

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL IV – BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE**

CĂTĂLIN-FLAVIUS PRODAN-BĂRBULESCU



TEZĂ DE DOCTORAT

**ROLUL NON-CODING RNA ÎN DIAGNOSTICUL TULBURĂRII
DEPRESIVE MAJORE**

R E Z U M A T

Coordonator științific:
PROF. UNIV. DR. EDWARD-PAUL ȘECLĂMAN

**Timișoara
2025**

REZUMAT

Tulburarea depresivă majoră (TDM) este o problemă semnificativă de sănătate la nivel mondial, care necesită detectare precoce, diagnostic precis și tratament eficient. Tendința actuală în medicină este orientată spre medicina moleculară personalizată, care identifică particularitățile fiecărui individ afectat de o anumită patologie și direcționează eforturile colective către crearea de noi compuși pentru neutralizarea sau corectarea tulburărilor existente. Medicina bazată pe dovezi aduce din ce în ce mai multe beneficii și valoare în gestionarea patologiilor și demontează mituri care au fost cândva panacee.

Din punct de vedere clinic, TDM este o tulburare psihiatrică care necesită cel puțin cinci simptome pe parcursul unei perioade de două săptămâni, dintre care cel puțin unul este: dispoziția depresivă, pierderea plăcerii sau a interesului. Aceste simptome trebuie să provoace suferință semnificativă din punct de vedere clinic sau să afecteze funcționarea socială, profesională sau alte domenii importante de funcționare și nu trebuie să poată fi atribuite altor afecțiuni medicale consumului de medicamente sau abuzul de anumite substanțe toxice. DSM 5-TR precizează, de asemenea, că trebuie excluse criteriile pentru un episod de manie sau hipomanie în vederea excluderii unei tulburări bipolare. ICD-11 pune accentul pe severitatea episoadelor depresive (ușoară, moderată, severă) în funcție de intensitatea simptomelor, frecvența acestora și de impactul lor asupra funcționării zilnice.

miRNA-urile, acizi ribonucleici mici, non-codanți, monocatenari, sunt utilizați în prezent ca biomarkeri pentru diferite patologii organice și non-organice. Acești biomarkeri sunt deosebit de relevanți în TDM datorită variațiilor lor plasmatică care survin la pacienții depresivi. De exemplu, este bine cunoscută variația lui **hsa-miR-132** și **hsa-miR-124**, la pacienții TDM fiind asociate cu fenomenele de neuroinflamație și plasticitate sinaptică. Aceste entități reprezintă o *țintă* datorită stabilității lor, detectării simple, accesibile și necostisitoare, și expresiei specifice patologiei.

Exceptând sfera diagnosticului, miRNA-urile sunt deosebit de atractive în cercetare și din prisma posibilității aplicării unor terapii țintite anti-miRNA. Aceste terapii țintite pot avea atât rol de antagonist (inhibitori miRNA – antagomir), cât și agonist (stimulatori miRNA – efecte tip miRNA-like).

În cadrul acestui studiu am avut ca obiective: identificarea și evaluarea unor miRNA-uri, ca biomarkeri plasmatici în rândul pacienților depresivi.

Studiul de față a inclus 10 pacienți cu tulburare depresivă majoră (MDD) și 8 subiecți sănătoși din grupul de control. Participanții au fost pacienți ai Clinicii „Eduard Pamfil” din Timișoara, din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara. Participanții au îndeplinit criteriile de diagnostic pentru un episod depresiv major, enumerate în Manualul de Diagnostic și Statistică al Tulburărilor Mentale, anula a cincea (DSM-V).

Prelevarea probelor a fost realizată conform protocolului, selectând pacienții care au îndeplinit criteriile de includere. Această abordare a fost adecvată, având în vedere contextul clinicii și specificul populației studiate. Studiul a fost efectuat în conformitate cu principiile etice, aderând la Declarația de la Helsinki, care prezintă liniile directoare etice pentru cercetarea medicală care implică subiecți umani.

Studiul a fost aprobat de către Consiliul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, asigurându-se că cercetarea aderă la standardele etice și respectă drepturile participanților, cărora li s-a garantat participarea voluntară și s-au putut retrage în orice moment, fără consecințe.

Criterii de includere au fost următoarele: vârsta cuprinsă între 18 și 65 de ani, diagnostic pozitiv de TDM conform criteriilor DSM-IV-TR și posibilitatea de a-și da consimțământul în deplinătatea cauzei diagnosticului. Criterii de excludere au fost următoarele: prezența altor tulburări psihiatrice în evoluție, tratament antidepresiv cu 12 luni înainte de înscriere, medicație cronică pentru afecțiuni medicale comorbide cu 12 luni înainte sau în timpul studiului și posibilitatea de intervenție chirurgicală în timpul studiului.

