

**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Olívia Borghi Nascimento

**Expressão dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-
miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de seus genes
alvos *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* na síndrome de
Down**

São José do Rio Preto
2020

Olívia Borghi Nascimento

Expressão dos microRNAs hsa-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de seus genes alvos *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* na síndrome de Down

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto

2020

Nascimento, Olívia Borghi

Expressão dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de seus genes alvos *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* na síndrome de Down/Olívia Borghi Nascimento

São José do Rio Preto, 2020.

p.71.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertolo

1. Síndrome de Down; 2. Expressão gênica; 3. microRNAs.

Olívia Borghi Nascimento

Expressão dos microRNAs hsa-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de seus genes alvos *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* na síndrome de Down

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

2º Examinador: Profa. Dra. Mariangela Torreglosa Ruiz Cintra

3º Examinador: Profa. Dra. Fabiana de Campos Gomes

Suplentes: Profa. Dra. Joice Matos Biselli e Profa. Dra. Ana Lívya Galbiatti Dias



São José do Rio Preto, 26/11/2020.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTO	ii
EPÍGRAFE.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	46

DEDICATÓRIA

A meus pais, Edson e Margarete,

Dedico esta dissertação com todo meu amor e gratidão a meus pais por todo apoio e incentivo em minha trajetória, por abdicarem de seus sonhos por meus estudos, sem vocês eu nada seria, espero recompensá-los. Amo vocês.

À minha irmã, Laura,

Com todo amor, pela amizade, companheirismo e principalmente companhia nos momentos de escrita em casa. Amo você.

Aos amigos queridos,

Pela amizade e companheirismo, por estarem presentes nos momentos de alegria, dificuldades, e trabalho durante este período.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Edson e Margarete,

Agradeço pelo incentivo e muita ajuda em todos os momentos, sem medirem esforços para que esta etapa fosse concretizada.

À Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino,

Pela oportunidade de realizar o mestrado, pela confiança, competência, dedicação e por contribuir com minha formação.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo,

Pela oportunidade, pelo exemplo profissional e por todas as contribuições.

Ao Marlon Fraga Mattos,

Por toda contribuição, dedicação e paciência de ensinar em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do grupo de pesquisa em síndrome de Down: Daniel Ramos de Oliveira Santos, Fabiana Campos e Joice Matos Biselli.

Pela contribuição deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes,

Pela contribuição e auxílio nos momentos de dúvida e análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Joice Matos Biselli,

Pela contribuição e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Caroline Isak e Lennon Caires,

Pela amizade, companheirismo e contribuição nos diversos momentos desta etapa.

A todos os amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM,

Pela amizade, pelos momentos de trabalho e diversão que passamos juntos neste período, levarei para sempre em meu coração.

A todos os pacientes e seus familiares,

Pela disponibilidade em participar deste estudo, sem os quais ele não poderia ter sido realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP,

Pela oportunidade e dedicação na manutenção e fortalecimento do curso de pós-graduação da Instituição.

Ao ambulatório do Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto,

Por disponibilizar a coleta de material dos participantes do estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Pela bolsa de Mestrado e auxílio financeiro do projeto de pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho, meus agradecimentos.

“Uma coisa que aprendi sobre sonhos, é que eles se realizam”. CJ

Walker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da biogênese do microRNA.....	7
Figura 2. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-378a-3p, no teste Anderson-Darling.....	20
Figura 3. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-942-5p, no teste Anderson-Darling.....	21
Figura 4. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-668-3p, no teste Anderson-Darling.....	21
Figura 5. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene <i>CCR7</i> , no teste Anderson-Darling.	22
Figura 6. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene <i>IKBKB</i> , no teste Anderson-Darling.....	22
Figura 7. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene <i>PLA2G2D</i> , no teste Anderson-Darling.....	23
Figura 8. Expressão relativa (RQ) dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p em indivíduos com síndrome de Down em relação ao grupo controle.	24
Figura 9. Expressão relativa (RQ) dos genes <i>CCR7</i> , <i>IKBKB</i> e <i>PLA2G2D</i> em indivíduos com síndrome de Down em relação ao grupo controle.	25

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Comparação de dados referentes à idade e sexo dos grupos caso (indivíduos com síndrome de Down) e controle (indivíduos sem a síndrome)..... 18

Tabela 2. Número de genes-alvo resultante da busca na base de dados DIANA-microT-CDS (v 5.0) para os miRNAs de interesse.....19

Tabela 3. Associação entre os miRNAs e os genes resultante da busca na base de dados DIANA-microT-CDS (v 5.0) com threshold de 0,80..... 19

Quadro 1. Sondas Taqman para expressão do microRNAs..... 14

Quadro 2. Sondas Taqman para expressão dos genes.....15

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
APC	Célula apresentadora de antígeno
<i>BCL2</i>	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
<i>BDKRB1</i>	<i>Bradykinin Receptor B1</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CD	Célula dendrítica
<i>Ct</i>	<i>Cycle Threshold</i>
<i>CCL3</i>	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 3</i>
<i>CCR2</i>	<i>Chemokine Receptor 2</i>
<i>CCR5</i>	<i>Chemokine Receptor 2</i>
<i>CCR7</i>	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i>
<i>CCL19</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19</i>
<i>CCL21</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
<i>CD19</i>	<i>Cluster of Differentiation 19</i>
<i>CD28</i>	<i>Chemokine Receptor 28</i>
<i>CD40</i>	<i>Cluster of Differentiation 40</i>
<i>CD46</i>	<i>Cluster of Differentiation 46</i>
<i>CD80</i>	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
<i>CD40LG</i>	<i>Cluster of Differentiation 40 Ligand</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CoQ10	Coenzima Q10
DA	Doença de Alzheimer
DI	Deficiência Intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DNAc	DNA complementar
<i>EDN1</i>	<i>Endothelin 1</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
HSA	<i>Homo sapiens</i>
HSA 21	<i>Homo sapiens</i> cromossomo 21
<i>ICAM1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<i>IKBKB</i>	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta</i>
IL1	Interleucina 1
IL2	Interleucina 2
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL7	Interleucina 7
IL8	Interleucina 8
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IL13	Interleucina 13
IL17	Interleucina 17
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon – Gama
IGA	Imunoglobulina A
IGM	Imunoglobulina M
IGG	Imunoglobulina G
<i>LTA4H</i>	<i>Leukotriene A4 Hydrolase</i>

mL	Mililitro
miRNA	MicroRNA
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MPP	Metaloproteinases da matriz
<i>NOS2</i>	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PLA2G2D</i>	<i>Phospholipase A2 Group IID</i>
<i>PPARGC1B</i> <i>beta</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
<i>Real-Time PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RQ	Quantificação relativa
RT	Transcriptase reversa
SD	Síndrome de Down
<i>Taqman Assay ID</i>	<i>Taqman Assay Identification</i>
<i>Th1</i>	<i>T helper cell 1</i>
<i>Th2</i>	<i>T helper cell 2</i>
<i>Th17</i>	<i>T helper cell 17</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta

RESUMO

Introdução: A síndrome de Down (SD), causada pela trissomia do cromossomo 21, apresenta ocorrência de aproximadamente um a cada 800 nascidos vivos. Diversas manifestações clínicas são observadas nos indivíduos com a síndrome, dentre elas, alterações no sistema imunológico. O sistema imunológico deficiente na SD pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções, uma das principais causas de hospitalização e morte de indivíduos com a síndrome. A trissomia 21 pode causar mudanças globais na expressão gênica, incluindo aquelas não localizadas no cromossomo 21, que regulam os processos imunológicos/inflamatórios e outros mecanismos fisiológicos. **Objetivo:** Validar, em um grupo maior de indivíduos com SD, a expressão relativa de miRNAs e genes, envolvidos em vias inflamatórias/imunológicas, que apresentaram expressão alterada em seis crianças com SD em nossos estudos anteriores e que também mostraram associação por predição *in silico*. **Material e Métodos:** A predição *in silico* dos genes alvos dos miRNA foi realizada utilizando o banco de dados online DIANA-MicroT-CDS v.5.0 considerando como valor de corte (*threshold*) o escore 0,8. Para confirmar a expressão diferencial dos genes alvo de miRNA preditos pela análise *in silico*, amostras de RNA foram obtidas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de 67 crianças com SD (grupo caso) e 60 crianças sem a síndrome (grupo controle). A comparação da idade entre os grupos foi realizada pelos testes *Anderson Darling* e *Man-Whitney* no programa *GraphPadPrism*.

A expressão dos miRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* foram analisadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq), usando ensaios Taqman no sistema StepOnePlus Real-Time PCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela aplicação do teste Anderson Darling e a análise estatística foi realizada usando o teste *Onesample T test*, adotando valor de $\alpha=0,05$, no software *GraphPad Prism versão 8.0*. **Resultados:** A predição *in silico* identificou a existência de possível interação entre três miRNAs e três genes diferencialmente expressos em estudos anteriores na SD. Dois dos microRNAs avaliados (hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e controle. Indivíduos com SD apresentaram expressão aumentada do miRNA hsa-miR-378a-3p e expressão diminuída dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*. **Conclusão:** Crianças com SD apresentam, em relação às crianças sem a síndrome, expressão reduzida dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* e expressão aumenta do miRNA hsa-miR-378a-3p, não localizados no cromossomo 21, podendo contribuir para deficiência de processos imunológicos/inflamatório na SD.

Palavras -Chave: Síndrome de Down; Expressão gênica; microRNAs.

ABSTRACT

Introduction: Down syndrome (DS), caused by trisomy of chromosome 21, has an occurrence of approximately one in 800 live births. Several clinical manifestations are observed in individuals with the syndrome, including changes in the immune system. The immune system impaired in Down syndrome can contribute to the increase in susceptibility to infections; one of the main causes of hospitalization and death of individuals with DS. Trisomy 21 can cause global changes in gene expression, including those not located on chromosome 21, which regulate immune / inflammatory processes and other physiological mechanisms. **Objective:** To validate, in a larger group of individuals with DS, the relative expression of miRNAs and genes, involved in inflammatory / immunological pathways, which showed altered expression in six children with DS in our previous studies and who also showed association by in silico prediction. **Material and Methods:** The in silico prediction of the miRNA target genes was performed using the online database DIANA-MicroT-CDS v.5.0 considering the score 0.8 as cutoff value (threshold). To confirm the differential expression of the target miRNA genes predicted by in-silico analysis, RNA samples were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 67 children with DS (case group) and 60 children without the syndrome (control group). The age comparison between the groups was performed using Anderson Darling and Man-Whitney test in the Graph PadPrism version 8.0 program. The expression of the hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p miRNAs and the *CCR7*, *IKBKB* and *PLA2G2D* genes were analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), using Taqman assays in the StepOnePlus Real-Time PCR system. The gene expression data were normalized by the application of the Anderson Darling test, and statistical analysis was performed using the Onesample T test, adopting a value of $\alpha = 0.05$, in the GraphPad Prism software version 8.0. **Results:** In silico prediction has identified the existence of a possible interaction between three miRNAs and three genes differentially expressed in previous studies in DS. Two of the microRNAs evaluated (hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p) did not show statistically significant difference between the case and control groups. Individuals with DS showed increased expression of the hsa-miR-378a-3p miRNA and decreased expression of the *CCR7*, *IKBKB* and *PLA2G2D* genes.

Conclusion: Children with DS have, in relation to children without the syndrome, reduced expression of the *CCR7*, *IKBKB* and *PLA2G2D* genes and increased expression of the hsa-miR-378a-3p miRNA, not located on chromosome 21, which may contribute to disability of immunological / inflammatory processes in DS.

Keywords: Down syndrome; Gene expression; microRNAs.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é a anomalia cromossômica mais comum e a causa mais frequente de deficiência intelectual (1,2), com ocorrência de aproximadamente um em cada 800 nascidos vivos (3). Foi descrita pelo médico britânico John Langdon Down, no ano de 1866, como um transtorno mental e, posteriormente, sua etiologia foi associada à presença da trissomia do cromossomo 21 por Lejeune, em 1959 (2,4).

A maioria dos casos de SD (95%) ocorrem em decorrência de erro de divisão celular (não-disjunção cromossômica) que resulta na cópia extra total ou parcial do cromossomo 21 (5). Em menor frequência ocorrem translocação robertsoniana (3% a 4% dos casos), na qual parte do cromossomo 21 justapõe-se a outro cromossomo acrocêntrico e, mosaïcismo (1-2% dos casos) quando há presença de células trissômicas e dissômicas para o cromossomo 21 no mesmo indivíduo (6).

A ocorrência de sinais dismórficos e clínicos varia entre os indivíduos com SD (3,7), com exceção da deficiência intelectual que está presente em todos os acometidos (1). Outras alterações do desenvolvimento neurológico incluem a diminuição da coordenação motora, consciência social limitada, aumento da incidência de desordem do espectro do autismo e manifestação precoce da doença de Alzheimer, com início aos 35-40 anos de idade (3,8,9).

As malformações congênitas, em especial as cardiopatias, afetam aproximadamente 50% dos indivíduos com SD (10). Anormalidades hematológicas como a mielopoiese anormal transitória; uma forma de pré-leucemia mielóide, ocorre em até 10% dos neonatos com a síndrome (3,11) e, um risco aumentado de leucemias linfoblásticas também é observado nas crianças com trissomia do cromossomo 21 (12). Por outro lado, os tumores sólidos apresentam baixa incidência na SD, exceto para câncer de testículo (13). Uma das hipóteses para a proteção de tumores sólidos na SD é a presença adicional de material genético do cromossomo 21 supranumerário, tais como, genes supressores de tumor ou regiões/genes que possuem interações com genes localizados em outros cromossomos, modificando funções e processos biológicos em vários tecidos (12).

Os transtornos autoimunes, tais como, distúrbios da tireóide (incluindo hipotireoidismo e doença de Hashimoto), doença celíaca, diabetes tipo I e artrite são mais frequentes na SD em comparação com a população geral (14–16). Estudos também mostram que pessoas com SD apresentam risco aumentado de infecções (12), em

especial as que afetam o trato respiratório, que são responsáveis por interações recorrentes na infância (17–19).

É possível que o desenvolvimento aumentado de infecções, autoimunidade e malignidades hematológicas na SD estejam associadas à deficiência intrínseca da resposta imunológica observada nos indivíduos com a síndrome (12,20). Tem sido descrito, há mais de dez anos, que indivíduos com SD podem apresentar involução acelerada, maturação anormal e função diminuída do timo que resultam em anormalidades de diferenciação, maturação e ativação de subclasses de células T (21,22). Estudos recentes têm reforçado estes achados demonstrando diminuição das subpopulações periféricas de linfócitos T *naive* e de memória (23), reguladores (Treg) e citotóxicos, bem como alterações morfológicas do timo (24). A quantidade de linfócitos B na circulação periférica pode apresentar-se normal ou levemente diminuída, porém é observada redução no número de células B maduras e de memória (23,25). Além disso, crianças com SD respondem mal à imunização primária, produzindo significativamente menos células B de memória e anticorpos em comparação a seus irmãos sem a síndrome (25–27). Na SD a maturação de IgA e IgM também é prejudicada e os níveis séricos de IgM são mais baixos enquanto de IgA e IgG apresentam-se mais altos (28).

Outro aspecto que contribui com resposta imune deficiente na SD é a alteração nas concentrações séricas ou plasmáticas de interleucinas (IL), tais como, IL-1 β , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10 e de outros mediadores inflamatórios, como interferon gama (INF γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e metaloproteinases da matriz (MMP-1, MMP-3, MMP-9) (29–31).

1.1. Expressão gênica e alterações imunológicas na SD

As manifestações clínicas observadas na SD podem ser explicadas pelo resultado direto da expressão dos genes trissômicos localizados no cromossomo 21 que, segundo a base de dados GENCODE (www.genencodegenes), totalizam 233 genes codificadores de proteínas, com importante função celular. Adicionalmente, alterações transcricionais de genes localizados em outros cromossomos, em resposta à expressão dos genes presentes em triplicata, também podem contribuir com as disfunções clínicas observadas na SD (2,32).

Considerando o desequilíbrio regulatório de expressão gênica na SD, em consequência da trissomia do cromossomo 21, é possível que a imunodeficiência intrínseca, observada nos indivíduos com a síndrome, possa ser resultante da expressão diferencial de genes dissômicos, envolvidos em processos imunológicos, localizados em outros cromossomos (32–34).

Estudos de expressão gênica realizado pelo nosso grupo de pesquisa em células mononucleadas do sangue periférico (PMBC) de crianças com SD, utilizando *array* de baixa densidade (*Taq Man low density array, Applied Biosystems*), demonstraram expressão reduzida de 21 genes (*BCL2, CCL3, CCR7, CD19, CD28, CD40, CD40LG, CD80, EDN1, IKBKB, IL6, NOS2, SKI, LTA4H, BDKRB1, ADRB2, CD40LG, ITGAM, TNFRSF1B, ITGB* e *TBXAS1*) e expressão elevada de outros 16 genes (*BCL2L1, CCR2, CCR5, IL10PLA2G2D, CACNA1D, ALOX12, VCAM1, ICAM1, PLCD1, ADRB1, HTR3A, PDE4C, CASP1, PLA2G5* e *PLCB4*) que participam de vias imunológicas/inflamatórias, todos localizados em cromossomos dissômicos (35,36).

Até o momento, apenas nosso grupo de pesquisa mostrou expressão diferencial, em indivíduos com SD, para os genes *CCR7, IKBKB* e *PLA2G2D* (35,36), que são avaliados também pelo presente estudo. O gene *CCR7* (receptor de quimiocinas 7), localizado no cromossomo 17q21.2, codifica um receptor de membrana acoplado à proteína G expresso na superfície celular de linfócitos T, B e células dendríticas ativadas que é essencial para controle e tolerância do sistema imune (37). Este gene e seus ligantes *CCL19* (ligante 19 de quimiocinas C) e *CCL21* (ligante 21 de quimiocinas C) são responsáveis por promover o direcionamento de linfócitos T e das células apresentadoras de antígenos (APCs) para áreas dos tecidos linfóides onde ocorre a apresentação de antígeno pelas APCs, com subsequente diferenciação dos linfócitos *naive* em outras subclasses de linfócitos (38–40). *CCR7* também é essencial para a migração de células dendríticas da periferia para os linfonodos após a captura de antígenos (41). Após o reconhecimento do antígeno, a expressão de *CCR7* é diminuída nas células T ativadas, para estas migrarem dos linfonodos para a área infectada (42).

A expressão de *CCR7* também é necessária para a diferenciação e maturação dos timócitos e, camundongos *knockout* para o gene *CCR7* (*CCR7^{-/-}*) apresentam números reduzidos deste tipo celular (43,44). Além disso, camundongos deficientes em *CCR7* apresentam linfonodos desprovidos de células T (45,46)(45,47), microarquitetura de órgãos linfóides alterada, com linfonodos linfopênicos, deficiência em células dendríticas e células MHC (moléculas do complexo principal de histocompatibilidade)

de classe II e, áreas medulares do timo menores que de camundongos controles (40,48). Como consequência dos múltiplos defeitos no posicionamento dos órgãos linfoides, os camundongos deficientes em *CCR7* apresentam indução tardia de respostas imunes adaptativas, prejuízo na tolerância central e periférica e função defeituosa de células T reguladoras (40,49,50).

