Jr, W.A.; literature investigation, Barros, I.I, Santis, J.O., Rosa, R.C.A., Brotto, D.B., Storti, C.B. and Siena, A.D.D.; writing-original draft preparation, Barros, I.I, Santis, J.O., Rosa, R.C.A., Brotto, D.B., Storti, C.B. and Siena, A.D.D.; figure-conceptualization, Barros, I.I, Leão, V., Santis, J.O. and Rosa, R.C.A.; figure-original draft and editing, Leão, V.; table-conceptualization, Barros, I.I, Rosa, R.C.A.; table-writing, editing and review, Barros, I.I, Santis, J.O., Rosa, R.C.A., Brotto, D.B. and Storti, C.B.; writing-critical review, Molfetta, G.A. and Silva Jr, W.A.; writing-editing, Barros, I.I, Santis, J.O., Rosa, R.C.A., Brotto, D.B., Storti, C.B. and Molfetta, G.A.; text formatting, Leão, V. and Santis, J.O.; supervision, Barros, I.I. and Silva Jr, W.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Ethical Approval: This review was performed using published data and did not require approval by the research ethics committee or patient consent forms.

Funding: The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was jointly supported by The Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant no. 465539/2014-9; São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant nos. 2009/53853-5 and 2013/08135-2.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. AAIDD. American Association on Intellectual Developmental Disabilities. Intellectual disability: Definition, classification, and systems of supports. *Washington, DC: AAIDD* **2010**.
2. Iwase, S.; Berube, N.G.; Zhou, Z.; Kasri, N.N.; Battaglioli, E.; Scandaglia, M.; Barco, A. Epigenetic Etiology of Intellectual Disability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2017**, *37*, 10773-10782, doi:10.1523/JNEUROSCI.1840-17.2017.
3. Linn, J.G.; Chuaqui, J.; Wilson, D.R.; Arredondo, E. The Global Impact of Intellectual Disability and Other Mental Disorders in Children. *International Journal of Childbirth Education* **2019**, *34*, 14-17.
4. Kaufman, L.; Ayub, M.; Vincent, J.B. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of neurodevelopmental disorders* **2010**, *2*, 182-209, doi:10.1007/s11689-010-9055-2.

5. Valnegri, P.; Sala, C.; Passafaro, M. Synaptic dysfunction and intellectual disability. *Advances in experimental medicine and biology* **2012**, *970*, 433–449, doi:10.1007/978-3-7091-0932-8_19.
6. Muthusamy, B.; Bellad, A.; Prasad, P.; Bandari, A.K.; Bhuvanalakshmi, G.; Kiragasur, R.M.; Girimaj, S.C.; Pandey, A. A Novel LINS1 Truncating Mutation in Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability. *Frontiers in psychiatry* **2020**, *11*, 354, doi:10.3389/fpsyt.2020.00354.
7. Wu, Y.; Zhang, H.; Liu, X.; Shi, Z.; Li, H.; Wang, Z.; Jie, X.; Huang, S.; Zhang, F.; Li, J., et al. Mutations of ARX and non-syndromic intellectual disability in Chinese population. *Genes & genomics* **2019**, *41*, 125–131, doi:10.1007/s13258-018-0745-6.
8. Guarnieri, F.C.; Pozzi, D.; Raimondi, A.; Fesce, R.; Valente, M.M.; Delvecchio, V.S.; Van Esch, H.; Matteoli, M.; Benfenati, F.; D'Adamo, P., et al. A novel SYN1 missense mutation in non-syndromic X-linked intellectual disability affects synaptic vesicle life cycle, clustering and mobility. *Human molecular genetics* **2017**, *26*, 4699–4714, doi:10.1093/hmg/ddx352.
9. Rauch, A.; Wieczorek, D.; Graf, E.; Wieland, T.; Ende, S.; Schwarzmayer, T.; Albrecht, B.; Bartholdi, D.; Beygo, J.; Di Donato, N., et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **2012**, *380*, 1674–1682, doi:10.1016/S0140-6736(12)61480-9.
10. Lee, S.; Rudd, S.; Gratten, J.; Visscher, P.M.; Prins, J.B.; Dawson, P.A. Gene networks associated with non-syndromic intellectual disability. *Journal of neurogenetics* **2018**, *32*, 6–14, doi:10.1080/01677063.2017.1404058.
11. Bhat, S.A.; Ahmad, S.M.; Mumtaz, P.T.; Malik, A.A.; Dar, M.A.; Urwat, U.; Shah, R.A.; Ganai, N.A. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA research* **2016**, *1*, 43–50, doi:10.1016/j.ncrna.2016.11.002.
12. Bouckenheimer, J.; Assou, S.; Riquier, S.; Hou, C.; Philippe, N.; Sansac, C.; Lavabre-Bertrand, T.; Combes, T.; Lemaître, J.M.; Boureux, A., et al. Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. *Human reproduction update* **2016**, *23*, 19–40, doi:10.1093/humupd/dmw035.
13. Jain, A.K.; Xi, Y.; McCarthy, R.; Allton, K.; Akdemir, K.C.; Patel, L.R.; Aronow, B.; Lin, C.; Li, W.; Yang, L., et al. LncPRESS1 Is a p53-Regulated LncRNA that Safeguards Pluripotency by Disrupting SIRT6-Mediated Deacetylation of Histone H3K56. *Molecular cell* **2016**, *64*, 967–981, doi:10.1016/j.molcel.2016.10.039.
14. Xu, C.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Xu, Z.; Jiang, J.; Gao, Y.; Gao, M.; Kang, J.; Wu, M.; Xiong, J., et al. Long non-coding RNA GAS5 controls human embryonic stem cell self-renewal by maintaining NODAL signalling. *Nature communications* **2016**, *7*, 13287, doi:10.1038/ncomms13287.
15. Stiles, J.; Jernigan, T.L. The basics of brain development. *Neuropsychology review* **2010**, *20*, 327–348, doi:10.1007/s11065-010-9148-4.
16. Li, G.; Jiapaer, Z.; Weng, R.; Hui, Y.; Jia, W.; Xi, J.; Wang, G.; Zhu, S.; Zhang, X.; Feng, D., et al. Dysregulation of the SIRT1/OCT6 Axis Contributes to Environmental Stress-Induced Neural Induction Defects. *Stem cell reports* **2017**, *8*, 1270–1286, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.017.