Probele de sânge au fost colectate folosind EDTA, iar plasma a fost separată prin centrifugare și stocată la -80 °C până la utilizarea ulterioară. ARN-ul total care conține miRNA a fost extras folosind kitul miRNeasy Serum / Plasma, inclusiv C. elegans miR-39 mimic spike in și UniSp2, 4 și 5 ca un control intern pentru normalizare, în conformitate cu recomandările producătorului.

Expresia miRNA matur a fost determinată utilizând qPCR în timp real, folosind un sistem ABI 7900HT și utilizând un panou de miRNA de profil miRNA miRCURY LNA miRNA. Datele qPCR au fost analizate prin utilizarea QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center.

Analiza statistică a fost efectuată prin analizarea valorilor medii ale probelor și determinând semnificația rezultatelor. Valorile au fost calculate pe baza unui test t-pereche pentru semnificație statistică. Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) este expresia normalizată a unui miRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) în test, în timp ce valorile p au fost calculate pe baza unui test Student pentru valorile Δ replicare la 2-3 CT pentru fiecare genă în grupurile de control și tratament.

O altă latură a studiului este reprezentată de bioinformatică și de corelarea miRNA-urilor obținute cu anumite căi metabolice.

În cadrul studiului curent s-a utilizat baza de date miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php, accesată la 30 august 2024) pentru evaluarea celor mai importante 5 miR-uri supraexprimate legate de TDM cu cele mai mari valori de FC (fold change) identificate în prezentul studiu.

S-au selectat genele țintă cu două sau mai multe metode de verificare. Genele selectate au fost încărcate pe site-ul Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>, accesat la 30 august 2024) și căile legate de TDM au fost selectate prin utilizarea Reactome și KEGG ca baze de date de referință. Căile rezultate au fost corelate cu datele publicate privind TDM. O valoare a lui p sub 0,05 a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

Analiza bioinformatică a primelor gene cele mai relevante cu cele mai mari valori FR în studiul cortexului frontal a ajutat la identificarea pacienților cu TDM actual și sugerează că aceștia pot fi candidați pentru alte boli neurologice sau neurodegenerative.

Impactul clinic al acestor constatări ar putea ajuta la identificarea unui subgrup de pacienți cu TDM cu o semnificație prognostică ridicată pentru viitoarele boli neurodegenerative. O eterogenitate ridicată a genelor a fost identificată în timpul analizei fiecărui miARN. Pentru hsa-miR-874-3p, au fost identificate 62 de gene cu tulburare depresivă majoră. Analiza de îmbogățire a identificat 17 gene semnificative, dintre care șapte au fost direct legate de tulburările depresive majore în literatura de specialitate. Clusterelor 7 au inclus majoritatea tulburărilor sistemului nervos legate de TDM, în timp ce clusterul 5 a fost legat de metabolismul arahidinei și semnalizarea hormonului tiroidian. Cea mai mare valoare a ARN a fost hsa-let-7d-5p, dar nu a fost identificată nicio cale semnificativă legată de TDM. Ultimul miARN analizat a fost hsa-miR-140-5p, cu 87 de gene asociate, care corespund cu 28 de gene semnificative în principalele boli maligne.

În materie de rezultate, panelul este format din aproximativ 30 de biomarkeri obținuți din studiul a două grupuri de populație pe grupuri TDM, aliniați cu literatura de specialitate prin două articole originale publicate în reviste internaționale. Dintre acești biomarkeri, este esențial să fie citați cei care au exprimat cele mai semnificative variații plasmatice la pacienții depresivi, inclusiv **hsa-miR-874-3p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-532-3p, hsa-mir-532-5p, hsa-mir-339-5p și hsa-mir-18b-5p.**

În primul studiu, am obținut un set de miRNA-uri, reprezentat în principal de **hsa-miR 874-3p, hsa-let-7d-5p și hsa-miR-93-3p**, care prezintă o creștere semnificativă a nivelurilor plasmatice la pacienții cu TDM în cadrul grupului de studiu. Aceste constatări evidențiază

potențialul **hsa-miR-874-3p**, **hsa-let-7d-5p** și **hsa-miR-93-3p** ca biomarkeri plasmatici veritabili pentru TDM, sugerând rolul lor pivot în fiziopatologia acestei tulburări.