O gene *IKBKB* (*inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*), localizado no cromossomo 8p11.21, codifica uma proteína que atua diretamente na via de ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (51). Em resposta a estímulos, os receptores de membrana celular sinalizam a fosforilação da proteína I κ B pelo complexo I κ B quinase (*IKBKB*), conseqüentemente, I κ B sofre ubiquitinação e degradação no proteossoma (52,53). Com a degradação da proteína I κ B, o dímero NF- κ B é ativado e se dirige ao núcleo, promovendo a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, apoptose e inflamação (54). Portanto, NF- κ B tem papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual, regulação da sobrevivência celular e ativação da resposta imune inata e adaptativa (55) e, alterações em sua regulação podem levar ao desenvolvimento de várias doenças imunológicas (54).

A via de sinalização hipotalâmica de NF- κ B, por exemplo, está envolvida na resposta inflamatória e contribui para a patogênese da obesidade ao induzir resistência à insulina e leptina por meio da inflamação das células hipotalâmicas (56,57). Sabe-se também que a resistência hipotalâmica a esses hormônios está associada à desregulação do apetite, aumento da fome e inflamação neuronal, aspectos que são comumente observados na SD (56). O gene *PLA2G2D* (*phospholipase A2 group II*), localizado no cromossomo 1p36.12, codifica a proteína PLA2G2D que é um membro da família fosfolipase A2 (58). Os membros da família de fosfolipase A2 hidrolisam a ligação sn-2 de éster de ácido graxos de glicerofosfolípidos para produzir lisofosfolípidos e ácidos graxos livres (58). Além de suas funções bem estabelecidas na digestão de fosfolípidos, essas enzimas também participam na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidos celulares para a biossíntese de eicosanóides, especialmente, durante a inflamação (59).

A expressão do gene *PLA2G2D* é abundante em células dendríticas e macrófagos no tecido linfóide, sugerindo seu papel regulatório na imunidade adquirida, pois participa da resolução da resposta imune Th1, controlando os níveis de mediadores lipídicos, como o ácido docosa-hexaenóico e seus metabólitos (60,61). Recentemente,

Sato et al. (2020) mostraram que *PLA2G2D* é preferencialmente expresso em macrófagos do tipo M2 (62).

Em camundongos *knockout* para o gene *PLA2G2D* (*PLA2G2D*^{-/-}), psoríase e dermatite de contato foram exacerbadas em função da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e do tipo Th1/Th17 em células dendríticas ou linfonodos. Estas afecções foram amenizadas com o aumento da expressão deste gene em camundongos transgênicos (58).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que *PLA2G2D* atua na via de ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), dependente da via *Rat Sarcoma* (Ras) (63), que atua como estimuladores e/ou inibidores moleculares de redes de sinalização intracelular, controlando vários processos biológicos, incluindo proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular (64).

1.2. MicroRNAs na síndrome de Down

Cerca de 30-90% dos genes humanos são regulados por microRNAs (miRNAs) (65), pequenas moléculas de RNAs não-codificantes, com um comprimento médio de 21-22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica pós-transcricional (66) e várias vias celulares e moleculares (67).

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação. Os transcritos primários de miRNA (pri-miRNAs) são gerados pela RNA polimerase II, uma enzima que transcreve os genes de miRNA e que também é responsável pela transcrição de genes codificadores de proteínas (68,69). Os pri-miRNA formam estruturas em grampo (*stem-loop*) que são processadas, ainda no núcleo, por um complexo constituído pela enzima Drosha, uma nuclease do tipo RNase III, e pela proteína DGCR8 (70,71). A estrutura resultante deste processamento, designada miRNA precursor (pré-miRNA), contém cerca de 65 nucleotídeos em forma de grampo, e, então, é transportado para o citoplasma por meio da proteína Exportin 5 (XPO5) (69,72,73).

No citoplasma, os pre-miRNAs são processados pela enzima Dicer, que remove a alça na estrutura *stem-loop*, gerando um miRNA maduro de fita dupla, com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (74). O miRNA maduro associa-se a

proteína argonauta (AGO) que separa a fita dupla formando o “complexo de silenciamento induzido por miRNA” (RISC), somente com uma das fitas de RNA (75,76). Esse complexo tem a capacidade de reconhecer sequências complementar na região 3' não traduzida (UTR 3') do RNAm alvo, resultando na não tradução deste RNAm por bloqueio dos sítios de ligação de complexos essenciais para o seguimento da tradução, sem degradação do RNAm, ou pela degradação desse RNAm impedindo a tradução (75–77) (Figura 1).

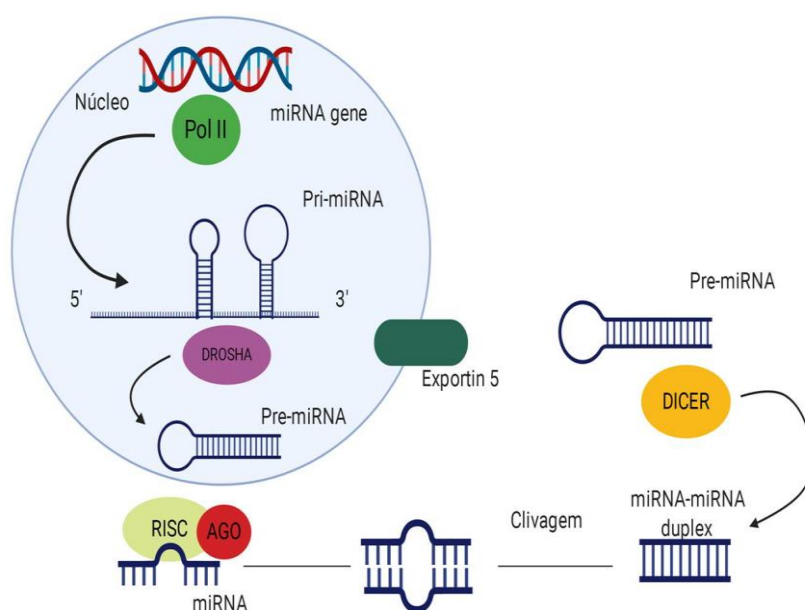


Figura 1. Ilustração da biogênese do microRNA.

A base de dados online miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>), apresenta aproximadamente 30 miRNAs do cromossomo 21 catalogados na espécie *Homo sapiens*. No entanto, apenas cinco destes miRNAs (miR-let-7c, miR-99a, miR-125b, miR-155 e miR-802) foram identificados com a proporção dos níveis de transcrição esperada, ou seja, expressão de 1,5 vezes, devido à trissomia do cromossomo 21 na SD (78).

Os miRNAs do cromossomo 21 têm sido investigados em vários tecidos de indivíduos com SD, na tentativa de correlacionar a expressão dessas moléculas com o fenótipo da síndrome (79–83). Em relação ao sistema imunológico, os miRNAs miR-99a, miR-125b e miR-155, codificados pelo cromossomo 21, foram associados ao controle regulatório de NF- κ B e a outros genes reguladores anti-inflamatórios (84) em

estudos com indivíduos com doença de Alzheimer e SD (83). Expressão alterada do miR-125b e miR-155 também foi observada em células B isoladas dos tecidos linfóides e sangue periférico de pacientes com SD (85). Farroni et al. (2018) mostraram expressão aumentada destes miRNAs nas células B de indivíduos com SD, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e sugeriram a participação de miR-125b e miR-155 na resposta prejudicada de células B na SD (85).

Entretanto, a expressão alterada de miRNAs na SD não está restrita ao cromossomo 21. Estudos mostram expressão alterada de miRNAs transcritos por outros cromossomos, que não o 21, em placenta de feto com SD, em fluido amniótico e amostras de sangue do cordão umbilical de bebês com SD e no cérebro de camundongos modelo para síndrome (82,86–88). Estudos que utilizam análise de bioinformática também mostram predição de associação entre miRNAs, localizados em outros cromossomos, e a patogênese da SD (89,90).

Estudo anterior (dados ainda não publicados), do nosso grupo de pesquisa, avaliou a expressão de 754 miRNAs por array de baixa densidade (TaqMan Array Human MicroRNA) em crianças com SD e identificou seis miRNAs, não localizados no cromossomo 21, com expressão diferencial em PMBC de crianças com SD em relação ao controle. Desses, dois apresentaram expressão reduzida (hsa-miR-452-5p e hsa-miR-668-3p) e quatro apresentaram expressão aumentada (hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR-942 e hsa-miR-424-3p).

Pelo nosso conhecimento, apenas nosso grupo de pesquisa mostrou expressão diferencial em indivíduos com SD para os miRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p, propósito do presente estudo. O hsa-miR-378a-3p foi identificado em humanos pela primeira vez em 2004 (originalmente denominado miR-422b) (91). Este microRNA é membro da família miR-378a que possui duas cadeias maduras, miR-378a-3p e miR-378a-5p, que se originam a partir do primeiro íntron do gene receptor *PPARGC1B* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta*) (92).

A participação do miR-378a-3p na apoptose foi demonstrada por GUO et al. (2019) em glioblastoma. Os autores mostraram que a indução aumentada de miR-378a-3p promoveu apoptose e diminuiu a proliferação, migração e invasão tumoral e sugerem a utilização deste miRNA como um potencial alvo terapêutico (93). Por outro lado, mais recentemente, a expressão de miR-378a-3p foi associada à inibição de alguns

supressores de tumorais, o que contribui para proliferação celular (94), e à resposta ao tratamento em diversos tipos de câncer (95).

Em relação à resposta imunológica, alguns estudos demonstram que o miR-378a-3p ativa citotoxicidade de células natural killer, estimulando a secreção de granzima B, uma serina protease sintetizada especificamente em linfócitos T citotóxicos que é liberada após a ativação de linfócitos resultante de estímulo exógeno pelas células NK (96–99). Outros estudos relatam que miR-378a-3p é diferencialmente expresso em linfócitos T e B (100), e atua na diferenciação de macrófagos (101).

O miR-942-5p, localizado no cromossomo 1p13.1, está envolvido em diversos processos e vias celulares, incluindo vias inflamatórias/imunológicas. Estudo de Yan et al. (2016) mostra que miR-942-5p regula a ativação da via de sinalização NF- κ B, pois regula a expressão de seu gene alvo *IKB α* , gene responsável por inibir a via NF- κ B (102).

Também foi demonstrado que o miR-942 (cadeia não especificada) participa da regulação da apoptose, uma vez que a expressão de miR-942 é necessária para manter um fenótipo de resistência a apoptose em células de câncer (103). Outra via de regulação do miR-942 atua é a via Wnt / β -catenina. Ge et al. (2015) demonstraram, em carcinoma espinocelular de esôfago, que a regulação positiva pelo miR-942, inibe reguladores negativos da via Wnt / β -catenina (104). A inibição desta via de sinalização pelo miR-942 também foi relatada em câncer colorretal (105).

Recentemente, Luo et al. (2020) estudando o papel regulatório *in vitro* de miR-942-5p na fisiopatologia das lesões renais agudas, mostraram que a expressão de miR-942-5p é reduzida nas células de lesões renais tratadas com lipopolissacarídeos, e que a regulação positiva de miR-942-5p pode inibir inflamação e apoptose destas células utilizando como alvo *FOXO3* (*forkhead box O3*), um dos principais reguladores transcricionais da atividade celular da família *FOX* (106).

O miR-668-3p, localizado no cromossomo 14q32.3, também participa da regulação da resposta imunológica/inflamatória. Luo et al. (2017) demonstraram em experimentos *in vitro*, utilizando linhagem celular de câncer de mama, que o aumento da expressão de miR-668 inibe o gene *IKB α* , e ativa a de sinalização NF- κ B (107). Em modelo de ratos com isquemia, o aumento da expressão de miR-668-3p suprimiu a expressão de citocinas inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo, como TNF- α , IL-1 e IL-6. Além disso, aumentou a viabilidade celular por meio da via de sinalização SDF-1/CXCR4 (*stromalcell-derivedfactor 1/C-X-C chemokine receptor type 4*) (108).

Estes autores demonstraram *in vitro* que miR-668-3p se liga à região 3'UTR do gene *SDF-1*, inibindo sua expressão na resposta inflamatória e em estado de estresse oxidativo (108). O papel da via de sinalização SDF-1/CXCR4 na imunidade também tem sido demonstrada em outro estudo; uma vez que esta via recruta células progenitoras endoteliais, da medula óssea até o local de inflamação (109).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Validar, em um grupo maior de indivíduos com SD, a expressão relativa de miRNAs e genes, envolvidos em vias inflamatórias/imunológicas, que apresentaram expressão alterada em seis crianças com SD em nossos estudos anteriores e que também mostraram associação por predição *in silico* na base de dados DIANA-microT-CDS (v 5.0).

1.3.2 Objetivos Específicos

a) Analisar por bioinformática (predição *in silico*) uma possível associação entre miRNAs e genes diferencialmente expressos, por *array* de baixa densidade, em crianças com SD em estudos anteriores e selecionar os miRNAs e genes alvos que apresentaram escore de associação igual ou acima de 0,80 para investigar o padrão de expressão;

b) Avaliar a expressão relativa dos miRNAs hsa-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de seus genes alvos *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*, respectivamente, em crianças com SD (grupo caso) e em crianças sem SD (grupo controle), ambos clinicamente saudáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP), Estado de São Paulo, número CAAE: 88278218.4.0000.5415. O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) informado por escrito foi obtido dos pais ou responsáveis legais de todos os participantes do estudo.

O estudo foi composto por 67 crianças com SD, provenientes do Ambulatório de Genética do Hospital de Base (HB) vinculado à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e por 60 crianças sem a síndrome, provenientes do Ambulatório de Pediatria do Hospital de Base (HB).

O critério de inclusão específico para o grupo caso foi a presença de trissomia livre, confirmada por exame de cariótipo e para o grupo controle ausência de trissomia e doenças associadas à SD, tais como doença autoimune. O critério de exclusão para ambos os grupos foi presença de infecções crônicas (bronquite, asma, e pneumonias recorrentes) e presença de sinais clínicos sugestivos de infecção aguda, incluindo sintomas de resfriado, tosse, febre, uso de antibióticos e vacina até dez dias antes da data de coleta de sangue.

2.2. Análise de bioinformática (predição *in silico*)

Foi realizada uma busca de seis miRNAs (hsa-miR-942-5p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR-452-5p, hsa-miR-668-3p, hsa-miR-378a-3p e hsa-miR-424-3p, diferencialmente expressos em seis indivíduos com SD, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), para identificar possíveis genes alvos destes miRNAs.

Foi avaliado se dentre os genes alvos, obtidos na busca *online* para cada microRNA, estavam presentes genes diferencialmente expressos em seis indivíduos com SD, de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (35,36). Considerando que os microRNAs são classicamente conhecidos pela regulação negativa da tradução protéica quando há uma interação direta com o gene alvo foram, então, selecionados

apenas os genes alvos da busca *online* que apresentaram anteriormente expressão relativa inversa à expressão do microRNA dos estudos anteriores (35,36).

A busca de associação *in silico* foi realizada na base de dados online MicroT-CDS – v5.0 (diana.imis.athena-innovation.gr), de acordo com a versão 18 do miRBase (www.mirbase.org/), totalmente compatível com a nova nomenclatura de miRNAs. Essa base de dados reconhece, por predição e/ou por estudos que validaram a interação entre miRNAs e genes, os sítios alvos de miRNAs localizados tanto na região não codificante 3' (UTR 3') quanto na região codificante dos genes-alvo.

Para busca de genes alvo, a análise foi realizada independentemente para elementos de reconhecimento de miRNA localizados em sequências codificantes de proteínas e em UTR 3', gerando uma pontuação (*score*) independente para cada região avaliada. Essas duas pontuações foram, então, combinadas linearmente em uma pontuação final para a interação miRNA:gene (110). Pontuações mais altas resultam em número menor de genes-alvo preditos, o que sugere um menor número de alvos falso-positivos. Assim, foi utilizado como valor de corte (*threshold*) o *score* com valor igual ou superior a 0,80.

2.3. Análise Molecular

2.3.1. Extração de RNA

As células mononucleares de sangue periférico (PMBC) foram separadas do sangue total transferindo 2 mL de sangue periférico para tubos de 15 mL estéreis já contendo 2 mL de Ficoll Paque TM Plus (GE Healthcare). O RNAm foi extraído por meio de Trizol Reagent (Ambion), segundo instruções do fabricante. Todas as amostras foram submetidas à leitura da concentração e avaliação da pureza no NanoDrop ND-1000 UV-Vis. A quantificação do RNA foi determinada pela absorbância do comprimento de onda de 260 nm e o valor da concentração foi obtido em ng/ μ L.

2.3.2. Quantificação dos miRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p, por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq)

A síntese de DNA complementar (DNAc) para análise dos microRNAs foi realizada para as amostras do grupo caso (SD) e grupo controle (sem SD) utilizando

MicroRNA Reverse Transcription Kit (TaqMan™). Para tanto, em uma reação de 10ul foram utilizados 1ug de RNA total, desoxinucleotídeo trifosfatados (dNTP) mix 1X, RT primers 1X (específico para cada microRNA e que acompanha a sonda de expressão), tampão 1X e 1ul de Multiscribe Reverse Transcriptase (AppliedBiosystems®). Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min.

A análise de expressão dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p, foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq). A PCRq foi realizada em triplicata em placas de 96 poços no equipamento StepOne Plus (AppliedBiosystems), com estágio de pré amplificação com as temperaturas de 50°C por dois minutos e 90°C por 10 minutos e, posteriormente, com estágios de 40 ciclos e temperaturas de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, com a utilização de sondas TaqMan MGB (Minor groove binder) ligadas ao fluoróforo FAM da AppliedBiosystems (Quadro 1). Os microRNAs RNU48 e U6 snRNAs foram utilizados como microRNAs de referência.

Quadro 1. Sondas Taqman para expressão do microRNAs.

MicroRNAs	Código do Produto
hsa-miR-378a-3p	TaqMan® Assay ID 001314
hsa-miR-942-5p	TaqMan® Assay ID 002187
hsa-miR-668-3p	TaqMan® Assay ID 001992
RNU48	TaqMan® 001006
U6 snRNA	TaqMan® 001973

2.3.3 Quantificação do RNAm dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*, por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq)

A partir das amostras de RNA dos indivíduos com SD (grupo caso) e dos indivíduos sem SD (grupo controle) foi sintetizado o DNA complementar (DNAc) utilizando-se o kit High Capacity DNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems®). Para tanto, em uma reação de 10ul foram utilizados 1ug de RNA total, desoxinucleotídeo trifosfatados (dNTP) mix 1X, RT random primers 1X, tampão 1X e 1 ul de Multiscribe Reverse Transcriptase. Em termociclador, as reações foram

submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min. Para a análise de expressão dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* foram utilizadas sondas TaqMan MGB (Minorgroovebinder) ligadas ao fluoróforo FAM da AppliedBiosystems® (Quadro 2).

Os genes *GAPDH* e *RPLPO* foram utilizados como genes de referência. As reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq) foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços no equipamento StepOne Plus (AppliedBiosystems®), com estágio de pré amplificação com as temperaturas de 50°C por dois minutos e 90°C por 10 minutos e, posteriormente com estágios de 40 ciclos e temperaturas de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Quadro 2. Sondas Taqman para expressão dos genes.