17. Ramos, A.D.; Andersen, R.E.; Liu, S.J.; Nowakowski, T.J.; Hong, S.J.; Gertz, C.; Salinas, R.D.; Zarabi, H.; Kriegstein, A.R.; Lim, D.A. The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells. *Cell stem cell* **2015**, *16*, 439–447, doi:10.1016/j.stem.2015.02.007.
18. Peschansky, V.J.; Pastori, C.; Zeier, Z.; Wentzel, K.; Velmeshev, D.; Magistri, M.; Silva, J.P.; Wahlestedt, C. The long non-coding RNA FMR4 promotes proliferation of human neural precursor cells and epigenetic regulation of gene expression in trans. *Molecular and cellular neurosciences* **2016**, *74*, 49–57, doi:10.1016/j.mcn.2016.03.008.

19. Ziats, M.N.; Rennert, O.M. Aberrant expression of long noncoding RNAs in autistic brain. *Journal of molecular neuroscience : MN* **2013**, *49*, 589-593, doi:10.1007/s12031-012-9880-8.
20. Wang, Y.; Zhao, X.; Ju, W.; Flory, M.; Zhong, J.; Jiang, S.; Wang, P.; Dong, X.; Tao, X.; Chen, Q., et al. Genome-wide differential expression of synaptic long noncoding RNAs in autism spectrum disorder. *Translational psychiatry* **2015**, *5*, e660, doi:10.1038/tp.2015.144.
21. Ang, C.E.; Ma, Q.; Wapinski, O.L.; Fan, S.; Flynn, R.A.; Lee, Q.Y.; Coe, B.; Onoguchi, M.; Olmos, V.H.; Do, B.T., et al. The novel lncRNA lnc-NR2F1 is pro-neurogenic and mutated in human neurodevelopmental disorders. *eLife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.41770.
22. Pastori, C.; Peschansky, V.J.; Barbouth, D.; Mehta, A.; Silva, J.P.; Wahlestedt, C. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Human genetics* **2014**, *133*, 59-67, doi:10.1007/s00439-013-1356-6.
23. Buiting, K.; Nazlican, H.; Galetzka, D.; Wawrzik, M.; Gross, S.; Horsthemke, B. C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* **2007**, *89*, 588-595, doi:10.1016/j.ygeno.2006.12.008.
24. Petazzi, P.; Sandoval, J.; Szczesna, K.; Jorge, O.C.; Roa, L.; Sayols, S.; Gomez, A.; Huertas, D.; Esteller, M. Dysregulation of the long non-coding RNA transcriptome in a Rett syndrome mouse model. *RNA biology* **2013**, *10*, 1197-1203, doi:10.4161/rna.24286.
25. Meng, L.; Ward, A.J.; Chun, S.; Bennett, C.F.; Beaudet, A.L.; Rigo, F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature* **2015**, *518*, 409-412, doi:10.1038/nature13975.
26. Hsueh, Y.P. Synaptic Formation, Neural Circuits and Neurodevelopmental Disorders Controlled by Signaling, Translation, and Epigenetic Regulation. *Developmental neurobiology* **2019**, *79*, 2-7, doi:10.1002/dneu.22655.
27. Parenti, I.; Rabaneda, L.G.; Schoen, H.; Novarino, G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends in neurosciences* **2020**, *43*, 608-621, doi:10.1016/j.tins.2020.05.004.
28. Faigle, R.; Song, H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1830*, 2435-2448, doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.002.
29. Clevers, H.; Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **2012**, *149*, 1192-1205, doi:10.1016/j.cell.2012.05.012.
30. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* **2009**, *17*, 9-26, doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
31. Katoh, M. Mutation spectra of histone methyltransferases with canonical SET domains and EZH2-targeted therapy. *Epigenomics* **2016**, *8*, 285-305, doi:10.2217/epi.15.89.
32. Tucci, V.; Kleefstra, T.; Hardy, A.; Heise, I.; Maggi, S.; Willemsen, M.H.; Hilton, H.; Esapa, C.; Simon, M.; Buenavista, M.T., et al. Dominant beta-catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *The Journal of clinical investigation* **2014**, *124*, 1468-1482, doi:10.1172/JCI70372.
33. Dubruc, E.; Putoux, A.; Labalme, A.; Rougeot, C.; Sanlaville, D.; Edery, P. A new intellectual disability syndrome caused by CTNNB1 haploinsufficiency. *American journal of medical genetics. Part A* **2014**, *164A*, 1571-1575, doi:10.1002/ajmg.a.36484.

34. Harripaul, R.; Noor, A.; Ayub, M.; Vincent, J.B. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2017**, *7*, doi:10.1101/cshperspect.a026864.
35. Fancy, S.P.; Harrington, E.P.; Baranzini, S.E.; Silbereis, J.C.; Shiow, L.R.; Yuen, T.J.; Huang, E.J.; Lomvardas, S.; Rowitch, D.H. Parallel states of pathological Wnt signaling in neonatal brain injury and colon cancer. *Nature neuroscience* **2014**, *17*, 506-512, doi:10.1038/nn.3676.
36. Salmaso, N.; Jablonska, B.; Scafidi, J.; Vaccarino, F.M.; Gallo, V. Neurobiology of premature brain injury. *Nature neuroscience* **2014**, *17*, 341-346, doi:10.1038/nn.3604.
37. Talkowski, M.E.; Maussion, G.; Crapper, L.; Rosenfeld, J.A.; Blumenthal, I.; Hanscom, C.; Chiang, C.; Lindgren, A.; Pereira, S.; Ruderfer, D., et al. Disruption of a large intergenic noncoding RNA in subjects with neurodevelopmental disabilities. *American journal of human genetics* **2012**, *91*, 1128-1134, doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.016.
38. Chen, R.; Liu, L.; Xiao, M.; Wang, F.; Lin, X. Microarray expression profile analysis of long noncoding RNAs in premature brain injury: A novel point of view. *Neuroscience* **2016**, *319*, 123-133, doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.033.
39. Michelhaugh, S.K.; Lipovich, L.; Blythe, J.; Jia, H.; Kapatoss, G.; Bannan, M.J. Mining Affymetrix microarray data for long non-coding RNAs: altered expression in the nucleus accumbens of heroin abusers. *Journal of neurochemistry* **2011**, *116*, 459-466, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07126.x.