Rezultatele studiului subliniază necesitatea standardizării protocoalelor pentru încorporarea acestor miRNA-uri în practica clinică, relevând utilitatea potențială a acestora atât în diagnosticarea, cât și în urmărirea terapeutică a pacienților cu TDM. O astfel de standardizare ar putea deschide calea pentru abordări mai precise și personalizate în ceea ce privește gestionarea TDM, îmbunătățind, în cele din urmă, rezultatele pacienților.

Cu toate acestea, natura promițătoare a acestor biomarkeri necesită, de asemenea, continuarea cercetării. Studiile viitoare ar trebui să se concentreze pe validarea aplicabilității clinice a acestor miRNA-uri la diferite populații și medii clinice. În plus, sunt necesare evaluări detaliate pentru a explora potențialul acestor biomarkeri în personalizarea strategiilor de tratament, asigurând faptul că intervențiile terapeutice pot fi adaptate profilurilor biologice unice ale fiecărui pacient.

În cel de-al doilea studiu, am decelat multiple variații semnificative ale profilurilor de expresie miRNA în rândul pacienților TDM. În mod specific, am identificat 15 miRNA-uri cu variații notabile, dintre care mai multe au prezentat modificări substanțiale ale FR și niveluri plasmatice crescute la pacienții cu TDM. Aceste constatări evidențiază potențialul acestor miRNA-uri ca biomarkeri de diagnostic promițători pentru TDM.

Cele mai reprezentative miRNA-uri din studiul efectuat sunt: **hsa-miR-532-5p**, **hsa-miR-532-3p** și **hsa-miR-339-5p**, fiind enumerate în ordinea lor descrescătoare. Caracterul înalt variabil al acestor miRNA-uri m-a condus spre ideea de a crea un *clasament* al acestora, care să releve importanța lor funcțională.

Desigur că acest clasament nu este o entitate care aparține teoriei formelor fără font, ci etalarea lor în această ordine s-a realizat bazându-mă pe valorile FC pe care le-am obținut prin cuantificarea miRNA-urilor și prin analiza statistică.

În mod sigur, la demararea acestui studiu, a existat întrebarea:

„Există miRNA-uri care să mă ajute să diferențiez între pacienți și controlii?” Răspunsul la această întrebare nu s-a putut obține fără utilizarea analizei ROC, care m-a ajutat să identific câțiva biomarkeri surprinzători de utili pentru clinicienii acestui domeniu și nu numai.

Consider cel puțin importantă citarea acestora: **hsa-miR-29c-3p**, **hsa-miR-376a-3p**, **hsa-miR-532-5p** și **hsa-miR-339-5p**. Biomarkerii indicați au prezentat ASC de peste 0,8, ceea ce ne indică o capacitate excelentă de discriminare între pacienții cu TDM și subiecții sănătoși.

hsa-miR-29c-3p este unul dintre biomarkeri cu cele mai mari valori ale AUC (0.83), ceea ce îi facilitează rolul său de biomarker, dobândind chiar primele locuri în lista miRNA-urilor studiate, din prisma performanței discriminatorii dintre pacienți și martori.

Deși aceste rezultate oferă o perspectivă valoroasă asupra fundamentelor moleculare ale TDM, este imperativ să se efectueze cercetări suplimentare pentru a valida aceste constatări în cohorte independente mai mari și pentru a elucida rolurile funcționale precise ale acestor miRNA-uri în fiziopatologia TDM.

Studiul de față reprezintă doar un „screenshot” în procesul evolutiv al diagnosticului acestei tulburări psihiatrice, aflându-se ca un scurt reper pe axa cronologică a multiplelor studii cu referire la miRNA și depresie. Locul acestei lucrări în literatura de specialitate și utilitatea sa clinică va fi decisă și de proba timpului. Cu certitudine, cercetarea moleculară în tulburarea depresivă majoră continuă și va fi marcată de o serie de studii ample și valoroase.

În concluzie, depresia este o interacțiune complexă de factori biologici, psihologici și de mediu, fiind asemenea unui „balet” de neurotransmițători perturbații, predispoziții genetice și experiențe trăite.

În mod specific, contribuția mea în cadrul acestei teme vaste, complexe și intens dezbătute constă în identificarea a două seturi de miRNA-uri, care au exprimat variații semnificative statistic, în cadrul lotului TDM comparativ cu lotul martor și care aspiră la rolul de biomarkeri plasmatici pentru pacienții depresivi.