Genes	Código do Produto
<i>CCR7</i>	TaqMan® Assay ID. Hs04398702_m1
<i>IKBKB</i>	TaqMan® Assay ID. Hs01559469_m1
<i>PLA2G2D</i>	TaqMan® Assay ID Hs00173860_m1
<i>GAPDH</i>	TaqMan® 4331182
<i>RPLPO</i>	TaqMan®4331182

2.4 Análise estatística

A distribuição de idade e sexo entre os grupos caso e controle foram avaliados pelo teste de normalidade *Anderson Darling*. A comparação da idade entre os grupos foi realizada pelos testes *Andreson Darling* e *Man-Whitney* no programa *GraphPadPrism* versão 8.0, respectivamente. Valores inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

Os dados resultantes da análise dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e de expressão dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* entre os grupos foram analisados utilizando-se o método de Ct comparativo.

Os dados foram filtrados e o valor de Ct igual a 37 foi utilizado como corte para indicar a detecção da expressão gênica, uma vez que, avaliando o histograma dos valores de expressão, observou-se uma distribuição normal dos dados de Ct até este valor. Assim, marcadores com Ct < 37 foram considerados expressos, enquanto aqueles com Ct ≥ 37 foram considerados não inclusos no estudo.

Os dados de expressão gênica foram normalizados pela aplicação do teste de normalidade *Anderson Darling* no programa de análise *GraphPad Prism* versão 8.0. A

distribuição normal dos dados foi obtida a partir dos valores médios de cada grupo (caso e controle) separadamente e os valores de Ct não pertencentes a 80% da massa central da curva foram considerados como não representativos do grupo (*outliers*) e removidos da análise.

Após cálculo da média aritmética dos valores de Ct das réplicas técnicas para genes e microRNAs alvos e de referência para cada amostra, os dados foram exportados para uma planilha do Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft) e submetidos ao cálculo da quantificação relativa (RQ) pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o grupo controle como calibrador. Portanto, os dados de RQ do grupo caso são apresentados em relação ao grupo controle, cujo RQ é igual a 1, por definição (111).

A comparação dos valores de RQ entre os grupos caso e controle foram realizadas utilizando-se *One sample T test*, adotando valor de $\alpha=0,05$, no software *Graph Pad Prism versão 8.0*.

Para corrigir a ocorrência de falsos positivos foi aplicada correção para múltiplos testes Benjamini-Hochberg False Discovery Rate.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos grupos

O grupo caso composto por 67 crianças com SD (31 do sexo masculino e 36 do sexo feminino) não apresentou distribuição normal para a idade (mediana de idade de ± 2 anos). O grupo controle, composto por 60 crianças sem a síndrome (42 do sexo masculino e 18 do sexo feminino) apresentou distribuição normal para a idade (média de idade de ± 8 anos). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade, valor de $P < 0,0001$ (tabela 1).

Tabela 1. Comparação de dados referentes à idade e sexo dos grupos caso (indivíduos com SD) e controle (indivíduos sem a síndrome).

	Idade		Sexo	
	Média \pm DP	Feminino n (%)	Masculino n (%)	
Caso	2,4 \pm 2	31 (46,2)	36 (53,7)	
Controle	8,1 \pm 8	42 (70)	18 (30)	

3.2 Análise de bioinformática (Predição *in silico*)

A busca na base de dados no DIANA-microT-CDS (v 5.0) apresentou um número total de genes alvos para cada um dos seis miRNAs (hsa-miR-942-5p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR452-5p, hsa-miR-668-3p, hsa-miR-378a-3p e hsa-miR-424-3p) (Tabela 2).

Tabela 2. Número de genes-alvo resultante da busca na base de dados DIANA-microT-CDS (v 5.0) para os miRNAs de interesse.

miRNA	Acesso miRBase	Número de genes alvos
hsa-miR-942-5p	MIMAT0004985	1306
hsa-miR-130b-5p	MIMAT0004680	476
hsa-miR-452-5p	MIMAT0001635	437
hsa-miR-668-3p	MIMAT0003881	260
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	235
hsa-miR-424-3p	MIMAT0004749	110

A análise de bioinformática (predição *in silico*) identificou a existência de possível interação entre três miRNAs e três genes, diferencialmente expressos em nossos estudos anteriores na SD, considerando o *score* igual ou acima de 0,8 (Tabela 3).

Tabela 3. Associação entre os miRNAs e os genes resultante da busca na base de dados DIANA-microT-CDS (v 5.0) com *threshold* igual ou acima de 0,80.

MiRNAs (Expressão)	Genes (Expressão)	Score
hsa-miR-378a-3p (↑)	CCR7 (↓)	0,83
hsa-miR-942-5p (↑)	IKBKB (↓)	0,97
hsa-miR-668-3p (↓)	PLA2G2D (↑)	0,80

(↓): expressão reduzida; (↑): expressão aumentada.

3.3 Testes de Normalidade

O teste de normalidade, realizado individualmente para cada grupo, mostrou distribuição normal nos grupos caso e controle de expressão dos microRNAs hsa-miR-378a-3p (valor de P grupo caso e controle: 0,179 e 0,114, respectivamente), hsa-miR-942-5p (valor de P grupo caso e controle: 0,189 e 0,506, respectivamente) e hsa-miR-668-3p (valor de P grupo caso e controle: 0,176 e 0,164, respectivamente). Os quantis de distribuição observados nos grupos amostrais para hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p estão apresentados nas Figuras 2, 3, e 4.

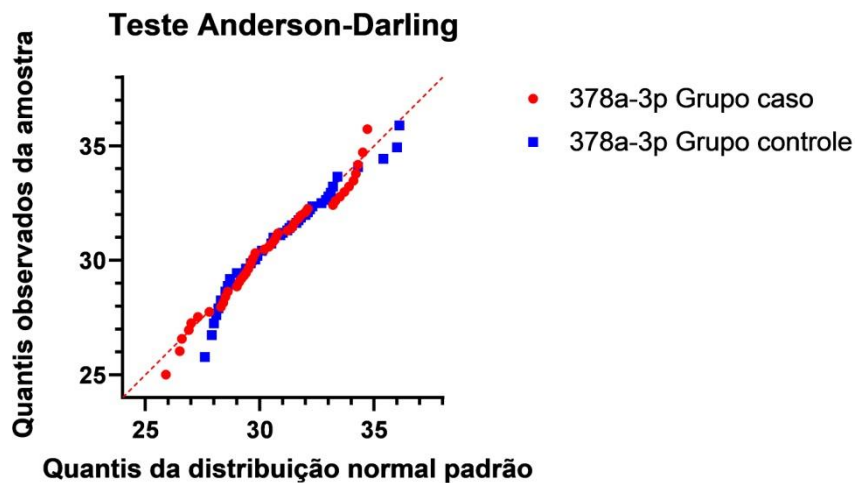


Figura 2. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-378a-3p, no teste Anderson-Darling.

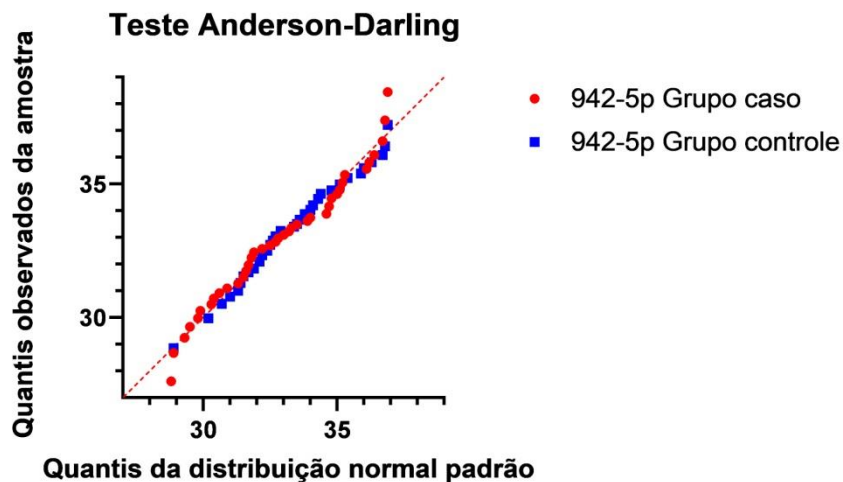


Figura 3. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-942-5p, no teste Anderson-Darling.

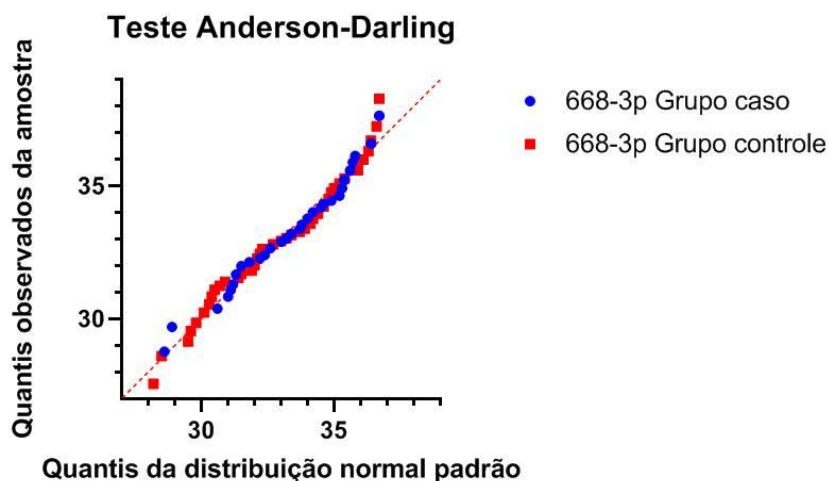


Figura 4. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para hsa-miR-668-3p, no teste Anderson-Darling.

Em relação à distribuição amostral da expressão do gene *CCR7*, o grupo caso apresentou distribuição normal entre as amostras, com valor de $P=0,112$. Entretanto, o grupo controle não passou no teste de normalidade, apresentando valor de $P=0,013$. Os grupos caso e controle apresentaram distribuição normal com valores de $P=0,123$ e $0,168$, respectivamente, para a expressão do gene *IKBKB*. Para a expressão do gene *PLA2G2D*, os grupos caso e controle não apresentaram distribuição normal com valores de $P=0,0003$ e $<0,0001$, respectivamente. As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os quantis de distribuição observados nos grupos amostrais em relação à expressão dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*.

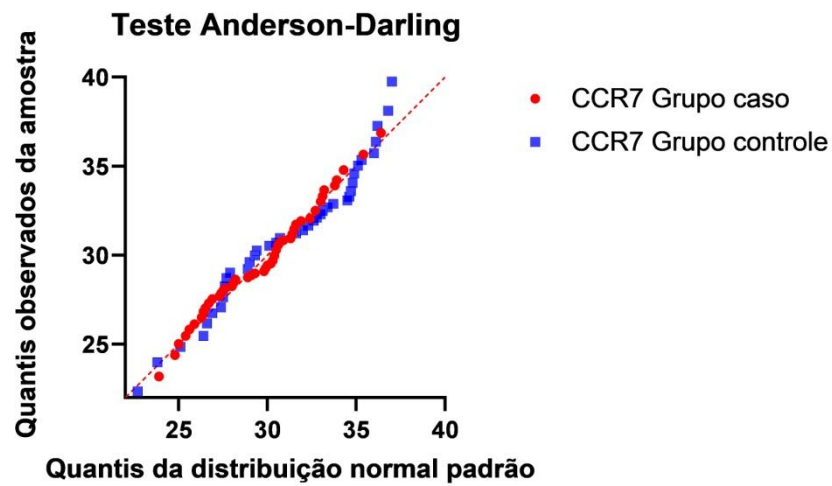


Figura 5. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene *CCR7*, no teste Anderson-Darling.

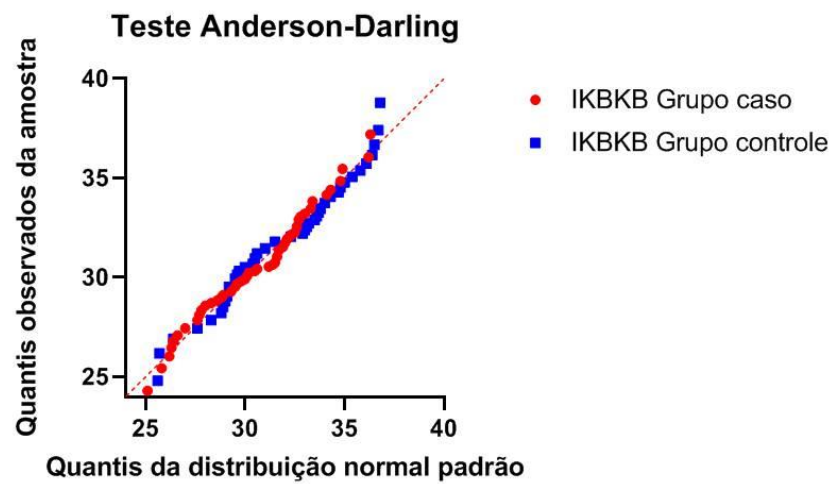


Figura 6. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene *IKBKB*, no teste Anderson-Darling.

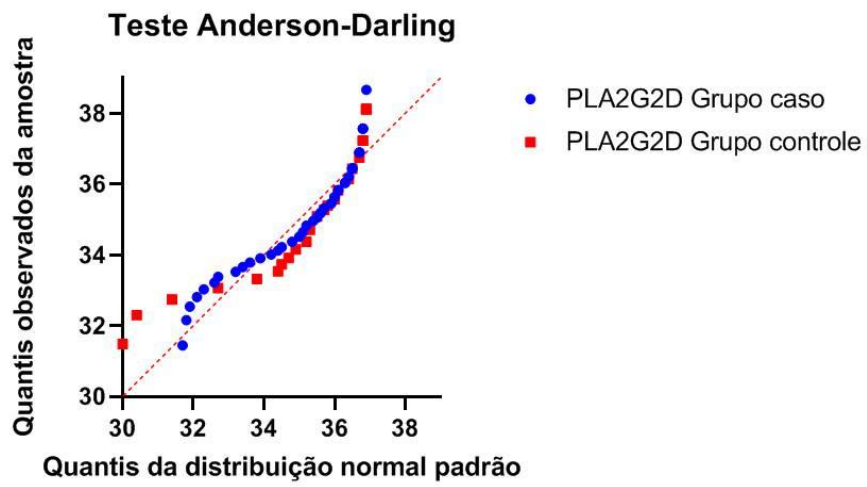


Figura 7. Quantis de distribuição de normalidade observados nos grupos caso e controle para o gene *PLA2G2D*, no teste Anderson-Darling.

3.4 Expressão dos miRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p

A análise de expressão relativa mostrou que indivíduos com SD apresentaram expressão aumentada do microRNA hsa-miR-378a-3p (média de RQ: 1,799) em comparação aos indivíduos sem a síndrome (valor de $P=0,0110$). Os microRNAs hsa-miR-942-5p (média de RQ: 1,168) e hsa-miR-668-3p (média de RQ: 1,220) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso (indivíduos com SD) e o grupo controle (sem a síndrome), com valores de $P=0,2500$ e $0,5068$, respectivamente. A Figura 8 apresenta os valores da expressão relativa dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p do grupo caso(SD) em relação ao grupo controle (sem SD).

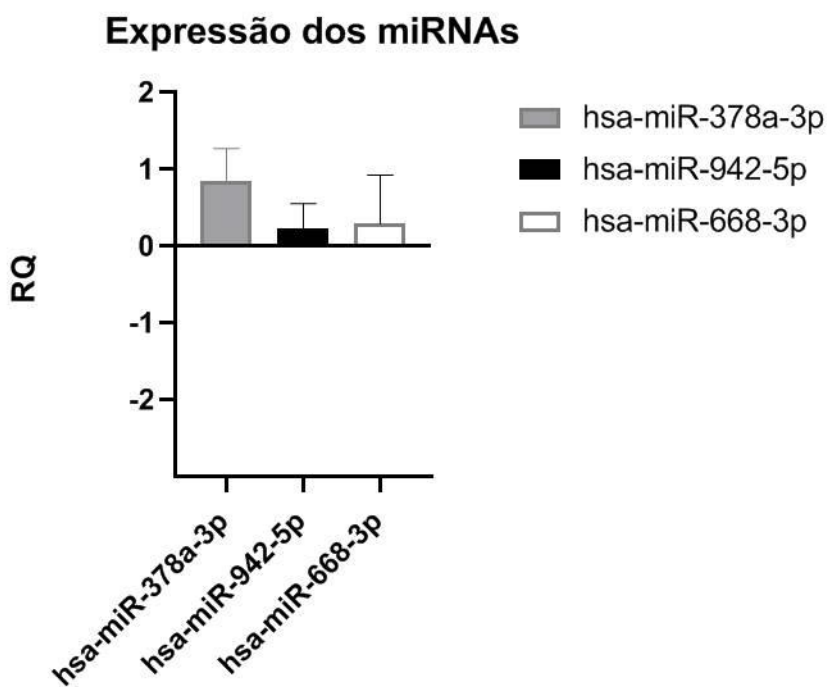


Figura 8. Expressão relativa (RQ) dos microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p em indivíduos com síndrome de Down em relação ao grupo controle.

3.5 Expressão dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*

A análise da expressão relativa mostrou que indivíduos com SD apresentaram expressão reduzida, em comparação aos indivíduos sem a síndrome, dos genes *CCR7* (média de RQ=0,5076; valor de $p<0,0001$), *IKBKB* (média de RQ=0,4781; valor de $p<0,0001$) e *PLA2G2D* (média de RQ=0,4728; valor de $p<0,0210$). A Figura 9 apresenta os valores da expressão relativa dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* do grupo caso (SD) em relação ao grupo controle (sem SD).

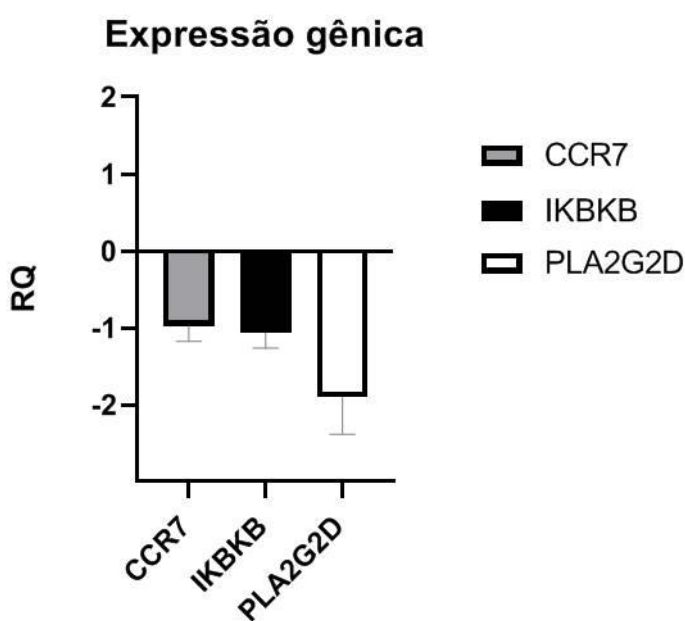


Figura 9. Expressão relativa (RQ) dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* em indivíduos com síndrome de Down em relação ao grupo controle.