40. You, D.; You, H. Repression of long non-coding RNA MEG3 restores nerve growth and alleviates neurological impairment after cerebral ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2019**, *111*, 1447-1457, doi:10.1016/j.biopha.2018.12.067.
41. Han, D.; Zhou, Y. YY1-induced upregulation of lncRNA NEAT1 contributes to OGD/R injury-induced inflammatory response in cerebral microglial cells via Wnt/beta-catenin signaling pathway. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **2019**, *55*, 501-511, doi:10.1007/s11626-019-00375-y.
42. Cui, Y.; Yin, Y.; Xiao, Z.; Zhao, Y.; Chen, B.; Yang, B.; Xu, B.; Song, H.; Zou, Y.; Ma, X., et al. LncRNA Neat1 mediates miR-124-induced activation of Wnt/beta-catenin signaling in spinal cord neural progenitor cells. *Stem cell research & therapy* **2019**, *10*, 400, doi:10.1186/s13287-019-1487-3.
43. Mercurio, S.; Serra, L.; Nicolis, S.K. More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20184540.
44. Kormish, J.D.; Sinner, D.; Zorn, A.M. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **2010**, *239*, 56-68, doi:10.1002/dvdy.22046.
45. Ng, S.Y.; Bogu, G.K.; Soh, B.S.; Stanton, L.W. The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Molecular cell* **2013**, *51*, 349-359, doi:10.1016/j.molcel.2013.07.017.
46. Messemaker, T.C.; van Leeuwen, S.M.; van den Berg, P.R.; t Jong, A.E.J.; Palstra, R.J.; Hoebe, R.C.; Semrau, S.; Mikkers, H.M.M. Allele-specific repression of Sox2 through the long non-coding RNA Sox2ot. *Scientific reports* **2018**, *8*, 386, doi:10.1038/s41598-017-18649-4.
47. Wang, Y.; Xu, Z.; Jiang, J.; Xu, C.; Kang, J.; Xiao, L.; Wu, M.; Xiong, J.; Guo, X.; Liu, H. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Developmental cell* **2013**, *25*, 69-80, doi:10.1016/j.devcel.2013.03.002.

48. Mao, Y.; Ge, X.; Frank, C.L.; Madison, J.M.; Koehler, A.N.; Doud, M.K.; Tassa, C.; Berry, E.M.; Soda, T.; Singh, K.K., et al. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* **2009**, *136*, 1017–1031, doi:10.1016/j.cell.2008.12.044.
49. Jaaro-Peled, H.; Hayashi-Takagi, A.; Seshadri, S.; Kamiya, A.; Brandon, N.J.; Sawa, A. Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends in neurosciences* **2009**, *32*, 485–495, doi:10.1016/j.tins.2009.05.007.
50. Morikawa, T.; Manabe, T. Aberrant regulation of alternative pre-mRNA splicing in schizophrenia. *Neurochemistry international* **2010**, *57*, 691–704, doi:10.1016/j.neuint.2010.08.012.
51. Imayoshi, I.; Kageyama, R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Molecular neurobiology* **2011**, *44*, 7–12, doi:10.1007/s12035-011-8186-0.
52. Imayoshi, I.; Shimojo, H.; Sakamoto, M.; Ohtsuka, T.; Kageyama, R. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2013**, *70*, 2045–2057, doi:10.1007/s00018-012-1151-x.
53. Reicher, A.; Fosselteder, J.; Kwong, L.N.; Pichler, M. Crosstalk between the Notch signaling pathway and long non-coding RNAs. *Cancer letters* **2018**, *420*, 91–96, doi:10.1016/j.canlet.2018.01.070.
54. Lutolf, S.; Radtke, F.; Aguet, M.; Suter, U.; Taylor, V. Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* **2002**, *129*, 373–385.
55. Hatakeyama, J.; Bessho, Y.; Katoh, K.; Ookawara, S.; Fujioka, M.; Guillemot, F.; Kageyama, R. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* **2004**, *131*, 5539–5550, doi:10.1242/dev.01436.
56. Fischer-Zirnsak, B.; Segebrecht, L.; Schubach, M.; Charles, P.; Alderman, E.; Brown, K.; Cadieux-Dion, M.; Cartwright, T.; Chen, Y.; Costin, C., et al. Haploinsufficiency of the Notch Ligand DLL1 Causes Variable Neurodevelopmental Disorders. *American journal of human genetics* **2019**, *105*, 631–639, doi:10.1016/j.ajhg.2019.07.002.
57. Rani, N.; Nowakowski, T.J.; Zhou, H.; Godshalk, S.E.; Lisi, V.; Kriegstein, A.R.; Kosik, K.S. A Primate lncRNA Mediates Notch Signaling during Neuronal Development by Sequestering miRNA. *Neuron* **2016**, *90*, 1174–1188, doi:10.1016/j.neuron.2016.05.005.
58. Goff, L.A.; Groff, A.F.; Sauvageau, M.; Traves-Gibson, Z.; Sanchez-Gomez, D.B.; Morse, M.; Martin, R.D.; Elcavage, L.E.; Liapis, S.C.; Gonzalez-Celeiro, M., et al. Spatiotemporal expression and transcriptional perturbations by long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 6855–6862, doi:10.1073/pnas.1411263112.
59. Czerminski, J.T.; Lawrence, J.B. Silencing Trisomy 21 with XIST in Neural Stem Cells Promotes Neuronal Differentiation. *Developmental cell* **2020**, *52*, 294–308 e293, doi:10.1016/j.devcel.2019.12.015.
60. Abramyan, J. Hedgehog Signaling and Embryonic Craniofacial Disorders. *Journal of developmental biology* **2019**, *7*, doi:10.3390/jdb7020009.
61. Yang, C.; Li, X.; Liu, Y.; Li, H.; Guo, Z.; Lin, J. Sonic hedgehog overexpression regulates the neuroepithelial cells proliferation in the spinal cord of dorsal regions during chicken embryo development. *Neuro endocrinology letters* **2015**, *36*, 380–386.
62. Ruiz i Altaba, A.; Palma, V.; Dahmane, N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nature reviews. Neuroscience* **2002**, *3*, 24–33, doi:10.1038/nrn704.

63. Rimkus, T.K.; Carpenter, R.L.; Qasem, S.; Chan, M.; Lo, H.W. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers* **2016**, *8*, doi:10.3390/cancers8020022.