Cele mai relevante miRNA-uri care aparțin acestor seturi sunt: **hsa-miR 874-3p**, **hsa-let-7d-5p**, **hsa-miR-93-3p**, **hsa-miR-532-5p**, **hsa-miR 532-3p** și **hsa-miR-339-5p**. Importanța miRNA-urilor enumerate este dată de semnificația statistică pe care am obținut-o în cazul acestor miRNA-uri, mai exact de cele mai reprezentative valori p și FR.

Astfel că, aceste constatări evidențiază potențialul lor de biomarkeri plasmatici veritabili pentru TDM, sugerând rolul lor pivot în fiziopatologia acestei tulburări.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Edward Paul Șeclăman, Virgil Enătescu, Ionuț Flaviu Faur, Laura Andreea Ghenciu, Paul Tuțac, Paul Pașca, and Laura Octavia Grigoriță. 2024. "Evaluating the Connection between MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs for the Establishment of the Major Depressive Disorder Diagnosis" *Biomedicines* 12, no. 3: 516.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12030516>
2. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Cristian Daniel Alin, Ionuț Flaviu Faur, Georgeta Cristiana Bujor, Edward Paul Șeclăman, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Dănilă, Ecaterina Dăescu, Rami Hajjar, Laura Andreea Ghenciu, and et al. 2024. "Identification of Specific Plasma miRNAs as Potential Biomarkers for Major Depressive Disorder" *Biomedicines* 12, no. 10: 2165.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12102165>
3. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Laura Andreea Ghenciu, Edward Șeclăman, Georgeta Cristiana Bujor, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Danila, Ecaterina Dăescu, Luminioara Maria Rosu, Ionuț Flaviu Faur, Paul Tuțac, and et al. 2024. "Exploring miRNA Biomarkers in Major Depressive Disorder: A Molecular Medicine Perspective" *Current Issues in Molecular Biology* 46, no. 10: 10846-10853.
IF: 2,8
<https://doi.org/10.3390/cimb46100644>

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT IV – BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY**

CĂTĂLIN-FLAVIUS PRODAN-BĂRBULESCU



PhD THESIS

**ROLE OF NON-CODING RNA IN THE DIAGNOSIS OF
MAJOR DEPRESSIVE DISORDER**

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:
PROF. UNIV. DR. EDWARD-PAUL ȘECLĂMAN

**Timișoara
2025**

ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a significant global health problem requiring early detection, accurate diagnosis and effective treatment. The current trend in medicine is towards personalized molecular medicine, which identifies the particularities of each individual affected by a particular pathology and directs collective efforts towards the creation of new compounds to neutralize or correct existing disorders. Evidence-based medicine is increasingly bringing benefits and value in the management of pathologies and debunking myths that were once panaceas.

Clinically, MDD is a psychiatric disorder that requires at least five symptoms over a two week period, at least one of which is: depressed mood, loss of pleasure or loss of interest. These symptoms must cause clinically significant distress or impair social, occupational, or other important areas of functioning and must not be attributable to other medical conditions such as drug use or substance abuse. The DSM-5-TR also states that criteria for an episode of mania or hypomania must be excluded in order to exclude bipolar disorder. ICD-11 emphasizes the severity of depressive episodes (mild, moderate, severe) in terms of the intensity of symptoms, their frequency, and their impact on daily functioning.

miRNAs, small, non-coding, single-stranded, non-coding ribonucleic acids, are currently used as biomarkers for various organic and non-organic pathologies. These biomarkers are particularly relevant in MDD because of their plasma variations that occur in depressed patients. For example, the variation of hsa-miR-132 and hsa-miR-124 is well known to be associated with neuroinflammation and synaptic plasticity in MDD patients. These entities represent a target due to their stability, simple, accessible and inexpensive detection, and pathology-specific expression.

Apart from the field of diagnosis, miRNAs are also particularly attractive in research because of the possibility of applying targeted anti-miRNA therapies. These targeted therapies can have both antagonist (miRNA inhibitors - antagomir) and agonist (miRNA stimulators - miRNA-like effects) roles.

In this study we aimed to identify and evaluate miRNAs as plasma biomarkers in depressed patients.

The present study included 10 patients with major depressive disorder (MDD) and 8 healthy control subjects. The participants were patients of the "Eduard Pamfil" Clinic in Timisoara, Timisoara, within the "Pius Brînzeu" County Emergency Hospital of Timisoara. The

participants met the diagnostic criteria for a major depressive episode, as listed in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth year (DSM-V).