4. DISCUSSÃO

4. Discussão

No presente estudo, a análise de bioinformática identificou a existência de uma possível interação entre os microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p e hsa-miR-668-3p e os genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D*, respectivamente. Pelo nosso conhecimento, não existem estudos na literatura, até o momento, que investigam uma possível associação entre estes microRNAs e genes na SD. Além disso, apenas os estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram padrão de expressão relativa diferencial destes microRNAs (dados ainda não publicados) e genes (35,36) em PCMCs de seis crianças com SD, utilizando um método de seleção genômica ampla (*genome wide selection* – GWS) de baixa densidade contendo sondas para 184 genes, envolvidos em processos imunológicos/inflamatórios, e 754 microRNAs.

Considerando a importância de validação dos resultados de expressão destes nossos estudos anteriores, foi realizada no presente estudo, em um grupo maior de indivíduos, a análise de expressão relativa por PCRq para validar a expressão diferencial dos três microRNAs e genes nos indivíduos com SD em comparação com indivíduos sem a síndrome. Na análise por PCRq o microRNA hsa-miR-378a-3p e os genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* mostraram diferença significativa entre os grupos caso e controle.

O microRNA hsa-miR-378a-3p mostrou-se, no presente estudo, duas vezes mais expresso em PBMCs trissômicas para o cromossomo 21 em relação às células controles sem trissomia. Expressão diferencial deste microRNA foi observada em diversos tecidos normais, euplóides e em células neoplásicas (93,99,112–114) e tem sido associada a alterações do sistema imunológico (101). Em PBMCs de pacientes com síndrome de Sjogén, uma doença reumática autoimune, o miR-378a-3p foi diferencialmente expresso em linfócitos T e diferencialmente expresso em linfócitos B (100). Considerando que indivíduos com SD apresentam níveis reduzido de linfócitos T e B na circulação (115,116), é possível que a expressão aumentada do hsa-miR-378a-3p possa estar associada a estas alterações, porém mais estudos são necessários para se confirmar esta associação.

Recentemente, Chen et al. (2019) identificaram que o miR-378a-3p modula a fagocitose e diferenciação de macrófagos, na aterosclerose, por meio do eixo de sinalização CD47-SIRP α , que é um potencial ativador de células imunes inatas (101). Estes autores sugerem que a expressão aumentada de miR-378a-3p em macrófagos pode

diminuir significativamente o nível de SIRP α (proteína reguladora de sinal alfa), uma molécula sinalizadora essencial que modula as respostas inflamatórias em macrófagos, e, conseqüentemente, regular os níveis de secreção das citocinas TNF- α e IL-6 (101). Outro estudo, realizado por Ruckerl et al. (2012) mostra que miR-378a-3p (expressão aumentada) participa da ativação de macrófago anti-inflamatório (M2) e é regulado pela expressão de interleucina 4 (IL-4) (117). Jiang et al. (2014) relataram que a expressão aumentada de miR-378a (cadeia não especificada) é regulada positivamente após estimulação com citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (118). Entretanto, aumento da expressão de miR-378a-3p foi observado em pacientes com colite ulcerativa que estavam recebendo terapia anti-TNF α . Além disso, em um condição inflamatória, TNF α diminuiu os níveis de miR-378a-3p em linhagem celular (119).

Vale ressaltar que TNF α e IL-6 são consideradas uma das principais citocinas reguladoras das respostas imunológicas e inflamatórias (120) e que indivíduos com SD apresentam níveis significativamente aumentados destes marcadores pró-inflamatórios (IL-6 e TNF α) no soro quando comparados com indivíduos sem a síndrome (IULITA et al., 2016; ZAKI et al., 2017). No presente estudo, o critério de inclusão foi ausência de infecção, ou seja, os participantes em ambos os grupos (caso e controle) são saudáveis clinicamente, portanto, o aumento da expressão do miR-378-3p observado nos indivíduos com SD poderia corroborar com os achados de associação entre expressão elevada do miR-378-3p e aumento de citocinas pró-inflamatórias, mesmo em condições de saúde.

Diversos estudos mostram que miR-378a-3p também regula a citotoxicidade das células *natural killer* (NK), por meio da secreção de granzima B (97–99). Wang et al. foram os primeiros a identificarem que este microRNA tem como alvo o gene que codifica a granzima B e apresentava expressão reduzida em células natural killer (NK) ativadas (96). Posteriormente, Liu et al. mostraram que a supressão do miR-378a em células NK resultou na inibição da replicação do vírus da dengue *in vivo* (98). miR-378a-3p tendo como alvo 3'UTR de granzima B também foi observado na leucemia mielóide aguda (97). Recentemente, Briank et al. identificaram que a expressão aumentada de miR-378a-3p pode estar associada à perda de citotoxicidade de células NK por meio da diminuição da secreção de granzima B (99). Considerando que os indivíduos SD apresentam níveis abaixo do normal de células NK (122,123), o aumento da expressão do miR-378a-3p, conforme observado no presente estudo, poderia

prejudicar ainda mais a resposta imune por contribuir com a perda da citotoxicidade das células NK.

O gene *CCR7*, potencial alvo *in silico* do miR-378a-3p, apresentou no presente estudo, expressão reduzida de 50% em indivíduos com SD em comparação ao grupo controle, o que confirmou o resultado do nosso estudo anterior, realizado em apenas seis crianças, em que a redução da expressão foi de 60% no grupo SD (35). É possível que a diferença de expressão entre o presente estudo e o anterior possa ser decorrente do reduzido número de indivíduos avaliados anteriormente. Além disso, o método de GWS, que consiste na avaliação simultânea de marcadores genéticos dispersos em todo o genoma por meio de *arrays*, apresenta uma sensibilidade de detecção mais baixa, o que pode levar a uma sub-representação de alterações na expressão do gene, enquanto a metodologia de PCRq, utilizada para a validação dos resultados de nossos estudos anteriores, apresenta maior sensibilidade (124).

A expressão de *CCR7* é observada em diversos subtipos de linfócitos tais como linfócitos T naive, células T de memória, células T reguladoras, linfócitos B, células dendríticas e NK (125,126). Na SD a quantidade de linfócitos T (*naive* e de memória), linfócitos B e células NK apresenta-se reduzida (23,123). Além disso, os indivíduos com a síndrome apresentam funcionalidade anormal de células Treg, com prejuízo da função supressora (127). No presente estudo, é possível que a expressão diminuída do gene *CCR7*, observada nos indivíduos com SD, possa estar associada ao número reduzido das células de defesa nestes indivíduos (123) e à susceptibilidade aumentada às infecções e doenças autoimunes (115,128), entretanto, umas das limitações do presente estudo foi não investigar os níveis de leucocitários dos indivíduos.

Sabe-se, que distúrbios autoimunes são mais frequentes na SD em comparação com a população geral (14). Dentre os mais frequentes estão hipotireoidismo, diabetes tipo I e doença celíaca e artrite reumatóide (15,16). *CCR7* encontra-se diferencialmente expresso em doenças autoimunes. Em modelo experimental de esclerose múltipla, por exemplo, foi relatada expressão reduzida de *CCR7* em leucócitos mononucleares sanguíneos (129,130). Aldahlawi et al. (2016) também observaram a expressão reduzida de *CCR7*, em linfócitos T de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico ativos em comparação com pacientes com a doença inativa e controles. Além disso, estes autores observaram que a expressão reduzida de *CCR7* foi associada com o aumento de citocinas inflamatórias, IL-6 e IL-17 (131). No presente estudo não foi avaliada a

expressão de citocinas inflamatórias, entretanto, níveis aumentados de IL-6 e outras citocinas inflamatórias são relatadas na SD (29–31).

Ao contrário do observado neste estudo na SD e o que já foi relatado em algumas doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla (130,131), a expressão aumentada de *CCR7* é observada na artrite reumatóide (132) e na síndrome de Sjogren (126). Recentemente, também foi demonstrado que o nível aumentado de expressão *CCR7* contribuiu para ativação de linfócitos e produção de autoanticorpos (132).

Diante da importante função do gene *CCR7* para a eficiência do sistema imunológico, alguns autores têm sugerido que *CCR7* pode constituir um potencial alvo terapêutico para doenças autoimunes (133,134). Assim, nossos achados de expressão diferencial de *CCR7* e do miR-378a-3p na SD e da análise *in silico*, que identificou *CCR7* como gene alvo predito do miR-378a-3p, sugerem que ambos possam representar alvos promissores para tratamento de distúrbios relacionados à deficiência do sistema imunológico e/ou para estimular as respostas imunológicas deficientes nos indivíduos com SD, entretanto, estudos adicionais, incluindo a análise funcional (ensaio de transfecção) e de ligação microRNA/gene (ensaio da luciferase) são necessários para confirmar a interação entre miR-378a-3p e *CCR7*. Estes ensaios serão realizados pelo nosso grupo de pesquisa e contribuirão para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias/ imunológicas dos indivíduos com SD.

A análise da expressão do miR-942-5p não confirmou o achado significativo de expressão aumentada do nosso estudo anterior (dados não publicados), possivelmente devido à maior casuística utilizada no presente estudo, que pode resultar em maior poder estatístico. Por outro lado, a análise *in silico* do presente estudo mostrou interação entre o miR-942-5p e o gene *IKBKB*, portanto, não se pode descartar totalmente a hipótese da participação deste microRNA na regulação da expressão do gene *IKBKB* e, consequentemente, nos processos imunológicos da SD. Além disso, o nível de expressão do miR-942-5p e seu alvo *IKBKB* mostrou-se inverso, o que pode sugerir uma possível regulação negativa que necessita ser validada por ensaios funcionais e de interação *in vitro*, experimentos que ainda serão realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

No presente estudo, o gene *IKBKB* apresentou nível de expressão reduzida de 53% no grupo com SD em relação ao grupo controle, enquanto no nosso estudo anterior a expressão reduzida foi de 40% nos indivíduos com a síndrome (35). Conforme

referido anteriormente, a diferença de expressão entre os dois estudos pode ser explicada pelas diferenças da casuística ou sensibilidade metodológica.

Expressão aumentada de *IKBKB* tem sido observada em linfoma periférico de células T (51) e em macrófagos de pacientes e modelo animal durante infecção por *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas (135). Estes achados são concordantes com a função de *IKBKB* que ativa a via de sinalização NF- κ B e, conseqüentemente, desencadeia proliferação e inflamação em resposta celular (51)

Por outro lado, estudos realizados em recém-nascidos com infecções bacterianas, fúngicas e virais graves mostraram associação entre a deficiência do gene *IKBKB* e alteração no sistema imunológico. Infecções graves de início precoce, clinicamente semelhantes àquelas observadas em pacientes com imunodeficiência severa combinada, foram observadas em recém-nascidos que apresentavam mutação no gene *IKBKB* (136,137). Outro estudo associou mutação heterozigótica no gene *IKBKB* com alterações imunológicas, caracterizadas por deficiência combinada de células T, B e inflamação em uma coorte de crianças com infecções recorrentes. Além disso, os autores demonstraram, pela técnica CRISPR/CAS9 em modelos de camundongos, a ação direta de *IKBKB* na desregulação imunológica (138). Diante disso, é possível que a baixa expressão de *IKBKB*, observada nos indivíduos com SD do presente estudo, pode estar associada à deficiência imunológica da SD, caracterizada por deficiência de células T e B (12).

A análise de expressão do miR-668-3p do presente estudo não validou o resultado do nosso estudo anterior no qual os indivíduos com SD mostraram expressão significativamente diminuída deste microRNA em comparação aos indivíduos sem a síndrome (dados não publicados). Entretanto, é importante ressaltar que no presente estudo seu potencial alvo *in silico*, o gene *PLA2G2D*, mostrou expressão significativamente reduzida (1,4 vezes menos expresso) nos indivíduos com SD e inversa ao miR-668-3p, o que também pode sugerir uma possível regulação negativa, que será avaliada em ensaios *in vitro* pelo nosso grupo de pesquisa.

No nosso estudo anterior a expressão do gene *PLA2G2D* mostrou-se aumentada (12 vezes) nas crianças com SD comparada ao grupo sem a síndrome (36) e, embora isto possa refletir diferenças no número de indivíduos avaliados e na metodologia utilizada, como referido acima, é importante ressaltar que diferentemente dos outros genes avaliados neste estudo (*CCR7* e *IKBKB*), a diferença de expressão do gene

PLA2G2D ente os grupos de indivíduo SD e sem a síndrome perdeu a significância após correção de múltiplos testes no estudo anterior, o que não ocorreu no presente estudo.

Pelo nosso conhecimento, não há outros estudos que avaliam o gene *PLA2G2D* na SD, entretanto, considerando sua importância na resolução da resposta imune Th1 e inflamação por meio do controle dos níveis de mediadores lipídicos (60–62), é possível que mecanismos imune deficientes na SD possam estar associados ao controle de expressão gênica via miR-668-3p/*PLA2G2D*. No entanto, os achados do presente estudo não permitem esta conclusão.

Diante do exposto, considerando que os genes e microRNAs avaliados no presente estudo não estão localizados no cromossomo 21, nossos resultados corroboram com a hipótese de que a trissomia do cromossomo 21 pode resultar em alterações globais na expressão gênica em todo o genoma e (2) comprometer processos imunológicos/inflamatórios e outros processos fisiológicos nos indivíduos com SD.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusão

1. miRNAs e genes, diferencialmente expressos em estudos anteriores, em crianças com síndrome de Down apresentam associação *in silico*.
2. Crianças com síndrome de Down apresentam, em relação às crianças sem a síndrome, expressão reduzida dos genes *CCR7*, *IKBKB* e *PLA2G2D* e expressão aumentada do miRNA hsa-miR-378a-3p, não localizados no cromossomo 21.
3. A expressão alterada dos genes e miRNA pode contribuir para deficiência de processos imunológicos/inflamatório na SD.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

1. Grieco J, Pulsifer M, Seligsohn K, Skotko B, Schwartz A. Down syndrome: Cognitive and behavioral functioning across the lifespan. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2015;169(2):135–49.
2. Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, et al. Down syndrome. *Nat Rev Dis Prim.* 2020 Jan 1;6(1).
3. Bull MJ. Down syndrome. *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society; 2020;382: 2344–52.
4. Lejeune J, Gautier M TR. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R HebdSeancesAcad S.* 1959;248(11):1721–2.
5. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S AS. Down syndrome: an insight of the disease. *J Biomed Sci.* 2015;22(1):1–9.
6. Nixon DW. Down Syndrome, Obesity, Alzheimer’s Disease, and Cancer: A Brief Review and Hypothesis. *Brain Sci.* 2018; 8(4):53.
7. Cristina Pavarino Bertelli É, Biselli M, Bonfim D, Goloni-Bertollo M. Clinical profile of children with Down syndrome the reated in a genetics out patient service in the Outtheast Of Brazil. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;55(5):547–52.
8. Oxelgren UW, Myrelid Å, Annerén G, Ekstam B, Goransson C, Holmbom A, et al. Prevalence of autism and attention-deficit–hyperactivity disorder in Down syndrome: a population-based study. *Dev Med Child Neurol.* 2017;59(3):276–83.
9. Petersen ME, O’Bryant SE. Blood-based biomarkers for Down syndrome and Alzheimer’s disease: A systematic review. *Developmental Neurobiology.* 2019;79: 699–710.
10. Martin T, Smith A, Breatnach CR, Kent E, Shanahan I, Boyle M, et al. Infants Born with Down Syndrome: Burden of Disease in the Early Neonatal Period. *J Pediatr.* 2018;193:21–6.
11. Taub JW, Berman JN, Hitzler JK, Sorrell AD, Lacayo NJ, Mast K, et al. Improved outcomes for myeloid leukemia of Down syndrome: A report from the children’s oncology group AAML0431 trial. *Blood.* 2017;129(25):3304–13.
12. Satgé D, Seidel MG. The pattern of malignancies in down syndrome and its potential context with the immune system. *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A. 2018;9:441-9.
13. Hasle H, Friedman JM, Olsen JH, Rasmussen SA. Low risk of solid tumors in persons with Down syndrome. *Genet Med.* 2016;18(11):1151–7.
14. Guaraldi F, Rossetto Giaccherino R, Lanfranco F, Motta G, Gori D, Arvat E, et al. Endocrine Autoimmunity in Down’s Syndrome. *Front Horm Res.* 2017;48:133–46.
15. Amr NH. Thyroid disorders in subjects with down syndrome: An update. *Acta Biomed.* 2018;89(1):132–9.
16. Bermudez BEBV, de Oliveira CM, de Lima Cat MN, Magdalena NIR, Celli A. Gastrointestinal disorders in Down syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2019;179(8):1426–31.

17. Joffre C, Lesage F, Bustarret O, Hubert P OM. Children with Down syndrome: Clinical course and mortality-associated factors in a French medical paediatric intensive care unit. *J Paediatr Child Heal*. 2016;52(6).
18. Colvin KL, Yeager ME. What people with Down Syndrome can teach us about cardiopulmonary disease. *European Respiratory Review*. 2017.
19. Alsubie HS, Rosen D. The evaluation and management of respiratory disease in children with Down syndrome (DS). *Paediatr Respir Rev*. 2018;26:49–54.
20. Giménez-Barcons M, Casteràs A, Armengol M del P, Porta E, Correa PA, Marín A, et al. Autoimmune Predisposition in Down Syndrome May Result from a Partial Central Tolerance Failure due to Insufficient Intrathymic Expression of *AIRE* and Peripheral Antigens. *J Immunol*. 2014.
21. Elsayed SM EG. Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Immun Ageing*. 2009;6(2):1–5.
22. Kusters MAA, Verstegen RHJ, Gemen EFA, De Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: A review. *Clin Exp Immunol*. 2009.
23. Schoch J, Rohrer TR, Kaestner M et al. Quantitative, Phenotypical, and Functional Characterization of Cellular Immunity in Children and Adolescents With Down Syndrome. *J Infect Dis*. 2017;215(10):1619–28.
24. Marcovecchio GE, Bortolomai I, Ferrua F, Fontana E, Imberti L, Conforti E, et al. Thymic epithelium abnormalities in DiGeorge and Down syndrome patients contribute to dysregulation in T cell development. *Front Immunol*. 2019;10:1–15.
25. Verstegen RHJ, Driessen GJ, Bartol SJW, Van Noesel CJM, Boon L, Van Der Burg M, et al. Defective B-cell memory in patients with Down syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2014.
26. Carsetti R, Valentini D, Marcellini V, Scarsella M, Marasco E, Giustini F, et al. Reduced numbers of switched memory B cells with high terminal differentiation potential in Down syndrome. *Eur J Immunol*. 2015;45(3):903–14.
27. Valentini D, Marcellini V, Bianchi S, Villani A, Facchini M, Donatelli I, et al. Generation of switched memory B cells in response to vaccination in Down syndrome children and their siblings. *Vaccine*. 2015;33(48):6689–96.
28. Martínez E, Castañeda D, Jaramillo S, Iregui A, Quiñonez T, Rodríguez JA, et al. Altered immune parameters correlate with infection-related hospitalizations in children with Down syndrome. *Hum Immunol*. 2016.
29. Iulita MF, Ower A, Barone C, Pentz R, Gubert P, Romano C et al. An inflammatory and trophic disconnect biomarker profile revealed in Down syndrome plasma: Relation to cognitive decline and longitudinal evaluation. *Alzheimers Dement*. 2016;12(11):1132–40.
30. Mattos MF, Biselli-Chicote PM, Biselli JM, Da Silva Assembleia TL, Goloni-Bertollo EM, Pavarino ÉC. Interleukin 6 and 10 Serum Levels and Genetic Polymorphisms in Children with Down Syndrome. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:9.
31. Zaki ME, El-Bassyouni HT, Tosson AMS, Youness E, Hussein J. Coenzima Q10 e marcadores pró-inflamatórios em crianças com síndrome de Down: aspectos clínicos e bioquímicos. *J Pediatr*. 2017;93(1):100–4.