64. Lai, K.; Kaspar, B.K.; Gage, F.H.; Schaffer, D.V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience* **2003**, *6*, 21-27, doi:10.1038/nn983.
65. Marti, E.; Bumcrot, D.A.; Takada, R.; McMahon, A.P. Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **1995**, *375*, 322-325, doi:10.1038/375322a0.
66. Patel, S.S.; Tomar, S.; Sharma, D.; Mahindroo, N.; Udayabanu, M. Targeting sonic hedgehog signaling in neurological disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **2017**, *74*, 76-97, doi:10.1016/j.neubiorev.2017.01.008.
67. Hehr, U.; Gross, C.; Diebold, U.; Wahl, D.; Beudt, U.; Heidemann, P.; Hehr, A.; Mueller, D. Wide phenotypic variability in families with holoprosencephaly and a sonic hedgehog mutation. *European journal of pediatrics* **2004**, *163*, 347-352, doi:10.1007/s00431-004-1459-0.
68. Li, X.; Li, Y.; Li, S.; Li, H.; Yang, C.; Lin, J. The role of Shh signalling pathway in central nervous system development and related diseases. *Cell biochemistry and function* **2020**, 10.1002/cbf.3582, doi:10.1002/cbf.3582.
69. Wu, P.; Zuo, X.; Deng, H.; Liu, X.; Liu, L.; Ji, A. Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin* **2013**, *97*, 69-80, doi:10.1016/j.brainresbull.2013.06.001.
70. Hashimoto-Torii, K.; Motoyama, J.; Hui, C.C.; Kuroiwa, A.; Nakafuku, M.; Shimamura, K. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mechanisms of development* **2003**, *120*, 1097-1111, doi:10.1016/j.mod.2003.09.001.
71. Meyer, N.P.; Roelink, H. The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Developmental biology* **2003**, *257*, 343-355, doi:10.1016/s0012-1606(03)00065-4.
72. Mercer, T.R.; Qureshi, I.A.; Gokhan, S.; Dinger, M.E.; Li, G.; Mattick, J.S.; Mehler, M.F. Long noncoding RNAs in neuronal-glial fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. *BMC neuroscience* **2010**, *11*, 14, doi:10.1186/1471-2202-11-14.
73. Yue, Y.; Zhang, W.; Liu, C.; Niu, Y.; Tong, W. [Long non-coding RNA Gm15577 is involved in mouse cerebellar neurogenesis]. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology* **2015**, *44*, 504-508.
74. Zhong, W.; Huang, Q.; Zeng, L.; Hu, Z.; Tang, X. Caveolin-1 and MLRs: A potential target for neuronal growth and neuroplasticity after ischemic stroke. *International journal of medical sciences* **2019**, *16*, 1492-1503, doi:10.7150/ijms.35158.
75. Feng, J.; Bi, C.; Clark, B.S.; Mady, R.; Shah, P.; Kohtz, J.D. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & development* **2006**, *20*, 1470-1484, doi:10.1101/gad.1416106.
76. van de, V., II; Gordebeke, P.M.; Khoshab, N.; Tiesinga, P.H.; Buitelaar, J.K.; Kozicz, T.; Aschrafi, A.; Glennon, J.C. Long non-coding RNAs in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in molecular neuroscience* **2013**, *6*, 53, doi:10.3389/fnmol.2013.00053.
77. Bond, A.M.; Vangompel, M.J.; Sametsky, E.A.; Clark, M.F.; Savage, J.C.; Disterhoft, J.F.; Kohtz, J.D. Balanced gene regulation by an embryonic brain ncRNA is critical for adult hippocampal GABA circuitry. *Nature neuroscience* **2009**, *12*, 1020-1027, doi:10.1038/nn.2371.

78. Kohtz, J.D.; Baker, D.P.; Corte, G.; Fishell, G. Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development* **1998**, *125*, 5079–5089.
79. Cajigas, I.; Chakraborty, A.; Swyter, K.R.; Luo, H.; Bastidas, M.; Nigro, M.; Morris, E.R.; Chen, S.; VanGompel, M.J.W.; Leib, D., et al. The Evf2 Ultraconserved Enhancer lncRNA Functionally and Spatially Organizes Megabase Distant Genes in the Developing Forebrain. *Molecular cell* **2018**, *71*, 956–972 e959, doi:10.1016/j.molcel.2018.07.024.
80. Clark, B.S.; Blackshaw, S. Understanding the Role of lncRNAs in Nervous System Development. *Advances in experimental medicine and biology* **2017**, *1008*, 253–282, doi:10.1007/978-981-10-5203-3_9.
81. Guillemot, F.; Zimmer, C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron* **2011**, *71*, 574–588, doi:10.1016/j.neuron.2011.08.002.
82. Rai, K.S.; Hattiangady, B.; Shetty, A.K. Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *The European journal of neuroscience* **2007**, *26*, 1765–1779, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05820.x.
83. Ren, L.; Wei, C.; Li, K.; Lu, Z. LncRNA MALAT1 up-regulates VEGF-A and ANGPT2 to promote angiogenesis in brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation via targeting miR-145. *Bioscience reports* **2019**, *39*, doi:10.1042/BSR20180226.
84. Zhou, Z.W.; Zheng, L.J.; Ren, X.; Li, A.P.; Zhou, W.S. LncRNA NEAT1 facilitates survival and angiogenesis in oxygen-glucose deprivation (OGD)-induced brain microvascular endothelial cells (BMECs) via targeting miR-377 and upregulating SIRT1, VEGFA, and BCL-XL. *Brain research* **2019**, *1707*, 90–98, doi:10.1016/j.brainres.2018.10.031.
85. Zhao, M.; Wang, J.; Xi, X.; Tan, N.; Zhang, L. SNHG12 Promotes Angiogenesis Following Ischemic Stroke via Regulating miR-150/VEGF Pathway. *Neuroscience* **2018**, *390*, 231–240, doi:10.1016/j.neuroscience.2018.08.029.
86. Dong, B.; Zhou, B.; Sun, Z.; Huang, S.; Han, L.; Nie, H.; Chen, G.; Liu, S.; Zhang, Y.; Bao, N., et al. LncRNA-FENDRR mediates VEGFA to promote the apoptosis of brain microvascular endothelial cells via regulating miR-126 in mice with hypertensive intracerebral hemorrhage. *Microcirculation* **2018**, *25*, e12499, doi:10.1111/micc.12499.