Sampling was performed according to protocol, selecting patients who met the inclusion criteria. This approach was appropriate given the clinical context and the specifics of the study population. The study was conducted in accordance with ethical principles, adhering to the Declaration of Helsinki, which outlines ethical guidelines for medical research involving human subjects.

The study was approved by the Ethics Board of the "Victor Babes" University of Medicine and Pharmacy of Timisoara, ensuring that the research adhered to ethical standards and respected the rights of the participants, who were guaranteed voluntary participation and could withdraw at any time without consequences.

Inclusion criteria were as follows: age between 18 and 65 years, positive diagnosis of MDD according to DSM-IV-TR criteria, and the ability to give consent in full knowledge of the diagnosis. Exclusion criteria were as follows: presence of other psychiatric disorders in progress, antidepressant treatment 12 months prior to enrollment, chronic medication for comorbid medical conditions 12 months prior to or during the study, and possibility of surgery during the study.

Blood samples were collected using EDTA, and plasma was separated by centrifugation and stored at -80 °C until further use. Total miRNA-containing RNA was extracted using the miRNeasy Serum/Plasma kit, including C. elegans miR-39 mimic C. elegans miR-39 spike-in and UniSp2, 4 and 5 as an internal control for normalization according to the manufacturer's recommendations.

Mature miRNA expression was determined using real-time qPCR using an ABI 7900HT system and utilizing a miRCURY LNA miRNA miRNA profiling panel miRCURY LNA miRNA. The qPCR data were analyzed using the QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center.

Statistical analysis was performed by analyzing sample mean values and determining the significance of the results. Values were calculated using a paired t-test for statistical significance. Fold change ($2^{-\Delta\Delta\Delta CT}$) is the normalized expression of a miRNA ($2^{-\Delta\Delta\Delta CT}$) in the assay, while p-values were calculated based on a Student's t-test for Δ values replicated at 2-3 CT for each gene in control and treatment groups.

Another side of the study is bioinformatics and the correlation of the obtained miRNAs with specific metabolic pathways.

In the current study, the miRTarBase database (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php, accessed August 30, 2024) was used to evaluate the top 5 overexpressed miRs linked to TDM with the highest FC (fold change) values identified in the present study.

Target genes with two or more verification methods were selected. Selected genes were uploaded to the Enrichr website (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>, accessed August 30, 2024) and TDM-related pathways were selected using Reactome and KEGG as reference databases. The resulting pathways were correlated with published TDM data. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

Bioinformatic analysis of the first most relevant genes with the highest FR values in the frontal cortex study helped to identify patients with current MDD and suggests that they may be candidates for other neurologic or neurodegenerative diseases.

The clinical impact of these findings could help to identify a subgroup of TDM patients with high prognostic significance for future neurodegenerative diseases. High gene heterogeneity was identified during analysis of each miRNA. For hsa-miR-874-3p, 62 major depressive disorder genes were identified. Enrichment analysis identified 17 significant genes, seven of which have been directly linked to major depressive disorder in the literature. Cluster 7 included most nervous system disorders related to MDD, while cluster 5 was related to arachidine metabolism and thyroid hormone signaling. The highest RNA value was hsa-let-7d

5p, but no significant TDM-related pathway was identified. The last miRNA analyzed was hsa miR-140-5p, with 87 associated genes, corresponding to 28 significant genes in major malignancies.

In terms of results, the panel consisted of about 30 biomarkers obtained from the study of two population groups on TDM clusters, aligned with the literature through two original articles published in international journals. Among these biomarkers, it is essential to cite those that expressed the most significant plasma variations in depressed patients, including hsa-miR-874-3p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-532-3p, hsa-mir-532-5p, hsa-mir-339-5p and hsa-mir-18b-5p.

In the first study, we obtained a set of miRNAs, mainly represented by hsa-miR-874-3p, hsa-let-7d-5p and hsa-miR-93-3p, which show a significant increase in plasma levels in patients with MDD in the study group. These findings emphasize the potential of hsa-miR-874-3p, hsa-let-7d-5p and hsa-miR-93-3p as veritable plasma biomarkers for TDM, suggesting their pivotal role in the pathophysiology of this disorder.

The results of the study emphasize the need for standardization of protocols for the incorporation of these miRNAs into clinical practice, revealing their potential utility in both the diagnosis and therapeutic follow-up of patients with MDD. Such standardization could pave the way for more precise and personalized approaches to TDM management, ultimately improving patient outcomes.