32. Ahlfors H, Anyanwu N, Pakanavicius E, Dinischiotu N, Lana-Elola E, Watson-Scales S, et al. Gene expression dysregulation domains are not a specific feature of Down syndrome. *Nat Commun.* 2019;10(1).
33. Gensous N, Franceschi C, Salvioli S, Garagnani P, Bacalini MG. Down syndrome, ageing and epigenetics. In: *Subcellular Biochemistry.* Springer New York; 2019:161–93.
34. Jakubiuk-Tomaszuk A, Sobaniec W, Rusak M, Poskrobko E, Nędzi A, Olchowik B, et al. Decrease of interleukin (IL)17A gene expression in leucocytes and in the amount of IL-17A protein in CD4+ T cells in children with Down Syndrome. *Pharmacol Reports.* 2015.
35. Zampieri BL, Biselli-Périco JM, De Souza JES, Burger MC, Silva WA, Goloni-Bertollo EM, et al. Altered expression of immune-related genes in children with Down syndrome. *PLoS One.* 2014;9(9).
36. Silva CRS, Biselli-Périco JM, Zampieri BL, Silva WA, De Souza JES, Bürger MC, et al. Differential Expression of Inflammation-Related Genes in Children with Down Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2016;2016.
37. Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2013.
38. Rot A, von Andrian UH. Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annu Rev Immunol.* 2004.
39. Abbas AK, Lichtman AH PS. *Imunologia Celular e Molecular.* 7th ed. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2011.
40. Wurm S, Steege A, Rom-Jurek EM, van Roeyen CR, Kurtz A, Banas B, et al. CCR7 Is Important for Mesangial Cell Physiology and Repair. *J Histochem Cytochem.* 2018;66(1):7–22.
41. Yashiro T, Takeuchi H, Nakamura S, Tanabe A, Hara M, Uchida K, et al. PU.1 plays a pivotal role in dendritic cell migration from the periphery to secondary lymphoid organs via regulating CCR7 expression. *FASEB J.* 2019;33(10):11481–91.
42. Yashiro T, Takeuchi H, Kasakura K, Nishiyama C. PU.1 regulates Ccr7 gene expression by binding to its promoter in naïve CD4+ T cells. *Open Bio.* 2020 Jun 1;10(6):1115–21.
43. Davalos-Miszlitz AC et al. Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur J Immunol.* 2007;37:613–622.
44. Kobayashi D, Endo M, Ochi H, Hojo H, Miyasaka M, Hayasaka H. Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–14.
45. Förster R et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999;23–33.
46. Förster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology.* 2008.
47. Förster R, Davalos-Miszlitz AC RA. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362–71.

48. Ueno T et al. CCR7 signals are essential for cortex– medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*. 2004;200:493–505.
49. Hintzen G et al. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol*. 2006;177.
50. Scandella E et al. Dendritic cell-independent B cell activation during acute virus infection: a role for early CCR7-driven B–T helper cell collaboration. *J Immunol*. 2007;178.
51. Alberto de Pádua Covas Lage L, Levy D, Dias Xavier F, Cândido Reis D, de Oliveira Costa R, Castro Gonçalves M, et al. Proliferative, pro-inflammatory, and angiogenesis regulator gene expression profile defines prognosis in different histopathological subtypes of nodal peripheral T-cell lymphoma. *Oncotarget* [Internet]. 2019;10(50):5136–51.
52. Bruzzese L, Fromonot J, By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Kipson N, et al. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A2A receptors. *Cell Signal* [Internet]. 2014;26(5):1060–7.
53. Jain H, Dhingra N, Narsinghani T, Sharma R. Insights into the mechanism of natural terpenoids as NF- κ B inhibitors: An overview on their anticancer potential. *Exp Oncol*. 2016;38(3):158–68.
54. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. Vol. 8, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. Wiley-Blackwell; 2016. p. 227–41.
55. Zhenyu Zhong, Atsushi Umemura, Elsa Sanchez-Lopez SL, Shabnam Shalapour, Jerry Wong, Feng He, Daniela Boassa, Guy Perkins S, Raza Ali, Matthew G. McGeough, Mark H. Ellisman⁵, Ekihiro Seki⁴, ABG, Hal M. Hoffman, Maria T. Diaz-Meco, Jorge Moscat and MK. NF- κ B Restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*. 2016;164(5):896–910.
56. Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP. Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Mol Metab*. 2017;6(4):366–73.
57. Tessier F, Fontaine-Bisson B, Lefebvre JF, El-Sohemy A, Roy-Gagnon MH. Investigating gene–gene and gene–environment interactions in the association between overnutrition and obesity-related phenotypes. *Front Genet*. 2019;10.
58. Miki Y, Kidoguchi Y, Sato M, Taketomi Y, Taya C, Muramatsu K, et al. Dual roles of group IID phospholipase A2 in inflammation and cancer. *J Biol Chem*. 2016;291(30):15588–601.
59. Murakami M. Lipoquality control by phospholipase A2 enzymes. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(9):677–702.
60. Miki, Y.; Yamamoto, K.; Taketomi, Y.; Sato, H.; Shimo, K et al. Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *J Exp Med*. 2013;210:1217–34.
61. Vijay R, Hua X, Meyerholz DK, Miki Y, Yamamoto K, Gelb M, et al. Critical role of phospholipase A2 group IID in age-related susceptibility to severe acute respiratory syndrome-CoV infection. *J Exp Med*. 2015;212(11):1851–68.
62. Sato H, Taketomi Y, Miki Y, Murase R, Yamamoto K, Murakami M. Secreted

- Phospholipase PLA2G2D Contributes to Metabolic Health by Mobilizing ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids in WAT. *Cell Rep.* 2020;31(5):107579.
63. Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, Cruz-Monserrate Z, Wang H, Ji B LC. An NF κ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1519–28.
 64. Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A2. *J Lipid Res.* 2015;56(7):1248–61.
 65. Friedländer MR, Lizano E, Houben AJS, Bezdán D, Báñez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* 2014;15(4):1–17.
 66. Ye J, Xu M, Tian X, Cai S, Zeng S. Research advances in the detection of miRNA. Vol. 9, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* Xi'an Jiaotong University; 2019. p. 217–26.
 67. Gholamin S, Mirzaei H, Razavi SM, Hassanian SM, Saadatpour L, Masoudifar A et al. GD2-targeted immunotherapy and potential value of circulating microRNAs in neuroblastoma. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):866–79.
 68. Lee Y, Kim M HJ et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051–60.
 69. Vishnoi, A., & Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *MicroRNA Profiling.* 2016;1:1–10.
 70. Han J, Lee Y, Yeom KH et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016–27.
 71. Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):177–91.
 72. Bohnsack MT, Czaplinski K GD. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;10(2):185–91.
 73. Yi R, Qin Y, Macara IG et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011–6.
 74. Bernstein E, Caudy AA HS and HG. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409:363–6.
 75. Jonas S IE. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421–33.
 76. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *Rna.* 2019;25(1):1–16.
 77. Hu W and Collier J. What comes first: Translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res.* 2012;22:1322–4.
 78. Brás A, Rodrigues AS, Gomes B RJ. Downs syndrome and microRNA. *Biomed Rep.* 2018;8(1):11–6.
 79. Kuhn DE, Nuovo GJ, Terry AV Jr, Martin MM, Malana GE, Sansom SE et al. Chromosome 21-derived mirnas provide an etiological basis for aberrant protein expression in human down syndrome brains. *J Biol Chem.* 2010;285:1529–43.
 80. Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, Silva FN, Costa Lda F, Ferreira LR,

- Furlanetto G, Chacur P, Zerbini MC C-SM. Modular transcriptional repertoire and MicroRNA target analyses characterize genomic dysregulation in the thymus of Down syndrome infants. *Oncotarget*. 2016;16(7):7497–533.
81. Asero R, Scala E, Villalta D, Pravettoni V, Arena A, Billeri L, et al. Shrimp allergy: Analysis of commercially available extracts for in vivo diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017.
 82. Karaca E, Aykut A, Ertürk B, Durmaz B, Güler A et al. Diagnostic Role of MicroRNA Expression Profile in the Prenatal Amniotic Fluid Samples of Pregnant Women with Down Syndrome. *Balk Med J*. 2018;35(2):163–6.
 83. Alexandrov PN, Percy ME, Lukiw WJ. Chromosome 21-Encoded microRNAs (mRNAs): Impact on Down's Syndrome and Trisomy-21 Linked Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr 1;38(3):769–74.
 84. Prasad KN. Oxidative stress and pro-inflammatory cytokines may act as one of the signals for regulating microRNAs expression in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2017;162:63–71.
 85. Farroni C, Marasco E, Marcellini V, Giorda E, Valentini D, Petrini S, D'Oria V, Pezzullo M, Cascioli S, Scarsella M, Ugazio AG, De Vincentiis GC, Grimsholm O CR. Dysregulated miR-155 and miR-125b Are Related to Impaired B-cell Responses in Down Syndrome. *Front Immunol*. 2018;20(9):2683.
 86. Arena A, Iyer AM, Milenkovic I, Kovacs GG, Ferrer I, Perluigi M AE. Developmental Expression and Dysregulation of miR-146a and miR-155 in Down's Syndrome and Mouse Models of Down's Syndrome and Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer*. 2017;14(12):1305–17.
 87. Lim JH, Kim DJ, Lee DE, Han JY, Chung JH, Ahn HK, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas of fetuses with Down syndrome. *Placenta*. 2015.
 88. Shi WL, Liu ZZ, Wang HD, Wu D, Zhang H, Xiao H, et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling in fetal hippocampus with Down syndrome. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):1–12.
 89. Lin H, Sui W, Li W, Tan Q CJ. Integrated microRNA and protein expression analysis reveals novel microRNA regulation of targets in fetal down syndrome. *Mol Med Rep*. 2016;14(5):4109–18.
 90. Chai M, Su L, Hau X, Zhang M, Zheng L, Bi J, et al. Identification of a thymus microRNA-mRNA regulatory network in down syndrome. *Mol Med Rep*. 2019;20(3):2063–72.
 91. K. Kasashima, Y. Nakamura and TK. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(2):403–10.
 92. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, Józkwicz A, Dulak J. The role of miR-378a in metabolism, angiogenesis, and muscle biology. *International Journal of Endocrinology*. 2015.
 93. Guo XB, Zhang XC, Chen P, Ma LM, Shen ZQ. MiR-378a-3p inhibits cellular proliferation and migration in glioblastoma multiforme by targeting tetraspanin 17. *Oncol Rep*. 2019;42(5):1957–71.
 94. Machado IF, Teodoro JS, Palmeira CM, Rolo AP. miR-378a: a new emerging

- microRNA in metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer. 2020;77:1947–58.
95. Tupone MG, D'Aguanno S, Di Martile M, Valentini E, Desideri M, Trisciuglio D, et al. microRNA-378a-5p is a novel positive regulator of melanoma progression. *Oncogenesis*. 2020;9(2).
 96. P. Wang, Y. Gu QZ et al. Identification of resting and type I IFN-activated human NK cell miRNomes reveals MicroRNA-378 and MicroRNA-30 e as negative regulators of NK cell cytotoxicity. *J Immunol*. 2012;189(1):211–21.
 97. Bhise NS, Chauhan L, Shin M, Cao X, Pounds S, Lamba V, et al. MicroRNA-mRNA pairs associated with outcome in AML: From in vitro cell-based studies to AML patients. *Front Pharmacol*. 2016;6:1–11.
 98. Liu S, Chen L, Zeng Y, Si L, Guo X, Zhou J, et al. Suppressed expression of miR-378 targeting gzmB in NK cells is required to control dengue virus infection. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(5):700–8.
 99. Briand J, Garnier D, Nadaradjane A, Clément-Colmou K, Potiron V, Supiot S, et al. Radiotherapy-induced overexpression of exosomal miRNA-378a-3p in cancer cells limits natural killer cells cytotoxicity. *Epigenomics*. 2020 Mar 1;12(5):397–408.
 100. Wang-Renault S-F, Boudaoud S, Nocturne G, Roche E, Sigrist N, Daviaud C, et al. Deregulation of microRNA expression in purified T and B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017.
 101. Chen W, Li X, Wang J, Song N, Zhu A, Jia L. miR-378a Modulates Macrophage Phagocytosis and Differentiation through Targeting CD47-SIRP α Axis in Atherosclerosis. *Scand J Immunol*. 2019;90(1):1–10.
 102. Yan, Q.; Shen, C.; Qin, J.; Li, W.; Hu, M.; Lu, H.; Qin, D.; Zhu, J.; Gao, S.J.; Lu C. HIV-1 Vpr Inhibits Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication by Inducing MicroRNA miR-942-5p and Activating NF κ B Signaling. *J Virol*. 2016;90(1):8739–53.
 103. Liu N, Zuo C, Wang X, Chen T, Yang D, Wang J ZH. miR-942 decreases TRAIL-induced apoptosis through ISG12a downregulation and is regulated by AKT. *Oncotarget*. 2014;5:4959–4971.
 104. Ge C, Wu S, Wang W, Liu Z, Zhang J, Wang Z, Li R, Zhang Z, Li Z, Dong S, Wang Y, Xue Y, Yang J, Tan Q, Wang Z SX. miR-942 promotes cancer stem cell-like traits in esophageal squamous cell carcinoma through activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Oncotarget*. 2015;6:10964–10977.
 105. Shan Z, An N, Qin J, Yang J, Sun H YW. Long non-coding RNA Linc00675 suppresses cell proliferation and metastasis in colorectal cancer via acting on miR-942 and Wnt/ β -catenin signaling. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:769–76.
 106. Luo N, Gao HM, Wang YQ, Li HJ LY. MiR-942-5p alleviates septic acute kidney injury by targeting FOXO3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(11):6237–44.
 107. Luo M, Ding L, Li Q, Yao H. miR-668 enhances the radioresistance of human breast cancer cell by targeting I κ B α . *Breast Cancer*. 2017;24(5):673–82.
 108. Gao Z, Gao Q, Lv X. MicroRNA-668-3p Protects against Oxygen-Glucose Deprivation in a Rat H9c2 Cardiomyocyte Model of Ischemia-Reperfusion Injury

- by Targeting the Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCR4 Signaling Pathway. *Med Sci Monit.* 2020;26:1–10.
109. Goldstone AB, Burnett CE, Cohen JE, Paulsen MJ, Eskandari A, Edwards BE, et al. SDF 1-alpha attenuates myocardial injury without altering the direct contribution of circulating cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2019;11(15):274–84.
 110. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I HA. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics.* 2012.
 111. Livak KJ ST. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
 112. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, Józkowicz A, Dulak J. The role of miR-378a in metabolism, angiogenesis, and muscle biology. Vol. 2015, *International Journal of Endocrinology.* Hindawi Publishing Corporation; 2015.
 113. Huang N, Wang J, Xie W, Lyu Q, Wu J, He J, et al. MiR-378a-3p enhances adipogenesis by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015.
 114. Li Y, Jiang J, Liu W, Wang H, Zhao L, Liu S, et al. MicroRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(46):E10849–58.
 115. Verstegen RHJ, Chang KJJ, Kusters MAA. Clinical implications of immune-mediated diseases in children with Down syndrome. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020;31(2):117–23.
 116. Verstegen RHJ, Driessen GJ, Bartol SJW, Van Noesel CJM, Boon L, Van Der Burg M, et al. Defective B-cell memory in patients with Down syndrome. *J Allergy Clin Immunol [Internet].* 2014;134(6):1346-1353.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.015>
 117. Rückerl D, Jenkins SJ, Laqtom NN, Gallagher IJ, Sutherland TE, Duncan S, et al. Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood.* 2012;120(11):2307–16.
 118. X. Jiang, M. Xue ZF et al. Insight into the effects of adipose tissue inflammation factors on miR-378 expression and the underlying mechanism. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(6):1778–88.
 119. Dubois-Camacho K, Diaz-Jimenez D, De la Fuente M, Quera R, Simian D, Martínez M, et al. Inhibition of miR-378a-3p by Inflammation Enhances IL-33 Levels: A Novel Mechanism of Alarmin Modulation in Ulcerative Colitis. *Front Immunol.* 2019 Nov 20;10.
 120. Aureli A, Sebastiani P, Del Beato T, Marimpietri AE, Graziani A, Sechi E, et al. Involvement of IL-6 and IL-1 receptor antagonist on intellectual disability. *Immunol Lett.* 2014;162(1):124–31.
 121. Zaki ME, El-Bassyouni HT, Tosson AM, Youness E HJ. Coenzyme Q10 and pro-inflammatory markers in children with Down syndrome: clinical and biochemical aspects. *J Pediatr.* 2017;93(1):100–4.
 122. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children

- with Down syndrome. *Int J Immunogenet.* 2010.
123. Mitwalli M, Wahba Y, Shaltout A, Gouda M. Lymphocyte subgroups and recurrent infections in children with Down syndrome - A prospective case control study. *Cent Eur J Immunol.* 2018;43(3):248–54.
 124. Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA. The limit fold change model: A practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics.* 2002;3:1–11.
 125. Legler DF, Uetz-Von Allmen E, Hauser MA. CCR7: Roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014.
 126. Liu Z, Li F, Pan A, Xue H, Jiang S, Zhu C, et al. Elevated CCL19/CCR7 Expression During the Disease Process of Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:795.
 127. Pellegrini FP, Marinoni M, Frangione V, Tedeschi A, Gandini V, Ciglia F, et al. Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol.* 2012.
 128. Huggard D, Kelly L, Ryan E, McGrane F, Lagan N, Roche E, et al. Increased systemic inflammation in children with Down syndrome. *Cytokine.* 2020;127:154938.
 129. Bielecki B, Jaczak-Pawlik I, Wolinski P, Bednarek A, Glabinski A. Central Nervous System and Peripheral Expression of CCL19, CCL21 and Their Receptor CCR7 in Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;63(5):367–76.
 130. Monaghan KL, Zheng W, Hu G, Wan ECK. Monocytes and Monocyte-Derived Antigen-Presenting Cells Have Distinct Gene Signatures in Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:1–16.
 131. Aldahlawi AM, Elshal MF, Damiaiti LA, Damanhori LH, Bahlas SM. Analysis of CD95 and CCR7 expression on circulating CD4+ lymphocytes revealed disparate immunoregulatory potentials in systemic lupus erythematosus. *Saudi J Biol Sci.* 2016;23(1):101–7.
 132. Van Raemdonck K, Umar S, Shahrara S. The pathogenic importance of CCL21 and CCR7 in rheumatoid arthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;(May):1–8.
 133. Miao J, Wang F, Wang R, Zeng J, Zheng C, Zhuang G. Pleiotrophin regulates functional heterogeneity of microglia cells in EAE animal models of multiple sclerosis by activating CCR-7/CD206 molecules and functional cytokines. *Am J Transl Res.* 2019;11(4):2013–27.
 134. Moschovakis GL, Bubke A, Friedrichsen M, Ristenpart J, Back JW, Falk CS, et al. The chemokine receptor CCR7 is a promising target for rheumatoid arthritis therapy. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(10):791–9.
 135. Chowdhury IH, Koo SJ, Gupta S, Liang LY, Bahar B, Silla L, et al. Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. *J Innate Immun.* 2017;9(2):203–16.
 136. Rubin TS, Rockman-Greenberg C, Van Caesele P, Cuvelier GDE, Kwan L, Schroeder ML. Newborn Screening for IKBKB Deficiency in Manitoba, Using

- Genetic Mutation Analysis. Vol. 38, Journal of Clinical Immunology. Springer New York LLC; 2018. p. 742–4.
137. Cuvelier GDE, Rubin TS, Junker A, Sinha R, Rosenberg AM, Wall DA, et al. Clinical presentation , immunologic features , and hematopoietic stem cell transplant outcomes for IKBKB immune deficiency. 2020.
 138. Cardinez C, Miraghazadeh B, Tanita K, Silva E, Hoshino A, Okada S, et al. Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency. 2018;215(11).