87. Huang, E.J.; Reichardt, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* **2001**, *24*, 677–736, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677.
88. Park, H.; Poo, M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature reviews. Neuroscience* **2013**, *14*, 7–23, doi:10.1038/nrn3379.
89. Theoharides, T.C.; Athanassiou, M.; Panagiotidou, S.; Doyle, R. Dysregulated brain immunity and neurotrophin signaling in Rett syndrome and autism spectrum disorders. *Journal of neuroimmunology* **2015**, *279*, 33–38, doi:10.1016/j.jneuroim.2014.12.003.
90. Meng, W.D.; Sun, S.J.; Yang, J.; Chu, R.X.; Tu, W.; Liu, Q. Elevated Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) but not BDNF Gene Val66Met Polymorphism Is Associated with Autism Spectrum Disorders. *Molecular neurobiology* **2017**, *54*, 1167–1172, doi:10.1007/s12035-016-9721-9.
91. de Azevedo Cardoso, T.; Mondin, T.C.; Wiener, C.D.; Marques, M.B.; Fucolo Bde, A.; Pinheiro, R.T.; de Souza, L.D.; da Silva, R.A.; Jansen, K.; Oses, J.P. Neurotrophic factors, clinical features and gender differences in depression. *Neurochemical research* **2014**, *39*, 1571–1578, doi:10.1007/s11064-014-1349-4.

92. Kotyuk, E.; Keszler, G.; Nemeth, N.; Ronai, Z.; Sasvari-Szekely, M.; Szekely, A. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) as a novel candidate gene of anxiety. *PloS one* **2013**, *8*, e80613, doi:10.1371/journal.pone.0080613.
93. Walz, J.C.; Andreazza, A.C.; Frey, B.N.; Cacilhas, A.A.; Cereser, K.M.; Cunha, A.B.; Weyne, F.; Stertz, L.; Santin, A.; Goncalves, C.A., et al. Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive episodes in bipolar disorder. *Neuroscience letters* **2007**, *415*, 87-89, doi:10.1016/j.neulet.2007.01.002.
94. Modarresi, F.; Faghihi, M.A.; Lopez-Toledano, M.A.; Fatemi, R.P.; Magistri, M.; Brothers, S.P.; van der Brug, M.P.; Wahlestedt, C. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nature biotechnology* **2012**, *30*, 453-459, doi:10.1038/nbt.2158.
95. Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & therapeutics* **2013**, *138*, 155-175, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
96. Bilgic, A.; Toker, A.; Isik, U.; Kilinc, I. Serum brain-derived neurotrophic factor, glial-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *European child & adolescent psychiatry* **2017**, *26*, 355-363, doi:10.1007/s00787-016-0898-2.
97. Briggs, J.A.; Wolvetang, E.J.; Mattick, J.S.; Rinn, J.L.; Barry, G. Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron* **2015**, *88*, 861-877, doi:10.1016/j.neuron.2015.09.045.
98. Fatemi, R.P.; Velmeshev, D.; Faghihi, M.A. De-repressing LncRNA-Targeted Genes to Upregulate Gene Expression: Focus on Small Molecule Therapeutics. *Molecular therapy. Nucleic acids* **2014**, *3*, e196, doi:10.1038/mtna.2014.45.
99. Choi, D.C.; Maguschak, K.A.; Ye, K.; Jang, S.W.; Myers, K.M.; Ressler, K.J. Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 2675-2680, doi:10.1073/pnas.0909359107.
100. Lipovich, L.; Dacht, F.; Cai, J.; Bagla, S.; Balan, K.; Jia, H.; Loeb, J.A. Activity-dependent human brain coding/noncoding gene regulatory networks. *Genetics* **2012**, *192*, 1133-1148, doi:10.1534/genetics.112.145128.
101. Zhang, Y.; Yan, L.; Cao, Y.; Kong, G.; Lin, C. Long noncoding RNA BDNF-AS protects local anesthetic induced neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2016**, *80*, 207-212, doi:10.1016/j.biopha.2016.03.003.
102. Wang, H.; Chan, S.A.; Ogier, M.; Hellard, D.; Wang, Q.; Smith, C.; Katz, D.M. Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in Mecp2 null mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2006**, *26*, 10911-10915, doi:10.1523/JNEUROSCI.1810-06.2006.
103. Rao, S.Q.; Hu, H.L.; Ye, N.; Shen, Y.; Xu, Q. Genetic variants in long non-coding RNA MIAT contribute to risk of paranoid schizophrenia in a Chinese Han population. *Schizophrenia research* **2015**, *166*, 125-130, doi:10.1016/j.schres.2015.04.032.
104. Sone, M.; Hayashi, T.; Tarui, H.; Agata, K.; Takeichi, M.; Nakagawa, S. The mRNA-like noncoding RNA Gomafu constitutes a novel nuclear domain in a subset of neurons. *Journal of cell science* **2007**, *120*, 2498-2506, doi:10.1242/jcs.009357.
105. Li, E.Y.; Zhao, P.J.; Jian, J.; Yin, B.Q.; Sun, Z.Y.; Xu, C.X.; Tang, Y.C.; Wu, H. LncRNA MIAT overexpression reduced neuron apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic injury through miR-211/GDNF. *Cell cycle* **2019**, *18*, 156-166, doi:10.1080/15384101.2018.1560202.

106. Jiang, Q.; Shan, K.; Qun-Wang, X.; Zhou, R.M.; Yang, H.; Liu, C.; Li, Y.J.; Yao, J.; Li, X.M.; Shen, Y., et al. Long non-coding RNA-MIAT promotes neurovascular remodeling in the eye and brain. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49688-49698, doi:10.18632/oncotarget.10434.
107. Albertson, D.N.; Schmidt, C.J.; Kapatos, G.; Bannon, M.J. Distinctive profiles of gene expression in the human nucleus accumbens associated with cocaine and heroin abuse. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 2304-2312, doi:10.1038/sj.npp.1301089.
108. Barry, G.; Briggs, J.A.; Vanichkina, D.P.; Poth, E.M.; Beveridge, N.J.; Ratnu, V.S.; Nayler, S.P.; Nones, K.; Hu, J.; Bredy, T.W., et al. The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing. *Molecular psychiatry* **2014**, *19*, 486-494, doi:10.1038/mp.2013.45.