However, the promising nature of these biomarkers also requires further research. Future studies should focus on validating the clinical applicability of these miRNAs in different clinical populations and settings. In addition, detailed evaluations are needed to explore the potential of these biomarkers in personalizing treatment strategies, ensuring that therapeutic interventions can be tailored to the unique biological profiles of each patient.

In the second study, we detected multiple significant variations in miRNA expression profiles among TDM patients. Specifically, we identified 15 miRNAs with notable variations, several of which exhibited substantial changes in RF and elevated plasma levels in TDM patients. These findings highlight the potential of these miRNAs as promising diagnostic biomarkers for TDM.

The most representative miRNAs in the study were hsa-miR-532-5p, hsa-miR-532-3p and hsa-miR-339-5p, listed in descending order.

The highly variable nature of these miRNAs led me to the idea of creating a ranking of these miRNAs, which would highlight their functional importance.

Of course this ranking is not an entity that belongs to the theory of fontless forms, but the display of them in this order was done based on the FC values that I obtained by quantifying miRNAs and statistical analysis.

Certainly, when starting this study, there was the question:

"Are there miRNAs that can help me differentiate between patients and controls?" The answer to this question could not have been answered without the use of ROC analysis, which helped me identify some surprisingly useful biomarkers for clinicians in this field and beyond.

I consider it at least important to mention them: hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-532-5p and hsa-miR-339-5p. The indicated biomarkers showed an AUC above 0.8, indicating an excellent ability to discriminate between MDD patients and healthy subjects.

hsa-miR-29c-3p is one of the biomarkers with the highest AUC values (0.83), which facilitates its role as a biomarker, even acquiring the first places in the list of miRNAs studied, in terms of its discriminatory performance between patients and controls.

Although these results provide valuable insight into the molecular underpinnings of TDM, it is imperative to conduct further research to validate these findings in larger independent cohorts and to elucidate the precise functional roles of these miRNAs in the pathophysiology of TDM.

The present study represents only a "screenshot" in the evolutionary process of the diagnosis of this psychiatric disorder, standing as a brief landmark on the chronological axis of multiple studies with reference to miRNAs and depression. The place of this work in the literature and its clinical utility will be decided by the test of time. Certainly, molecular research in major depressive disorder continues and will be marked by a series of large and valuable studies.

In conclusion, depression is a complex interplay of biological, psychological and environmental factors, being like a "ballet" of neurotransmitter perturbations, genetic predispositions and lived experiences.

Specifically, my contribution to this vast, complex and intensely debated topic is to identify two sets of miRNAs, which expressed statistically significant variations in the TDM group compared to the control group and which aspire to the role of plasma biomarkers for depressed patients.

The most relevant miRNAs belonging to these sets are: hsa-miR 874-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR 532-3p and hsa-miR-339-5p. The importance of the listed miRNAs is given by the statistical significance that we obtained for these miRNAs, more specifically by the most representative p-values and FR.

Thus, these findings highlight their potential as genuine plasma biomarkers for TDM, suggesting their pivotal role in the pathophysiology of this disorder.

LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS

1. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Edward Paul Şeclăman, Virgil Enătescu, Ionuţ Flaviu Faur, Laura Andreea Ghenciu, Paul Tuţac, Paul Paşca, and Laura Octavia Grigoriţă. 2024. "Evaluating the Connection between MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs for the Establishment of the Major Depressive Disorder Diagnosis" *Biomedicines* 12, no. 3: 516.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12030516>
2. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Cristian Daniel Alin, Ionuţ Flaviu Faur, Georgeta Cristiana Bujor, Edward Paul Şeclăman, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Dănilă, Ecaterina Dăescu, Rami Hajjar, Laura Andreea Ghenciu, and et al. 2024. "Identification of Specific Plasma miRNAs as Potential Biomarkers for Major Depressive Disorder" *Biomedicines* 12, no. 10: 2165.
IF: 3,9
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12102165>
3. Prodan-Bărbulescu, Cătălin, Laura Andreea Ghenciu, Edward Şeclăman, Georgeta Cristiana Bujor, Virgil Enătescu, Alexandra-Ioana Danila, Ecaterina Dăescu, Luminioara Maria Rosu, Ionuţ Flaviu Faur, Paul Tuţac, and et al. 2024. "Exploring miRNA Biomarkers in Major Depressive Disorder: A Molecular Medicine Perspective" *Current Issues in Molecular Biology* 46, no. 10: 10846-10853.
IF: 2,8
<https://doi.org/10.3390/cimb46100644>