7. ANEXOS

Overexpressed hsa-miR-378a-3p in peripheral blood of children with Down syndrome affect genes and pathways immune-related in bioinformatics analysis

Olívia Borghi Nascimento¹. Marlon Fraga Mattos¹. Joice Matos Biselli¹. Eny Maria Goloni-Bertollo¹. Érika Cristina Pavarino¹.

¹*Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP*

*Corresponding author

e-mail: erika@famerp.br

Revisit submitted: Mediators of Inflammation

Abstract

OBJECTIVE. The aim of the study was to validate the expression patterns of miR-378a-, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p in individuals with Down syndrome (DS), and to identify possible biological pathways and processes affected by validated direct target genes of differentially expressed miRNAs. **METHODS:** The expression of microRNAs was profiled in PBMCs from 67 children with DS and 60 controls by RT-qPCR using TaqMan® Array Human MicroRNA Arrays. MirTarBase, TarBase v8.0 and PubMed databases were used to identify validated genes that are direct targets of microRNA. Functions and signaling pathways analyzes were performed using databases DAVID, GO, KEGG and STRING. **RESULTS:** The miRNA has-miR-378a-3p showed differential expression, statistically significant, in individuals with DS compared to the control group, was up-regulated in DS. Two of the miRNAs studied, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p, did not show differential expression in DS. Regarding to in silico analysis, was observed 29 target genes validated for hsa-miR-378a-3p. The database presented 44 biological processes and 32 metabolic pathways that can be affected by the altered expression of the hsa-miR-378a-3p microRNA. Enrichment analyzes showed that the target genes of hsa-miR-378a-3p participate in biological processes and metabolic pathways involved in the immune and inflammatory response. **CONCLUSION:** Individuals with DS have differential expression of miRNA hsa-miR-378a-3p and their target genes are involved in processes and metabolic pathways of the immune system.

Introduction

Down syndrome (DS) is the most common genetic disorder worldwide, occurring approximately one in every 800 natives (Antonarakis et al. 2020). Individuals with DS have as characteristic a wide range of phenotypes, such as facial dysmorphism, cognitive impairment, high incidence of congenital heart disease, immunodeficiency, endocrine disorders, neurological alterations as predisposition to Alzheimer's disease and others congenital abnormalities (Martin et al. 2018; Petersen and O'Bryant 2019).

Immune system deficiency is a hallmark feature in DS which may lead to increased susceptibility to bacterial and viral infections. Respiratory tract infections are the main cause of hospitalization of children with DS and represent one of causes of death of in individuals with the syndrome (Joffre et al. 2016; Alsubie and Rosen 2018). In childhood, there is also an increased risk for lymphoblastic and myeloblastic leukemias (Faten et al., 2018; Mast KJ, Taub et al., 2020; Zwaan et al., 2010). The relatively high incidence of autoimmune diseases is present in all ages (Amr 2018; Bermudez et al. 2019).

The etiological basis of immunological alterations in DS is not yet fully understood, however, gene expression studies in individuals with the syndrome have reported differential expression of genes involved in immunological processes including genes not located on chromosome 21, which could explain the immunodeficiency observed in these individuals (Ahlfors et al. 2019; B. L. Zampieri, J. M. Biselli-Perico 2014; Gensous et al. 2019; Silva et al. 2016). These studies corroborate with the theory that trisomy 21 results in global transcriptional changes throughout the genome and not just in genes located in chromosome 21 (Antonarakis et al. 2020).

In addition, differential expression of some miRNAs has been reported in some tissues of individuals with DS (Alexandrov, Percy, and Lukiw 2018; Karaca E, Aykut A, Ertürk B, Durmaz B, Güler A 2018; Shi et al. 2016) microRNAs are known to regulate some cellular and molecular pathways. Estimates claim that about 30-90% of human genes are regulated by microRNAs (Friedländer et al. 2014). MicroRNAs (miRNAs) are small molecules of non-coding RNAs, with an average length of 21-22 nucleotides, which can regulate post-transcriptional gene expression (Ye et al. 2019).

Although differential expression of some chromosome 21 miRNAs has been reported in DS (Alexandrov, Percy, and Lukiw 2018; Brás et al., 2018), the altered expression of microRNAs in DS is not restricted to chromosome 21. Several studies

have shown altered expression of microRNAs transcribed by other chromosomes (outside 21) in placenta of fetuses with DS, in amniotic fluid and blood samples from umbilical cord of babies with DS and in the brain of mice model for DS (Arena et al., 2017; Karaca et al., 2018; Lim et al. 2015; Moreira-Filho et al., 2016; Shi et al. 2016).

Previously, our group of research showed differential miRNAs expression in six children with DS, four upregulated (hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-424-3p), and two down-regulated (hsa-miR-452-5p and hsa-miR-668-3p). In addition, *in silico* analysis showed that the predicted target genes of these miRNAs may act in immune-related process (unpublished data). However, predictable targets may are not direct target of the microRNA, as was observed between miR-193a and the MCL1 and PTK2/FAK genes (Kozaki et al., 2008). Thereby, the current study, we extend our previous study and focused on the validate the expression of miR-378a-, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p, in greater number of DS individuals, and additionally, we performed *in silico* analysis to identify possible pathways and biological processes affected by validated direct target genes from miRNAs differentially expressed.

Materials and methods

Ethics Statement

The study was approved by the Research Ethics Committee of São José do Rio Preto Medical School (CEP-FAMERP), State of São Paulo, CAAE number: 88278218.4.0000.5415.

Samples and groups

The study group consisted of 67 children with DS (case group), from the Genetics Clinic of Hospital de Base (HB) of the São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP) and 60 children without DS (control group), from the Pediatric Clinic HB / FAMERP. The specific inclusion criterion for the case group was the presence of free trisomy confirmed by karyotype examination and for the control group absence of

diseases associated with DS, such as autoimmune disease. Inclusion criteria for both groups were absence of chronic infections (bronchitis, asthma, and recurrent pneumonia) and absence of clinical signs suggestive of acute infection, including symptoms of cold, cough, fever, and / or antibiotic use up to ten days prior from the date of blood collection.

RNA extraction

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated by FicollPaque Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). The samples were submitted to RNA extraction using Trizol Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions. All samples were subjected to concentration reading and purity evaluation on the NanoDrop ND-1000 UV-Vis. The quantification of genomic DNA was determined by the wavelength absorbance of 260nm and the concentration value is given in ng/ μ L.

Quantitative Real-time PCR

Complementary DNA (cDNA) samples were produced from total RNA samples using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). Expression analysis of microRNAs was performed in triplicates using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems®) were performed using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with specific probes for detection of hsa-miR-378a-3p (commercially corresponds to the microRNA rno-miR-422b), hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p according to the manufacturer's instructions. Mamm U6/ U6 snRNA and RNU48 were used as endogenous control for data normalization.

In silico functional analysis

MirTarBase, TarBase v8.0 and PubMed databases were used to identify validated genes that are direct targets of microRNA that present statistically significant differential expression in individuals with DS compared to controls. Validated target genes were those whose interaction between the gene and MicroRNA was confirmed by the luciferase assay primarily, and by quantifying the expression of the gene and/or protein. It was utilized the keywords hsa-miR-378a-3p; miR-378a-3p; MIR378A for research and all forms of keywords were used alone and together with luciferase assay or reporter assay. Only studies

published between 2012 and 2020 that used human cells to perform the validation were included in the search.

The metabolic pathways/biological processes of the selected target genes were identified using the online tools Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), using the databases Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG). Pathways/processes with p values less than 0.05 after Bonferroni correction were considered. The interactions between selected target genes and proteins were analyzed using the STRING V.11 tool (<https://string-db.org/>).

Statistical analysis of expression data

The age distributions between the groups were compared using the Anderson Darling and Mann-Whitney test, respectively, in the GraphPad Prism program version 8.0. Values below 0.05 were considered significant.

The expression analysis of the microRNAs miR-378a-3p, miR-942-5p and has-miR-668-3p between the groups were analyzed comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak KJ 2001). The data were filtered and the Ct value equal to 37 was used as a cut to indicate the detection of gene expression, since, evaluating the histogram of the expression values, a normal distribution of the Ct data up to this value was observed. Thus, markers with Ct < 37 were considered expressed, while those with Ct \geq 37 were considered not included in the study.

The gene expression data were normalized by applying the Anderson Darling normality test in the GraphPad Prism version 8.0 program. The normal distribution of the data was obtained from the average values of each group (case and control) separately and the Ct values not belonging to 80% of the central mass of the curve were considered as not representative of the group (outliers) and removed from the analysis.

After calculating the arithmetic mean of the Ct values of the technical replicates for target and reference genes and microRNAs for each sample, was performed the calculation of the relative quantification (RQ) by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using the control group as a calibrator. Therefore, the RQ data for the case group are presented in relation to the control group, whose RQ is equal to 1, by definition (Livak KJ 2001).

The comparison of the RQ values between the case and control groups were performed using One sample T test, adopting a value of $\alpha = 0.05$, in the GraphPad Prism software

version 8.0 To correct the occurrence of false positives, correction for multiple tests was applied Benjamini-Hochberg False Discovery Rate.

Results

The case group (67 children with DS) presented median age of 2.4 years, with 31 male and 36 female children. The control group (60 children without syndrome) presented mean age of 8.1 years, with 42 male and 18 female children (table 1).

Table 4. Age and sex of case and control groups.

	Age	Sex	
	Median and Mean	Male n (%)	Female n (%)
Case	2.4	31 (46.2)	36 (53.7)
Control	8.1	42 (70)	18 (30)

Expression of microRNAs

The normality test, performed individually for each group, showed normal distribution in the case and control groups for hsa-miR-378a-3p microRNAs (p-value case and control group: 0.179; 0.114), hsa-miR-942-5p (p-value case and control group: 0.189; 0.50) and hsa-miR-668-3p (p-value case and control group: 0.176; 0.164).

The analysis of relative expression showed that individuals with DS had increased expression of the microRNA hsa-miR-378a-3p (mean RQ: 1.799) compared to individuals without the syndrome, p value: 0.0110. The microRNAs hsa-miR-942-5p (mean RQ: 1,168) and hsa-miR-668-3p (mean RQ: 1,220) showed no statistically significant difference between the case group and control group (values of p: 0.2500 and 0.5068, respectively). The figure 1 shows the values of the relative expression of the microRNAs hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p of the case group (SD) in relation to the control group (without SD).

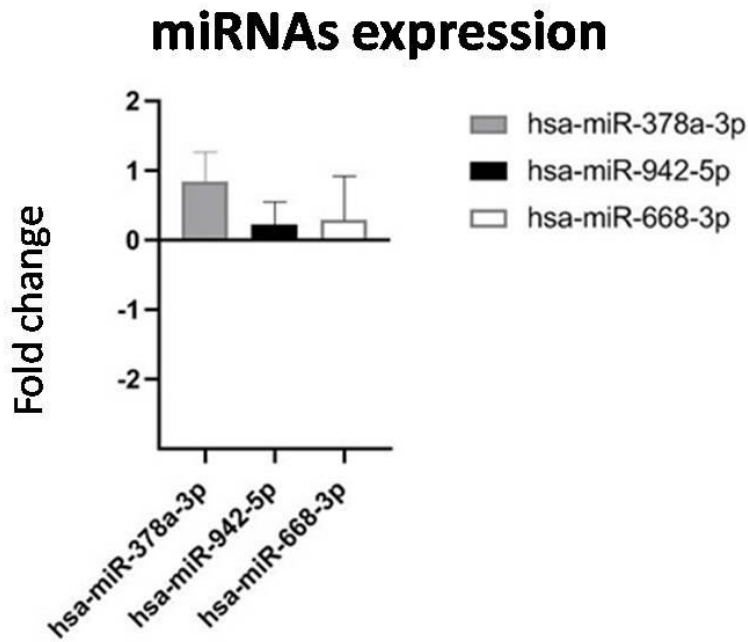


Fig 10. Relative expression (RQ) of the hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p microRNAs in individuals with Down syndrome compared to the control group.

In silico functional analysis

The in silico analysis, in the MirTarBase, TarBase v8.0 and PubMed databases, showed 29 target genes for hsa-miR-378a-3p (the only miRNA differentially expressed in this study) (Table 2). The Pubmed search identified 67 articles with the keywords used, of which only 15 were selected. The other 52 were excluded due to the lack of proof of direct interaction between the microRNA hsa-miR-378a-3p and the target genes, according to the selection criteria adopted, or because they were already cataloged as a validated MicroRNA target in the Tarbase and Mirtarbase.

Table 5. Target miR-378a-3p genes validated in the MirTarBase, TarBasev8.0 and PubMed databases.

Databases	Gene	Authors	Databases	Gene	Authors
TarBase	IGF1R	JayavarshniGanesan et.al., 2013	PubMed	CASP3	Hong et al., 2018
TarBase	MAPK1	JayavarshniGanesan et.al., 2013	PubMed	HDAC4	Weiet al., 2016
TarBase	SUFU	Daniel Y Lee et al. 2007	PubMed	IL33	Dubois-Camacho et al., 2019
TarBase	TUSC2	Daniel Y Lee et al. 2007	PubMed	SNHG7	Yu et al 2019
TarBase	GRB2	JayavarshniGanesan et.al., 2013	PubMed	DVL2	Yu et al 2019
TarBase	KSR1	JayavarshniGanesan et.al., 2013	PubMed	ATG12	Zhaoet al., 2020
MirTarBase	VEGFA	Deng H et al., 2013	PubMed	NEAT1	Zhaoet al., 2020
MirTarBase	NPNT	ShireenKahaiet al., 2009	PubMed	CPEB3	Zhang et al., 2020
MirTarBase	GALNT7	ShireenKahaiet al., 2009	PubMed	TSPAN17	Gouet al., 2019
MirTarBase	MYC	Feng et al., 2011	PubMed	PDK1	Jiaoet al., 2020
MirTarBase	TOB2	Feng et al., 2011	PubMed	TRIM55	JiayingTanet al., 2020
MirTarBase	CDK6	Deng H et al., 2013	PubMed	GOLT1A	Ikeda et al., 2015
MirTarBase	VIM	Deng Z et al., 2013	PubMed	PARVA	Velazquez-Torres et al., 2018
MirTarBase	PGR	Tomset et al., 2015	PubMed	TGFB2	Yuet al., 2016
			PubMed	GLI3	Hyunet al., 2016

The Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v 6.7 database presented 44 biological processes and 32 metabolic pathways were found that can be affected by the altered expression of the hsa-miR-378a-3p microRNA (Supplementary material). Among the biological processes are those involved in immune response stand out, e.g., T cell differentiation in thymus, cell proliferation, positive regulation of cell proliferation, negative regulation of monocyte differentiation and Natural killer cell mediated cytotoxicity (Fig 2). Enrichment analyzes also showed metabolic pathways associated with immune system such as MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, acute myeloid leukemia, FOXO signaling pathway and TGFB2 signaling pathway (Fig 3). In addition, the results of the analysis also showed that the target genes of hsa-miR-378a-3p participate in biological processes (Fig 2) and metabolic pathways (Fig3) associated with the nervous and cardiac systems. The interactions between the proteins showed a great interaction network between the genes to be regulated by the hsa-miR-378a-3p microRNA (Fig 4). Among the interactions, proteins associated with the immune system stand out (Fig 5).

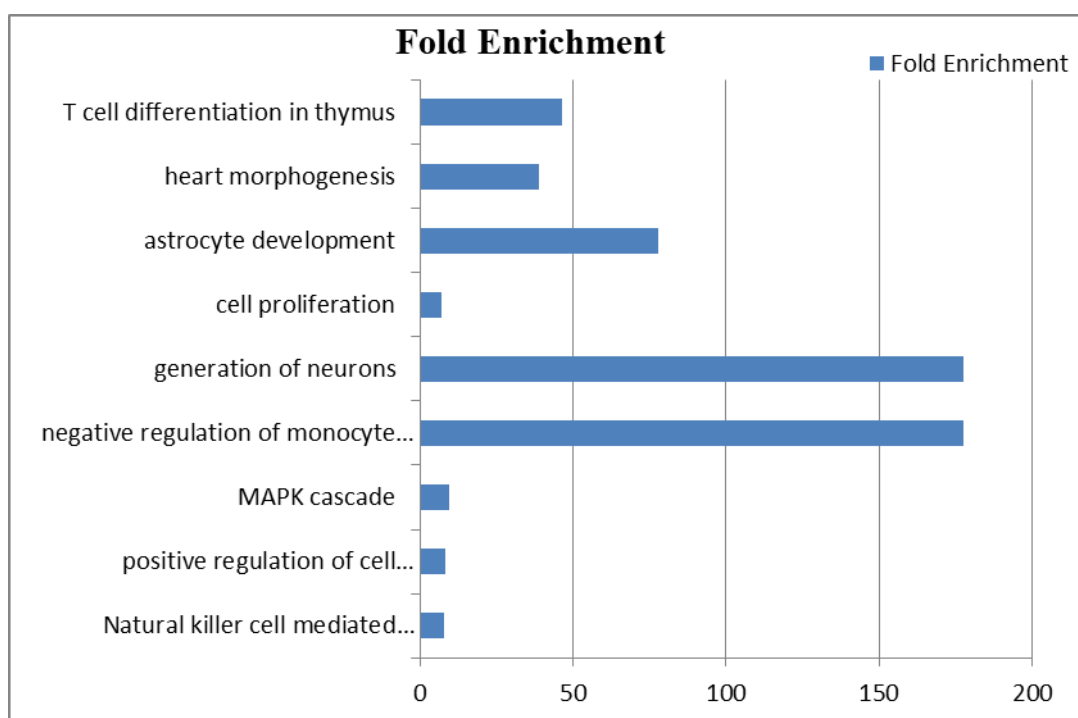


Fig 11. Biological processes in which hsa-miR-378a-3p target genes participate.