109. Ip, J.Y.; Sone, M.; Nashiki, C.; Pan, Q.; Kitaichi, K.; Yanaka, K.; Abe, T.; Takao, K.; Miyakawa, T.; Blencowe, B.J., et al. Gomafu lncRNA knockout mice exhibit mild hyperactivity with enhanced responsiveness to the psychostimulant methamphetamine. *Scientific reports* **2016**, *6*, 27204, doi:10.1038/srep27204.
110. Hodge, R.G.; Ridley, A.J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2016**, *17*, 496-510, doi:10.1038/nrm.2016.67.
111. Govek, E.E.; Newey, S.E.; Van Aelst, L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* **2005**, *19*, 1-49, doi:10.1101/gad.1256405.
112. Zamboni, V.; Jones, R.; Umbach, A.; Ammoni, A.; Passafaro, M.; Hirsch, E.; Merlo, G.R. Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19061821.
113. Seger, R.; Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, *9*, 726-735.
114. Cargnello, M.; Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2011**, *75*, 50-83, doi:10.1128/MMBR.00031-10.
115. Keshet, Y.; Seger, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in molecular biology* **2010**, *661*, 3-38, doi:10.1007/978-1-60761-795-2_1.
116. Miller, F.D.; Gauthier, A.S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* **2007**, *54*, 357-369, doi:10.1016/j.neuron.2007.04.019.
117. Sweatt, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* **2004**, *14*, 311-317, doi:10.1016/j.conb.2004.04.001.
118. Albert-Gasco, H.; Ros-Bernal, F.; Castillo-Gomez, E.; Olucha-Bordonau, F.E. MAP/ERK Signaling in Developing Cognitive and Emotional Function and Its Effect on Pathological and Neurodegenerative Processes. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21124471.
119. Vithayathil, J.; Pucilowska, J.; Landreth, G.E. ERK/MAPK signaling and autism spectrum disorders. *Progress in brain research* **2018**, *241*, 63-112, doi:10.1016/bs.pbr.2018.09.008.
120. Subramanian, M.; Timmerman, C.K.; Schwartz, J.L.; Pham, D.L.; Meffert, M.K. Characterizing autism spectrum disorders by key biochemical pathways. *Frontiers in neuroscience* **2015**, *9*, 313, doi:10.3389/fnins.2015.00313.

121. Yufune, S.; Satoh, Y.; Takamatsu, I.; Ohta, H.; Kobayashi, Y.; Takaenoki, Y.; Pages, G.; Pouyssegur, J.; Endo, S.; Kazama, T. Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Scientific reports* **2015**, *5*, 10252, doi:10.1038/srep10252.
122. Paoletti, P.; Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current opinion in pharmacology* **2007**, *7*, 39-47, doi:10.1016/j.coph.2006.08.011.
123. Kohr, G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and tissue research* **2006**, *326*, 439-446, doi:10.1007/s00441-006-0273-6.
124. Wu, Q.J.; Tymianski, M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular brain* **2018**, *11*, 15, doi:10.1186/s13041-018-0357-8.
125. Burnashev, N.; Szepietowski, P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Current opinion in pharmacology* **2015**, *20*, 73-82, doi:10.1016/j.coph.2014.11.008.
126. Mota, S.I.; Ferreira, I.L.; Rego, A.C. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology* **2014**, *76 Pt A*, 16-26, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.013.
127. Li, D.; Zhang, J.; Wang, M.; Li, X.; Gong, H.; Tang, H.; Chen, L.; Wan, L.; Liu, Q. Activity dependent LoNA regulates translation by coordinating rRNA transcription and methylation. *Nature communications* **2018**, *9*, 1726, doi:10.1038/s41467-018-04072-4.
128. Gamache, T.R.; Araki, Y.; Huganir, R.L. Twenty Years of SynGAP Research: From Synapses to Cognition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2020**, *40*, 1596-1605, doi:10.1523/JNEUROSCI.0420-19.2020.
129. Velmeshev, D.; Magistri, M.; Faghihi, M.A. Expression of non-protein-coding antisense RNAs in genomic regions related to autism spectrum disorders. *Molecular autism* **2013**, *4*, 32, doi:10.1186/2040-2392-4-32.
130. Hamdan, F.F.; Gauthier, J.; Spiegelman, D.; Noreau, A.; Yang, Y.; Pellerin, S.; Dobrzeniecka, S.; Cote, M.; Perreau-Linck, E.; Carmant, L., et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *The New England journal of medicine* **2009**, *360*, 599-605, doi:10.1056/NEJMoa0805392.
131. Araki, Y.; Hong, I.; Gamache, T.R.; Ju, S.; Collado-Torres, L.; Shin, J.H.; Huganir, R.L. SynGAP isoforms differentially regulate synaptic plasticity and dendritic development. *eLife* **2020**, *9*, doi:10.7554/eLife.56273.
132. Agarwal, M.; Johnston, M.V.; Stafstrom, C.E. SYNGAP1 mutations: Clinical, genetic, and pathophysiological features. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **2019**, *78*, 65-76, doi:10.1016/j.ijdevneu.2019.08.003.
133. Kilinc, M.; Creson, T.; Rojas, C.; Aceti, M.; Ellegood, J.; Vaissiere, T.; Lerch, J.P.; Rumbaugh, G. Species-conserved SYNGAP1 phenotypes associated with neurodevelopmental disorders. *Molecular and cellular neurosciences* **2018**, *91*, 140-150, doi:10.1016/j.mcn.2018.03.008.
134. Berryer, M.H.; Hamdan, F.F.; Klitten, L.L.; Moller, R.S.; Carmant, L.; Schwartzenruber, J.; Patry, L.; Dobrzeniecka, S.; Rochefort, D.; Neugnot-Ceroli, M., et al. Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency. *Human mutation* **2013**, *34*, 385-394, doi:10.1002/humu.22248.
135. Liyanage, V.R.B. Role of RNA Methylation and Non-Coding RNAs in Pathobiology of Autism Spectrum Disorders. *Biomedical Sciences* **2016**, *2*, 24-33, doi:10.11648/j.bs.20160204.11.

136. Ji, P.; Diederichs, S.; Wang, W.; Boing, S.; Metzger, R.; Schneider, P.M.; Tidow, N.; Brandt, B.; Buerger, H.; Bulk, E., et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* **2003**, *22*, 8031-8041, doi:10.1038/sj.onc.1206928.