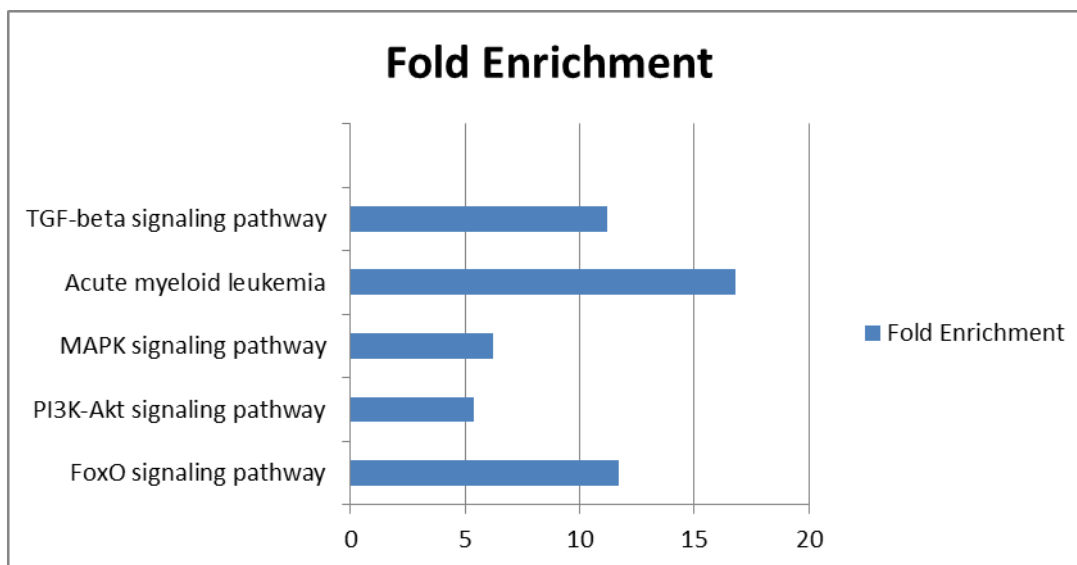


Fig 12. Metabolic pathways associated with the immune system in which the hsa-miR-378a-3p microRNA target genes participate.

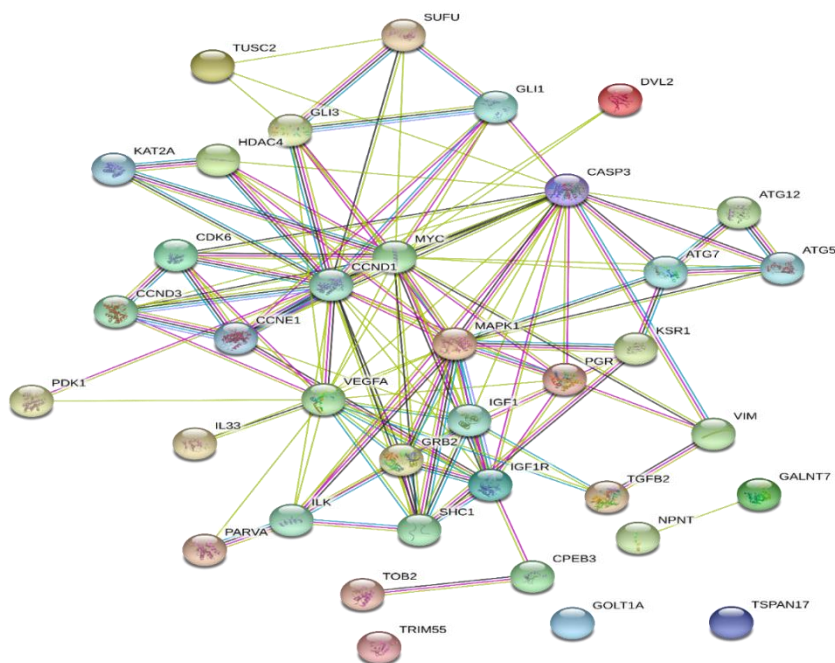


Figura 13. Protein interaction network of genes proven to be regulated by microRNA hsa-miR-378a-3p.

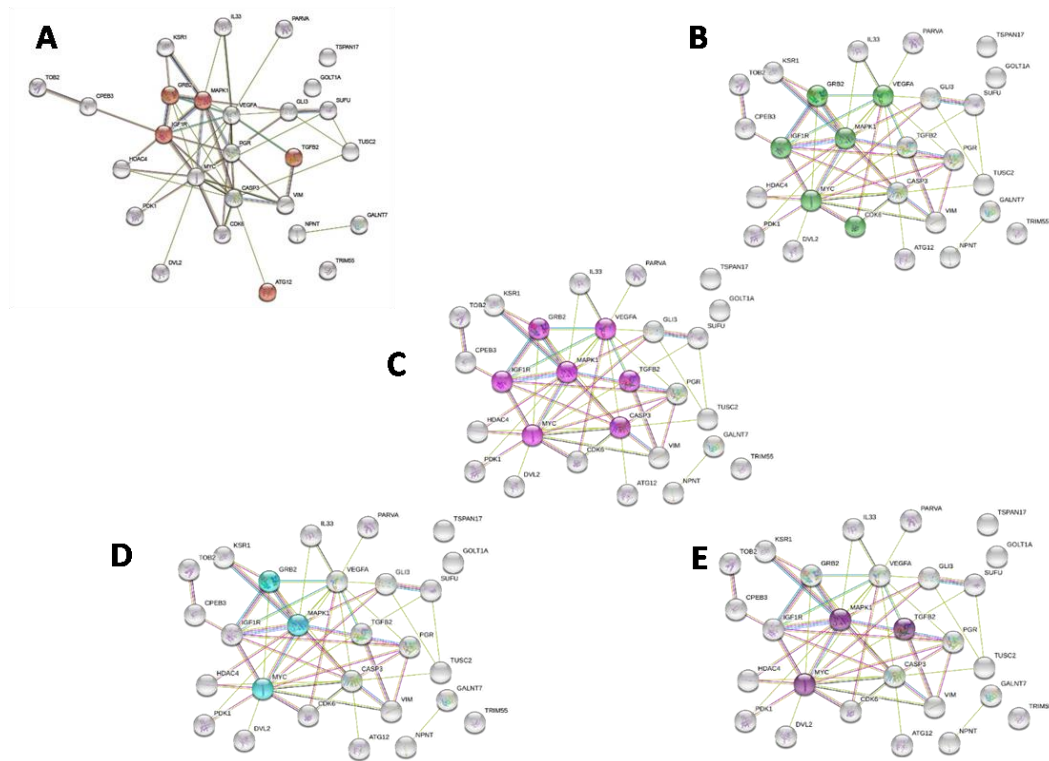


Fig 5. Metabolic pathways of proteins that act on the immune system. (A) FOX signaling pathway; (B) PI3K-Akt signaling pathway; (C) MAPK signaling pathway; (D) Acute myeloid leukemia; (E) TGF-beta signaling pathway.

Discussion

In the present study, we evaluated the expression of three microRNAs (not located on chromosome 21) in peripheral blood mononuclear cells of children with DS compared with children without the syndrome. Two of the studied miRNAs, hsa-miR-942-5p and hsa-miR-668-3p, did not show differential expression in DS. Only hsa-miR-378a-3p showed differential expression, statistically significant, in individuals with DS compared to the control group, showing increased expression in DS.

Hsa-miR-378a-3p is a member of the miR-378a family which has two mature chains, miR-378a-3p and miR-378a-5p, which originate from the first intron of the peroxisome proliferator activated gamma receptor gene, 1 beta coactivator (*PPARGC1B*) (Krist et al. 2015); this miRNA is known to be down-regulated in activated natural killer cells (NK) (Liu et al. 2016; P. Wang, Y. Gu 2012). Briank and colleagues, recently identified that increased miR-378a-3p expression may be associated with loss of NK cell cytotoxicity through decreased granzyme B (Briand et al. 2020).

Decreased levels of natural killer cells are seen in DS (Cetiner et al. 2010; Mitwalli et al. 2018) which could be associated with overexpression of hsa-miR-378a-3p, as observed in the present study. In addition, target genes of hsa-miR-378a-3p (CASP3, GRB2 and MAPK1) were found involved in the natural killer cell-mediated cytotoxicity process, figure 2.

In a study carried out by Ruckerl and colleagues the miR-378a-3p was identified as part of the anti-inflammatory macrophage (M2) activation program for interleukine 4 (IL-4) (D. Ruckerl, S. J. Jenkins 2012). Another study also reports expression of miR-378a up-regulated (unspecified chain) after stimulation with cytokines, as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) (X. Jiang, M. Xue 2014). TNF α and IL-6 are important cytokines involved in immune responses (Aureli et al. 2014). Studies show that individuals with DS have significantly increased levels of the pro-inflammatory markers IL-6 and TNF α in serum when compared to individuals without the syndrome (Iulita et al., 2016; Moushira et al. 2017).

Regarding to in silico research, it was showed 29 target genes validated for hsa-miR-378a-3p. The Visualization and Integrated Discovery database (DAVID) presented 44 biological processes and 32 metabolic pathways that can be affected by the altered expression of the hsa-miR-378a-3p microRNA (supplementary material). Enrichment analyzes showed that the target genes of hsa-miR-378a-3p participate in biological processes and metabolic pathways involved in the immune and inflammatory response. Two miR-378a target genes, *GLI3* and *CDK6* act in the differentiation process of T cells in the thymus (Hu et al. 2011; Solanki et al. 2018). *CDK6* is considered essential for differentiation of thymocytes and its negative expression in the thymus of children with DS has been reported (F. A. Lima, C. A. Moreira-Filho 2011). Impaired thymic function has been observed in DS and studies show that individuals with the syndrome have reduced thymic stroma where thymocytes develop, with an increase in the medullary compartment indicating accelerated maturation and premature involution (Lorenzo et al. 2013; Marcovecchio et al. 2019). Alterations in the process of thymic selection of T cells, characterized by decreasing in naive T lymphocytes and peripheral lymphocytes also are seen in DS (Bloemers et al., 2011; Marcovecchio et al. 2019; Mitwalli et al. 2018).

Our in silico analyzes showed that *CDK6* also acts in the negative regulation of monocyte differentiation. Chen and colleagues observed that *CDK6* acts as a negative regulator to prevent in vitro monocyte/macrophage differentiation (Chen et al. 2015).

Monocytes are essential cells in innate immunity, but they are not studied in DS. Increased number of non-classical monocytes, a pro-inflammatory subtype of monocytes, have been described in DS (Bloemers et al., 2010; Huggard et al. 2018).

Children with DS have an increase of 500 times in the incidence of acute myeloid leukemia and a decrease in tolerance to chemotherapy (Mast et al., 2020). Our results show that has-miR-378a-3p may be related to an increased incidence of leukemia in children with DS, since their target genes (*GRB2*, *MAPK1* and *MYC*) were found involved in the metabolic pathway of acute myeloid leukemia, figure 3. The *GRB2*, *MAPK1* and *MYC* genes act as mediators in processes of differentiation, cell proliferation and apoptosis in leukemic cells, representing therapeutic targets in leukemia (Al-Salem Bashanfer et al. 2019; Halbach et al. 2016; Mudgapalli et al. 2019).

Others metabolic pathways associated with the immune system in which the hsa-miR-378a-3p target genes participate were found in enrichment pathway analyzes. *MAPK* signaling pathway (*CASP3*, *GRB2*, *MAPK1*, *TGFB2* e *MYC*), PI3K-Akt signaling pathway (*CDK6*, *GRB2*, *IGF1R*, *MAPK1*, *MYC* e *VEGFA*), FOXO signaling pathway (*ATG12*, *GBR2*, *IGF1R*, *MAPK1* e *TGFB2*) and TGF-beta signaling pathway (*MAPK1*, *TGFB2* e *MYC*).

The MAPK signaling pathway regulates important cellular processes, such as proliferation, stress responses, apoptosis and immune defense (Soares-Silva et al. 2016). This pathway regulates the immune response through the production of immunomodulatory cytokines, such as TNF α , interleukin -1 (IL-1), interleukin 10 (IL-10) and interleukin 12 (IL-12) (Arthur JS., 2013). Activation of MAPK induces the expression of multiple genes that together regulate the inflammatory response. Many pathogens target the host's intracellular signaling pathways, such as MAPK pathways, to inhibit immune responses (Arthur JS., 2013; Soares-Silva et al., 2016). Study in DS progenitor neural cell line demonstrated differential expression of genes of the MAPK family and the authors suggest that the inefficient response of these cells to extracellular stimuli during neural development results in harmful consequences of cell survival, proliferation and differentiation, leading to intellectual disability (McMillan EL et al., 2012; Tarani L et al.,2020).

The PI3K-Akt metabolic pathway is part of the activation and proliferation processes of T lymphocytes. Simon Molas and colleagues recently showed that inhibition of the PI3K-Akt signaling cascade impairs T lymphocyte activation and proliferation, establishing a link between cell signaling, metabolic reprogramming and

lymphocyte proliferation (Simon-Molas et al., 2018). Study performed by You and colleagues showed that miR-378a-3p acts as an inhibitor of *PI3K* in diabetic mice (You et al. 2014). *Akt1* has also been identified as a target for miR-378a-3p, thereby reinforcing the action of miR-378a-3p on PI3K-Akt signaling (Machado et al. 2020; R uckerl et al. 2012). In addition, has been reported that overexpression of miR-378a results in the reduction of phosphorylated AKT and phosphorylated forkhead box O1 (FOXO1) (Machado et al. 2020; Puigserver et al. 2003).

The FOXO signaling pathway is also an important pathway of the immune system (Graves and Milovanova., 2019). The transcription factors of the forkhead box O (FOXO) family are stimulated by the MAPK pathway and inhibited by the PI3K- Akt pathway (Cabrera-Ortega et al., 2017). Particularly FOXO1 and FOXO3, play important roles in the innate and adaptive immune response, such as migration and homing of dendritic cells, development and activation of T and B lymphocytes, induction of cytokine expression and recruitment and activation of macrophages and neutrophils in infections (Cabrera-Ortega et al., 2017; Graves and Milovanova., 2019; Ouyang and Li., 2011).

The transforming growth factor beta (TGF- β) signaling pathway has a broad role in immune regulation (Batlle and Massagu ., 2019), acting as central regulator in the activation, differentiation and proliferation of innate immune cells (dendritic cells, natural killer cells, macrophages and granulocytes) and adaptive immune cells (T and B lymphocytes) (Kelly et al., 2017; Sanjabi et al., 2017). TGF- β acts to control the type of immune responses against infections, and plays a key role in maintaining immune tolerance and homeostasis against self antigens (Sanjabi et al., 2017). Individuals with DS have reduced serum levels of TGF-beta (Tarani et al., 2020), which contributes to the dysregulation of the innate and adaptive immune system.

The malfunction of the pathways mentioned here in which the target genes of hsa-miR-378a-3p participate can contribute to changes and deficiency of the immune system and, consequently, to a decrease in response to infections and an increased susceptibility to the development of autoimmune diseases, factors that are seen in individuals with DS (Huggard et al., 2020; Mitwalli et al., 2018).

Bioinformatics analysis also showed that the target genes of hsa-miR-378a-3p participate in biological processes associated with the nervous and cardiac systems, such as generation of neurons, astrocyte development and heart morphogenesis (Figure 2), all of which are involved in clinical manifestations of DS; individuals with the

syndrome have high incidence of congenital heart disease and neurological alterations as predisposition to Alzheimer's disease (Martin et al., 2018; Petersen and O'Bryant., 2019).

In conclusion, the present study shows that individuals with DS have differential expression of miRNA hsa-miR-378a-3p that their target genes are involved in processes and metabolic pathways of the immune system. Thus, it may be a possible peripheral biomarker of alterations related to the immune system in children with DS. Our results support the hypothesis that chromosome 21 trisomy leads to secondary changes in the entire genome considering that this microRNA and target genes are located outside chromosome 21.

References

- Ahlfors, Helena, Nneka Anyanwu, Edvinas Pakanavicius, Natalia Dinischiotu, Eva Lana-Elola, Sheona Watson-Scales, Justin Tosh, Frances Wiseman, James Briscoe, Karen Page, Elizabeth M. C. Fisher, and Victor L. J. Tybulewicz. 2019. "Gene Expression Dysregulation Domains Are Not a Specific Feature of Down Syndrome." *Nature Communications* 10(1).
- Al-Salem Bashanfer, Salem Ali, Mohamed Saleem, Olaf Heidenreich, Emmanuel Jairaj Moses, and Narazah Mohd Yusoff. 2019. "Disruption of MAPK1 Expression in the ERK Signalling Pathway and the RUNX1-RUNX1T1 Fusion Gene Attenuate the Differentiation and Proliferation and Induces the Growth Arrest in t(8;21) Leukaemia Cells." *Oncology Reports* 41(3):2027–40.
- Alexandrov, P. N., M. E. Percy, and Walter J. Lukiw. 2018. "Chromosome 21-Encoded MicroRNAs (MRNAs): Impact on Down's Syndrome and Trisomy-21 Linked Disease." *Cellular and Molecular Neurobiology* 38(3):769–74.
- Amr, Nermine H. 2018. "Thyroid Disorders in Subjects with down Syndrome: An Update." *Acta Biomedica* 89(1):132–39.
- Antonarakis, Stylianos E., Brian G. Skotko, Michael S. Rafii, Andre Strydom, Sarah E. Pape, Diana W. Bianchi, Stephanie L. Sherman, and Roger H. Reeves. 2020. "Down Syndrome." *Nature Reviews Disease Primers* 6(1).
- Arena A, Iyer AM, Milenkovic I, Kovacs GG, Ferrer I, Perluigi M, Aronica E. 2017. "Developmental Expression and Dysregulation of MiR-146a and MiR-155 in Down's Syndrome and Mouse Models of Down's Syndrome and Alzheimer's Disease." *Curr Alzheimer* 14(12):1305–17.

- Arthur JS, Ley SC. 2013. "Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity." *Nat Rev Immunol* 13(9):679–92.
- Aureli, A., P. Sebastiani, T. Del Beato, A. E. Marimpietri, A. Graziani, E. Sechi, and S. Di Loreto. 2014. "Involvement of IL-6 and IL-1 Receptor Antagonist on Intellectual Disability." *Immunology Letters* 162(1):124–31.
- B. L. Zampieri, J. M. Biselli-Perico, J. E. S. de Souza et al. 2014. "Altered Expression of Immune-Related Genes in Children with Down Syndrome." *PLoS ONE* 9(9).
- Batlle, Eduard, and Joan Massagué. 2019. "Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer." *Immunity* 50(4):924–40.
- Bermudez, Beatriz E. B. V., Camila M. de Oliveira, Mônica N. de Lima Cat, Neiva I. R. Magdalena, and Adriane Celli. 2019. "Gastrointestinal Disorders in Down Syndrome." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 179(8):1426–31.
- Bloemers BL, Bont L, de Weger RA, Otto SA, Borghans JA, Tesselaar K. 2011. "Decreased Thymic Output Accounts for Decreased Naive T Cell Numbers in Children with Down Syndrome." *J Immunol* 186.
- Bloemers BL, van Bleek GM, Kimpen JL, Bont L. 2010. "Distinct Abnormalities in the Innate Immune System of Children with Down Syndrome." *J Pediatr* 156(5):804–9.
- Brás A, Rodrigues AS, Gomes B, Rueff J. 2018. "Down Syndrome and MicroRNAs." *Biomed Rep* 8(1):11–16.
- Briand, Joséphine, Delphine Garnier, Arulraj Nadaradjane, Karen Clément-Colmou, Vincent Potiron, Stéphane Supiot, Gwenola Bougras-Cartron, Jean Sébastien Frenel, Dominique Heymann, François M. Vallette, and Pierre François Cartron. 2020. "Radiotherapy-Induced Overexpression of Exosomal MiRNA-378a-3p in Cancer Cells Limits Natural Killer Cells Cytotoxicity." *Epigenomics* 12(5):397–408.
- Cabrera-Ortega AA, Feinberg D, Liang Y, Rossa C Jr, Graves DT. 2017. "The Role of Forkhead Box 1 (FOXO1) in the Immune System: Dendritic Cells, T Cells, B Cells, and Hematopoietic Stem Cells." *Crit Rev Immunol* 37(1):1–13.
- Cetiner, S., O. Demirhan, T. C. Inal, D. Tastemir, and Y. Sertdemir. 2010. "Analysis of Peripheral Blood T-Cell Subsets, Natural Killer Cells and Serum Levels of Cytokines in Children with Down Syndrome." *International Journal of Immunogenetics*.
- Chen, Ming Tai, Lei Dong, Xin Hua Zhang, Xiao Lin Yin, Hong Mei Ning, Chao Shen,

- Rui Su, Feng Li, Li Song, Yan Ni Ma, Fang Wang, Hua Lu Zhao, Jia Yu, and Jun Wu Zhang. 2015. "ZFP36L1 Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation by Repressing CDK6." *Scientific Reports* 5:1–14.
- D. Ruckerl, S. J. Jenkins, N. N. Laqtom et al. 2012. "Induction of IL-4 Ralpha-Dependent MicroRNAs Identifies PI3K/Akt Signaling as Essential for IL-4-Driven Murine Macrophage Proliferation in Vivo." *Blood* 120(11):2307–16.
- F. A. Lima, C. A. Moreira-Filho, P. L. Ramos et al. 2011. "Decreased AIRE Expression and Global Thymic Hypofunction in Down Syndrome." *The Journal of Immunology* 187(6).
- Faten Moassass,¹ Abdulsamad Wafa,¹ Thomas Liehr,² Ayman Al-Ablog,¹ and Walid AL Achkar. 2018. "Down Syndrome Associated Childhood Myeloid Leukemia with yet Unreported Acquired Chromosomal Abnormalities and a New Potential Adverse Marker: Dup(1)(Q25q44)." *Mol Cytogenet*.
- Friedländer, Marc R., Esther Lizano, Anna J. S. Houben, Daniela Bezdán, Mónica Báñez-Coronel, Grzegorz Kudła, Elisabet Mateu-Huertas, Birgit Kagerbauer, Justo González, Kevin C. Chen, Emily M. LeProust, Eulàlia Martí, and Xavier Estivill. 2014. "Evidence for the Biogenesis of More than 1,000 Novel Human MicroRNAs." *Genome Biology* 15(4):1–17.
- Gensous, Noémie, Claudio Franceschi, Stefano Salvioli, Paolo Garagnani, and Maria Giulia Bacalini. 2019. "Down Syndrome, Ageing and Epigenetics." Pp. 161–93 in *Subcellular Biochemistry*. Vol. 91. Springer New York.
- Graves, Dana T., and Tatyana N. Milovanova. 2019. "Mucosal Immunity and the FOXO1 Transcription Factors." *Frontiers in Immunology* 10(November).
- Halbach, Sebastian, Zehan Hu, Christine Gretzmeier, Julia Ellermann, Franziska U. Wöhrle, Jörn Dengjel, and Tilman Brummer. 2016. "Axitinib and Sorafenib Are Potent in Tyrosine Kinase Inhibitor Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells." *Cell Communication and Signaling* 14(1):1–7.
- Hu, Miaofen G., Amit Deshpande, Nicolette Schlichting, Elisabeth A. Hinds, Changchun Mao, Marei Dose, Guo Fu Hu, Richard A. Van Etten, Fotini Gounari, and Philip W. Hinds. 2011. "CDK6 Kinase Activity Is Required for Thymocyte Development." *Blood* 117(23):6120–31.
- Huggard, Dean, Lynne Kelly, Emer Ryan, Fiona McGrane, Niamh Lagan, Edna Roche, Joanne Balfe, T. Ronan Leahy, Orla Franklin, Derek G. Doherty, and Eleanor J. Molloy. 2020. "Increased Systemic Inflammation in Children with Down

- Syndrome.” *Cytokine* 127(October 2019):154938.
- Huggard, Dean, Fiona McGrane, Niamh Lagan, Edna Roche, Joanne Balfe, Timothy Ronan Leahy, Orla Franklin, Ana Moreno, Ashanty M. Melo, Derek G. Doherty, and Eleanor J. Molloy. 2018. “Altered Endotoxin Responsiveness in Healthy Children with Down Syndrome.” *BMC Immunology* 19(1):1–10.
- Iulita MF, Ower A, Barone C, Pentz R, Gubert P, Romano C, et al. 2016. “An Inflammatory and Trophic Disconnect Biomarker Profile Revealed in Down Syndrome Plasma: Relation to Cognitive Decline and Longitudinal Evaluation.” *Alzheimers Dement* 12(11):1132–40.
- Karaca E, Aykut A, Ertürk B, Durmaz B, Güler A, et al. 2018. “Diagnostic Role of MicroRNA Expression Profile in the Prenatal Amniotic Fluid Samples of Pregnant Women with Down Syndrome.” *Balkan Med J* 35(2):163–66.
- Kelly, Aoife, Stephanie A. Houston, Eleanor Sherwood, Joshua Casulli, and Mark A. Travis. 2017. “Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β .” *Advances in Immunology* 134:137–233.
- Krist, Bart, Urszula Florczyk, Katarzyna Pietraszek-Gremplewicz, Alicja Józkwicz, and Jozef Dulak. 2015. “The Role of MiR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology.” *International Journal of Endocrinology*.
- Lim, J. H., D. J. Kim, D. E. Lee, J. Y. Han, J. H. Chung, H. K. Ahn, S. W. Lee, D. H. Lim, Y. S. Lee, S. Y. Park, and H. M. Ryu. 2015. “Genome-Wide MicroRNA Expression Profiling in Placentas of Fetuses with Down Syndrome.” *Placenta*.
- Liu, Shuyan, Lingming Chen, Ying Zeng, Lulu Si, Xiaolan Guo, Junmei Zhou, Danyun Fang, Gucheng Zeng, and Lifang Jiang. 2016. “Suppressed Expression of MiR-378 Targeting Gzmb in NK Cells Is Required to Control Dengue Virus Infection.” *Cellular and Molecular Immunology* 13(5):700–708.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.” *Methods* 25(4):402–8.
- Lorenzo, Laureanne P. E., Kristen E. Shatynski, Sarah Clark, Paul J. Yarowsky, and Mark S. Williams. 2013. “Defective Thymic Progenitor Development and Mature T-Cell Responses in a Mouse Model for Down Syndrome.” *Immunology*.
- Machado, Ivo F., João S. Teodoro, Carlos M. Palmeira, and Anabela P. Rolo. 2020. “MiR-378a: A New Emerging MicroRNA in Metabolism.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(10):1947–58.

- Marcovecchio, Genni Enza, Ileana Bortolomai, Francesca Ferrua, Elena Fontana, Luisa Imberti, Erika Conforti, Donato Amodio, Sonia Bergante, Giulia Macchiarulo, Veronica D'Oria, Francesca Conti, Silvia Di Cesare, Georgia Fousteri, Adriano Carotti, Alessandro Giamberti, Pietro Luigi Poliani, Luigi D. Notarangelo, Caterina Cancrini, Anna Villa, and Marita Bosticardo. 2019. "Thymic Epithelium Abnormalities in DiGeorge and Down Syndrome Patients Contribute to Dysregulation in T Cell Development." *Frontiers in Immunology* 10(MAR):1–15.
- Martin, Therese, Aisling Smith, Colm R. Breatnach, Etaoin Kent, Ita Shanahan, Michael Boyle, Phillip T. Levy, Orla Franklin, and Afif El-Khuffash. 2018. "Infants Born with Down Syndrome: Burden of Disease in the Early Neonatal Period." *Journal of Pediatrics* 193:21–26.
- Mast KJ, Taub JW, Alonzo TA, Gamis AS, Mosse CA, Mathew P, Berman JN, Wang YC, Jones HM, Campana D, Coustan-Smith E, Raimondi SC, Hirsch B, Hitzler JK, Head DR. 2020. "Pathologic Features of Down Syndrome Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group Protocol AAML0431." *Arch Pathol Lab Med* 144.(4):466–72.
- McMillan EL, Kamps AL, Lake SS, Svendsen CN, Bhattacharyya A. 2012. "Gene Expression Changes in the MAPK Pathway in Both Fragile X and Down Syndrome Human Neural Progenitor Cells." *J Stem Cells* 1(2154–162).
- Mitwalli, Maha, Yahya Wahba, Ali Shaltout, and Mona Gouda. 2018. "Lymphocyte Subgroups and Recurrent Infections in Children with Down Syndrome - A Prospective Case Control Study." *Central European Journal of Immunology* 43(3):248–54.
- Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, Silva FN, Costa Lda F, Ferreira LR, Furlanetto G, Chacur P, Zerbini MC, Carneiro-Sampaio M. 2016. "Modular Transcriptional Repertoire and MicroRNA Target Analyses Characterize Genomic Dysregulation in the Thymus of Down Syndrome Infants." *Oncotarget* 16(7):7497–7533.
- Moushira, &, E. Zaki, Hala T. El-Bassyouni, Angie M. S. Tosson, Eman Youness, and Jihan Hussein. 2017. "Coenzyme Q10 and Pro-Inflammatory Markers in Children with Down Syndrome: Clinical and Biochemical Aspects." *J Pediatr (Rio J)* 93(1):100–104.
- Mudgapalli, Nithya, Palanisamy Nallasamy, Haritha Chava, Srinivas Chava, Anup S.

- Pathania, Venugopal Gunda, Santhi Gorantla, Manoj K. Pandey, Subash C. Gupta, and Kishore B. Challagundla. 2019. "The Role of Exosomes and MYC in Therapy Resistance of Acute Myeloid Leukemia: Challenges and Opportunities." *Molecular Aspects of Medicine* 70(October):21–32.
- Ouyang, Weiming, and Ming O. Li. 2011. "Foxo: In Command of T Lymphocyte Homeostasis and Tolerance." *Trends in Immunology* 32(1):26–33.
- P. Wang, Y. Gu, Q. Zhang et al. 2012. "Identification of Resting and Type I IFN-Activated Human NK Cell MiRNomes Reveals MicroRNA-378 and MicroRNA-30e as Negative Regulators of NK Cell Cytotoxicity." *The Journal of Immunology* 189(1):211–21.
- Petersen, Melissa E., and Sid E. O'Bryant. 2019. "Blood-Based Biomarkers for Down Syndrome and Alzheimer's Disease: A Systematic Review." *Developmental Neurobiology* 79(7):699–710.
- Rückerl, Dominik, Stephen J. Jenkins, Nouf N. Laqtom, Iain J. Gallagher, Tara E. Sutherland, Sheelagh Duncan, Amy H. Buck, and Judith E. Allen. 2012. "Induction of IL-4R α -Dependent MicroRNAs Identifies PI3K/Akt Signaling as Essential for IL-4-Driven Murine Macrophage Proliferation in Vivo." *Blood* 120(11):2307–16.
- Sanjabi, Shomyseh, Soyoung A. Oh, and Ming O. Li. 2017. "Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9(6):1–33.
- Shi, Wei Li, Zhong Zhen Liu, Hong Dan Wang, Dong Wu, Hui Zhang, Hai Xiao, Yan Chu, Qiao Fang Hou, and Shi Xiu Liao. 2016. "Integrated MiRNA and mRNA Expression Profiling in Fetal Hippocampus with Down Syndrome." *Journal of Biomedical Science* 23(1):1–12.
- Silva, Cláudia Regina Santos, Joice Matos Biselli-Périco, Bruna Lancia Zampieri, Wilson Araujo Silva, Jorge Estefano Santana De Souza, Matheus Carvalho Bürger, Eny Maria Goloni-Bertollo, and Érika Cristina Pavarino. 2016. "Differential Expression of Inflammation-Related Genes in Children with Down Syndrome." *Mediators of Inflammation* 2016.
- Simon-Molas, Helga, Claudia Arnedo-Pac, Pere Fontova, Anna Vidal-Alabró, Esther Castaño, Ana Rodríguez-García, Àurea Navarro-Sabaté, Núria Lloberas, Anna Manzano, and Ramon Bartrons. 2018. "PI3K–Akt Signaling Controls PFKFB3 Expression during Human T-Lymphocyte Activation." *Molecular and Cellular*

- Biochemistry* 448(1–2):187–97.
- Soares-Silva, Mercedes, Flavia F. Diniz, Gabriela N. Gomes, and Diana Bahia. 2016. “The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids.” *Frontiers in Microbiology* 7(FEB):1–9.
- Solanki, Anisha, Diana C. Yanez, Susan Ross, Ching In Lau, Eleftheria Papaioannou, Jiawei Li, José Ignacio Saldaña, and Tessa Crompton. 2018. “Gli3 in Fetal Thymic Epithelial Cells Promotes Thymocyte Positive Selection and Differentiation by Repression of Shh.” *Development (Cambridge)* 145(3).
- Tarani L, Carito V, Ferraguti G, Petrella C, Greco A, Ralli M, Messina MP, Rasio D, Luca E, Putotto C, Versacci P, Ceccanti M, Fiore M. 2020. “Neuroinflammatory Markers in the Serum of Prepubertal Children with Down Syndrome.” *J Immunol Res* 2.
- X. Jiang, M. Xue, Z. Fu et al. 2014. “Insight into the Effects of Adipose Tissue Inflammation Factors on MiR-378 Expression and the Underlying Mechanism.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 33(6):1778–88.
- Ye, Jiawei, Mingcheng Xu, X. Tian, S. Cai, and Su Zeng. 2019. “Research Advances in the Detection of MiRNA.” *Journal of Pharmaceutical Analysis* 9(4):217–26.
- You, Li, Wensha Gu, Lin Chen, Ling Pan, Jinyu Chen, and Yongde Peng. 2014. “MiR-378 Overexpression Attenuates High Glucose-Suppressed Osteogenic Differentiation through Targeting CASP3 and Activating PI3k/Akt Signaling Pathway.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(10):7249–61.
- Zwaan CM, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. 2010. “Acute Leukemias in Children with Down Syndrome.” *HematolOncolClin North Am* 24(1):19–34.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Biological processes that the genes regulated by the hsa-miR-378a-3p microRNA participate.

Biological Processes	Genes	Fold Enrichment	P- Value
Positive regulation of cell proliferation	6	8	0,00065
Positive regulation of gene expression	5	11,9	0,00066
Negative regulation of osteoblast differentiation	3	47,8	0,00160
Axon orientation	4	15,6	0,00180
Branching involved in ureteral button morphogenesis	3	44,4	0,00190
Positive regulation of the neuron apoptotic process	3	43,4	0,00200
Negative regulation of cell proliferation	5	7,9	0,00300
Negative regulation of RNA polymerase II promoter transcription	6	5,2	0,00440
Smoothed signaling pathway involved in specifying the destination of spinal cord motor neuron cells	2	414,6	0,00460
Smoothed signaling pathway involved in specifying the ventral spinal cord interneuron	2	414,6	0,00460
Negative regulation of the apoptotic process	5	6,8	0,00500
Neural tube closure	3	24,2	0,00630
Wound healing	3	23,3	0,00680
Cell-cell signaling	4	9,8	0,00690
MAPK Waterfall	4	9,5	0,00750
Positive transcription regulation, modeled by DNA	5	6	0,00760
Regulation of gene expression	3	18,7	0,01000
Negative regulation of monocyte differentiation	2	177,7	0,01100
Generation of neurons	2	177,7	0,01100
Cellular response to 13-acetate 12-myristate phorbol	2	177,7	0,01100

Response to the drug	4	8,2	0,01100
Differentiation of Bergmann glial cells	2	138,2	0,01400
Positive transcription regulation of the RNA polymerase II promoter	6	3,8	0,01600
Cell proliferation	4	6,8	0,01800
Positive ossification regulation	2	103,7	0,01800
Development of the skeletal system	3	13,6	0,01900
Cell cycle stop	3	13,2	0,02000
Astrocyte development	2	77,7	0,02400
Embryonic development of the digestive tract	2	77,7	0,02400
Camera-like eye morphogenesis	2	77,7	0,02400
Response to hypoxia	3	10,8	0,02900
Negative regulation of the desmoothened signaling pathway	2	65,5	0,02900
Positive regulation of smooth muscle cell migration	2	62,2	0,03100
Positive regulation of neuroblast proliferation	2	62,2	0,03100
Heart development	3	10,2	0,03200
Protein phosphorylation	4	5,5	0,03300
Positive regulation of cell migration	3	10,1	0,03300
Embryonic development in the womb	3	10	0,03400
Morphogenesis of the outgoing tract septum	2	54,1	0,03500
Positive regulation of mesenchymal cell proliferation	2	47,8	0,04000
Differentiation of t cells in the thymus	2	46,1	0,04100
Hippo Signage	2	46,1	0,04100
Positive regulation of telomerase activity	2	42,9	0,04400
Heart morphogenesis	2	38,9	0,04800

Metabolic pathways that the genes regulated by the hsa-miR-378a-3p microRNA participate.

Metabolic pathways	Genes	Fold Enrichment	P - values
Cancer Pathways	11	8,8	0,00000007
Proteoglycans in cancer	7	10,9	0,00002100
Chronic myeloid leukemia	5	21,7	0,00005800
Hepatitis B	6	12,9	0,00006000
MicroRNAs in cancer	7	7,7	0,00016000
FoxO signaling path	5	11,7	0,00064000
Signaling pathways that regulate stem cell pluripotency	5	11,2	0,00075000
Colorectal cancer	4	20,2	0,00083000
Glioma	4	19,2	0,00095000
Pancreatic cancer	4	19,2	0,00095000
Renal cell carcinoma	4	19	0,00099000
Progesterone-mediated oocyte maturation	4	14,4	0,00220000
HIF-1 signaling path	4	13	0,00290000
Formation of the dorsoventral axis	3	34,7	0,00300000
Viral carcinogenesis	5	7,6	0,00310000
Focal adhesion	5	7,6	0,00310000
PI3K-Akt signaling path	6	5,4	0,00320000
Ras signaling pathway	5	6,9	0,00440000
Oocyte meiosis	4	11,3	0,00440000
MAPK signaling path	5	6,2	0,00650000
Bladder cancer	3	22,9	0,00680000

Endometrial cancer	3	18	0,01100000
Basal cell carcinoma	3	17,4	0,01200000
Acute myeloid leukemia	3	16,8	0,01200000
Non-small cell lung cancer	3	16,8	0,01200000
Tuberculosis	4	7,1	0,01600000
Central carbon metabolism in cancer	3	14,7	0,01600000
Melanoma	3	13,2	0,01900000
TGF-beta signaling pathway	3	11,2	0,02700000
ErbB signaling path	3	10,8	0,02800000
Prostate cancer	3	10,7	0,02900000
Toxoplasmosis	3	8,5	0,04400000