137. Tian, X.; Xu, G. Clinical value of lncRNA MALAT1 as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ open* **2015**, *5*, e008653, doi:10.1136/bmjopen-2015-008653.
138. Li, Z.; Xu, C.; Ding, B.; Gao, M.; Wei, X.; Ji, N. Long non-coding RNA MALAT1 promotes proliferation and suppresses apoptosis of glioma cells through derepressing Rap1B by sponging miR-101. *Journal of neuro-oncology* **2017**, *134*, 19-28, doi:10.1007/s11060-017-2498-5.
139. Chen, Y.; Huang, W.; Sun, W.; Zheng, B.; Wang, C.; Luo, Z.; Wang, J.; Yan, W. LncRNA MALAT1 Promotes Cancer Metastasis in Osteosarcoma via Activation of the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2018**, *51*, 1313-1326, doi:10.1159/000495550.
140. Ng, S.Y.; Lin, L.; Soh, B.S.; Stanton, L.W. Long noncoding RNAs in development and disease of the central nervous system. *Trends in genetics : TIG* **2013**, *29*, 461-468, doi:10.1016/j.tig.2013.03.002.
141. Bernard, D.; Prasanth, K.V.; Tripathi, V.; Colasse, S.; Nakamura, T.; Xuan, Z.; Zhang, M.Q.; Sedel, F.; Jourdain, L.; Couplier, F., et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *The EMBO journal* **2010**, *29*, 3082-3093, doi:10.1038/emboj.2010.199.
142. Li, D.; Zhang, J.; Li, X.; Chen, Y.; Yu, F.; Liu, Q. Insights into lncRNAs in Alzheimer's disease mechanisms. *RNA biology* **2020**, 10.1080/15476286.2020.1788848, 1-11, doi:10.1080/15476286.2020.1788848.
143. Chen, L.; Feng, P.; Zhu, X.; He, S.; Duan, J.; Zhou, D. Long non-coding RNA Malat1 promotes neurite outgrowth through activation of ERK/MAPK signalling pathway in N2a cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **2016**, *20*, 2102-2110, doi:10.1111/jcmm.12904.
144. Shi, Y.L.; Wang, Q.; Wei, J.C. Influence of lncRNA-MALAT1 on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through regulating the ERK/MAPK signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences* **2019**, *23*, 8039-8048, doi:10.26355/eurev_201909_19020.
145. Zhu, Y.; Li, Y.; Dai, C.; Sun, L.; You, L.; De, W.; Yuan, Q.; Wang, N.; Chen, Y. Inhibition of Lincpint expression affects insulin secretion and apoptosis in mouse pancreatic beta cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2018**, *104*, 171-179, doi:10.1016/j.biocel.2018.09.004.
146. Marin-Bejar, O.; Marchese, F.P.; Athie, A.; Sanchez, Y.; Gonzalez, J.; Segura, V.; Huang, L.; Moreno, I.; Navarro, A.; Monzo, M., et al. Pint lincRNA connects the p53 pathway with epigenetic silencing by the Polycomb repressive complex 2. *Genome biology* **2013**, *14*, R104, doi:10.1186/gb-2013-14-9-r104.
147. Bluthgen, N.; van Bentum, M.; Merz, B.; Kuhl, D.; Hermey, G. Profiling the MAPK/ERK dependent and independent activity regulated transcriptional programs in the murine hippocampus in vivo. *Scientific reports* **2017**, *7*, 45101, doi:10.1038/srep45101.
148. An, H.; Williams, N.G.; Shelkownikova, T.A. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing lnc found? *Non-coding RNA research* **2018**, *3*, 243-252, doi:10.1016/j.ncrna.2018.11.003.
149. Sasaki, Y.T.; Ideue, T.; Sano, M.; Mituyama, T.; Hirose, T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 2525-2530, doi:10.1073/pnas.0807899106.

150. Huang, Z.; Zhao, J.; Wang, W.; Zhou, J.; Zhang, J. Depletion of LncRNA NEAT1 Rescues Mitochondrial Dysfunction Through NEDD4L-Dependent PINK1 Degradation in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience* **2020**, *14*, 28, doi:10.3389/fncel.2020.00028.
151. Klec, C.; Prinz, F.; Pichler, M. Involvement of the long noncoding RNA NEAT1 in carcinogenesis. *Molecular oncology* **2019**, *13*, 46–60, doi:10.1002/1878-0261.12404.
152. Prinz, F.; Kapeller, A.; Pichler, M.; Klec, C. The Implications of the Long Non-Coding RNA NEAT1 in Non-Cancerous Diseases. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20030627.
153. Melland, H.; Carr, E.M.; Gordon, S.L. Disorders of synaptic vesicle fusion machinery. *Journal of neurochemistry* **2020**, 10.1111/jnc.15181, doi:10.1111/jnc.15181.
154. Owens, D.F.; Kriegstein, A.R. Developmental neurotransmitters? *Neuron* **2002**, *36*, 989–991, doi:10.1016/s0896-6273(02)01136-4.
155. Elbert, A. Chromatin or omatin organizer CTCF in br CF in brain development and beha elopment and behaviour. Electronic Thesis and Dissertation Repository, Western University Ontario, CA, 2018.
156. Broek, J.A.C.; Lin, Z.; de Gruiter, H.M.; van 't Spijker, H.; Haasdijk, E.D.; Cox, D.; Ozcan, S.; van Cappellen, G.W.A.; Houtsmuller, A.B.; Willemsen, R., et al. Synaptic vesicle dynamic changes in a model of fragile X. *Molecular autism* **2016**, *7*, 17, doi:10.1186/s13229-016-0080-1.
157. Salpietro, V.; Malintan, N.T.; Llano-Rivas, I.; Spaeth, C.G.; Efthymiou, S.; Striano, P.; Vandrovcova, J.; Cutrupi, M.C.; Chimenz, R.; David, E., et al. Mutations in the Neuronal Vesicular SNARE VAMP2 Affect Synaptic Membrane Fusion and Impair Human Neurodevelopment. *American journal of human genetics* **2019**, *104*, 721–730, doi:10.1016/j.ajhg.2019.02.016.
158. Chen, Y.A.; Scales, S.J.; Patel, S.M.; Doung, Y.C.; Scheller, R.H. SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion. *Cell* **1999**, *97*, 165–174, doi:10.1016/s0092-8674(00)80727-8.
159. Elfving, B.; Muller, H.K.; Oliveras, I.; Osterbog, T.B.; Rio-Alamos, C.; Sanchez-Gonzalez, A.; Tobena, A.; Fernandez-Teruel, A.; Aznar, S. Differential expression of synaptic markers regulated during neurodevelopment in a rat model of schizophrenia-like behavior. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2019**, *95*, 109669, doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109669.
160. Wang, C.; Yang, B.; Fang, D.; Zeng, H.; Chen, X.; Peng, G.; Cheng, Q.; Liang, G. The impact of SNAP25 on brain functional connectivity density and working memory in ADHD. *Biological psychology* **2018**, *138*, 35–40, doi:10.1016/j.biopsycho.2018.08.005.
161. Mustafin, R.N.; Enikeeva, R.F.; Malykh, S.B.; Valinurov, R.G.; Khusnutdinova, E.K. [Genetics and epigenetics of attention deficit hyperactivity disorder]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* **2018**, *118*, 106–110, doi:10.17116/jnevro2018118091106.
162. Hawi, Z.; Cummins, T.D.; Tong, J.; Johnson, B.; Lau, R.; Samarra, W.; Bellgrove, M.A. The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry* **2015**, *20*, 289–297, doi:10.1038/mp.2014.183.
163. Keihani, S.; Kluever, V.; Mandad, S.; Bansal, V.; Rahman, R.; Fritsch, E.; Gomes, L.C.; Gartner, A.; Kugler, S.; Urlaub, H., et al. The long noncoding RNA neuroLNC regulates presynaptic activity by interacting with the neurodegeneration-associated protein TDP-43. *Science advances* **2019**, *5*, eaay2670, doi:10.1126/sciadv.aay2670.
164. Ling, S.C. Synaptic Paths to Neurodegeneration: The Emerging Role of TDP-43 and FUS in Synaptic Functions. *Neural plasticity* **2018**, *2018*, 8413496, doi:10.1155/2018/8413496.

165. Liu, G.; Coyne, A.N.; Pei, F.; Vaughan, S.; Chaung, M.; Zarnescu, D.C.; Buchan, J.R. Endocytosis regulates TDP-43 toxicity and turnover. *Nature communications* **2017**, *8*, 2092, doi:10.1038/s41467-017-02017-x.
166. Ling, S.C.; Polymenidou, M.; Cleveland, D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **2013**, *79*, 416-438, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.033.
167. Burk, K.; Pasterkamp, R.J. Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* **2019**, *137*, 859-877, doi:10.1007/s00401-019-01964-7.
168. Schwenk, B.M.; Hartmann, H.; Serdaroglu, A.; Schludi, M.H.; Hornburg, D.; Meissner, F.; Orozco, D.; Colombo, A.; Tahirovic, S.; Michaelsen, M., et al. TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *The EMBO journal* **2016**, *35*, 2350-2370, doi:10.15252/embj.201694221.
169. Long, Y.; Wang, X.; Youmans, D.T.; Cech, T.R. How do lncRNAs regulate transcription? *Science advances* **2017**, *3*, eaao2110, doi:10.1126/sciadv.aao2110.
170. Tsai, M.C.; Manor, O.; Wan, Y.; Mosammaparast, N.; Wang, J.K.; Lan, F.; Shi, Y.; Segal, E.; Chang, H.Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **2010**, *329*, 689-693, doi:10.1126/science.1192002.
171. Chalei, V.; Sansom, S.N.; Kong, L.; Lee, S.; Montiel, J.F.; Vance, K.W.; Ponting, C.P. The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation. *eLife* **2014**, *3*, e04530, doi:10.7554/eLife.04530.
172. Nakai, S.; Sugitani, Y.; Sato, H.; Ito, S.; Miura, Y.; Ogawa, M.; Nishi, M.; Jishage, K.; Minowa, O.; Noda, T. Crucial roles of Brn1 in distal tubule formation and function in mouse kidney. *Development* **2003**, *130*, 4751-4759, doi:10.1242/dev.00666.
173. Gu, Y.; Xiang, B.; Zhu, L.; Ma, X.; Chen, X.; Cai, T. Three intellectual disability-associated de novo mutations in MECP2 identified by trio-WES analysis. *BMC medical genetics* **2020**, *21*, 99, doi:10.1186/s12881-020-01042-w.
174. Gonzales, M.L.; LaSalle, J.M. The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. *Current psychiatry reports* **2010**, *12*, 127-134, doi:10.1007/s11920-010-0097-7.
175. Amir, R.E.; Van den Veyver, I.B.; Wan, M.; Tran, C.Q.; Francke, U.; Zoghbi, H.Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature genetics* **1999**, *23*, 185-188, doi:10.1038/13810.
176. Maxwell, S.S.; Pelka, G.J.; Tam, P.P.; El-Osta, A. Chromatin context and ncRNA highlight targets of MeCP2 in brain. *RNA biology* **2013**, *10*, 1741-1757, doi:10.4161/rna.26921.
177. Keppetipola, N.; Sharma, S.; Li, Q.; Black, D.L. Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2012**, *47*, 360-378, doi:10.3109/10409238.2012.691456.
178. Lin, N.; Chang, K.Y.; Li, Z.; Gates, K.; Rana, Z.A.; Dang, J.; Zhang, D.; Han, T.; Yang, C.S.; Cunningham, T.J., et al. An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Molecular cell* **2014**, *53*, 1005-1019, doi:10.1016/j.molcel.2014.01.021.
179. Aprea, J.; Prenninger, S.; Dori, M.; Ghosh, T.; Monasor, L.S.; Wessendorf, E.; Zocher, S.; Massalini, S.; Alexopoulou, D.; Lesche, M., et al. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *The EMBO journal* **2013**, *32*, 3145-3160, doi:10.1038/emboj.2013.245.
180. Ray, M.K.; Wiskow, O.; King, M.J.; Ismail, N.; Ergun, A.; Wang, Y.; Plys, A.J.; Davis, C.P.; Kathrein, K.; Sadreyev, R., et al. CAT7 and cat7l Long Non-coding RNAs Tune Polycomb Repressive Complex 1 Function during

Human and Zebrafish Development. *The Journal of biological chemistry* **2016**, *291*, 19558-19572, doi:10.1074/jbc.M116.730853.