



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

DANIEL RAMOS DE OLIVEIRA SANTOS

**REGULAÇÃO DOS GENES *IKBKB* E *BCL2*
POR MICRORNA E EXPRESSÃO DE GENES
APOPTÓTICOS EM TECIDOS COM
TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21**

São José do Rio Preto
2024

Daniel Ramos de Oliveira Santos

Regulação dos genes *IKBKB* e *BCL2* por microRNA e expressão de genes apoptóticos em tecidos com trissomia do cromossomo 21

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

Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

São José do Rio Preto
2024

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

Santos, Daniel Ramos de Oliveira

Regulação dos genes *IKBKB* e *BCL2* por microRNA e expressão de
genes apoptóticos em tecidos com trissomia do cromossomo 21.

Daniel Ramos de Oliveira Santos

São José do Rio Preto, 2024.

74p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

1. Trissomia do 21. 2. Bioinformática. 3. MicroRNAs. 4. Regulação
da expressão gênica. 5. Apoptose.

DANIEL RAMOS DE OLIVEIRA SANTOS

Regulação dos genes *IKBKB* e *BCL2* por microRNA
e expressão de genes apoptóticos em tecidos com
trissomia do cromossomo 21

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, 11/09/2024

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Síndrome de Down	2
1.2 Objetivos.....	10
1.2.1 Objetivo Geral.....	10
1.2.2 Objetivos Específicos	11
2. CASUÍSTICA E MÉTODO	13
2.1 Cultura dos fibroblastos dissômicos e trissômicos	13
2.2 Ensaios de Transfecção.....	13
2.3 Extração de RNA e Proteínas	15
2.4 Quantificação da expressão dos genes IKBKB e BCL2.....	16
2.5 Quantificação da expressão proteica IKBKB e BCL2.....	18
2.6 Análise Estatística.....	19
2.7 Mineração de dados	20
2.8 Análise pelo String-db	23
2.9 Análise pelo Metascape	24
3. RESULTADOS	26
3.1 Análise da expressão gênica relativa	26
3.2 Análise da expressão proteica.....	30
3.3 Análise de Bioinformática	33
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ANEXOS	59
Anexo A – Artigo redigido para defesa	59
Anexo B – Aprovação do CEP	74

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Marcia

Por fazerem o possível e o impossível por mim. Amo vocês!

Aos meus avós, José e Odete, Antônio e Geralda

Por todo o amor compartilhado desde sempre. Amo vocês!

Aos amigos

Por sempre estarem do meu lado e por todos os momentos de ajuda e alegria.

A todos

Que estiveram presentes ao longo dessa caminhada, muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Diretor Geral, Prof. Dr. Francisco Assis Cury

Pelo grande trabalho a frente da Instituição.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP

Pelo empenho e disposição na resolução de todos os entraves relacionados ao curso de pós-graduação da Instituição.

À Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

Pela oportunidade e por acreditar sempre em meu potencial como aluno, do início ao fim.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

Pela experiência e coordenação do grupo.

A todos os colegas do laboratório

Por todos os momentos compartilhando conhecimento, conversas e por sempre estarem a disposição para ajudar.

Marlon Fraga Mattos

Por todo conhecimento transmitido, pela ajuda do início ao fim do trabalho e pelo companheirismo de sempre.

Olívia Borghi Nascimento

Por toda ajuda e disposição para ensinar os procedimentos no início do trabalho e pela forma como sempre esteve presente.

Vitória Scavacini Possebon

Por ter surgido como alguém que me ajudou em momentos de dificuldade, por estar sempre presente nos bons momentos e por todas as conversas, sendo importante no âmbito acadêmico e pessoal.

Ludimila Leite Marzochi

Por tudo o que fez e faz pensando sempre no bem estar dos outros, pela amizade construída ao longo dos anos e por todo auxílio, dentro e fora do laboratório.

Bianca Barberio Bogdan Tedeschi

Por ser desde o início alguém que esteve presente, pela amizade e pela disposição em sempre ajudar.

Marcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes

Por compartilhar sempre conhecimento e estar sempre presente como amiga, ajudando em todos os aspectos.

Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

Por toda ajuda nos procedimentos laboratoriais e pelos ensinamentos transmitidos.

Ana Lúcia, Ana Zecchin, Heloísa Caldas

Pela ajuda e confiança na reta final do trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram e ajudaram no trabalho durante todos esses anos, meu muito obrigado.

*“No fim tudo dá certo e se não deu certo é porque
ainda não chegou ao fim”.*

(Fernando Sabino)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biogênese dos miRNAs.....	07
Figura 2.	Desenho da placa para cultivo dos fibroblastos após a transfecção. Contendo controle negativo (CN), controle positivo (CP), mimic/inibidor miR-378a-3p e miR-942.....	15
Figura 3.	Via de apoptose em humanos, de acordo com o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Em destaque, a via de apoptose intrínseca.....	22
Figura 4.	a) Expressão do gene IKBKB em fibroblastos dissômicos transfectados com miR-942-5p mimic; b) Expressão do gene IKBKB em fibroblastos dissômicos transfectados com inibidor miR-942-5p; c) Expressão do gene IKBKB em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-942-5p mimic; d) Expressão do gene IKBKB em fibroblastos trissômicos transfectados com inibidor miR-942-5p.....	27
Figura 5.	a) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com miR-942-5p mimic; b) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com inibidor miR-942-5p; c) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-942-5p mimic; d) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com inibidor miR 942-5p.....	28
Figura 6.	a) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com miR-378a-3p mimic; b) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com inibidor miR-378a-3p; c) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-378a-3p mimic; d) Expressão do gene BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com inibidor miR-378a-3p.....	30
Figura 7.	Análise da expressão proteica de IKBKB em fibroblastos transfectados com miR-942-5p mimic.....	31

Figura 8.	Análise da expressão proteica de IKBKB em fibroblastos transfectados com inibidor de miR-942-5p.....	31
Figura 9.	Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com miR-378a-3p e miR-942-5p mimics.....	31
Figura 10.	Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-378a-3p mimic e miR-942-5p mimic.....	32
Figura 11.	Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com inibidores de miR-378a-3p e miR-942-5p.....	32
Figura 12.	Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com inibidores de miR-378a-3p e miR-942-5p.....	32
Figura 13.	Rede de interação proteica gerada pelo website String-db.....	34
Figura 14.	Gráfico de barras de termos enriquecidos após a lista dos genes ser incluída, coloridos por valores de p.....	35
Figura 15.	Rede de interação de termos enriquecidos colorida por ID de cluster - nós com o mesmo ID de cluster estão frequentemente próximos uns aos outros.....	35
Figura 16.	Redes de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados para os genes selecionados.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Dados dos miRNAs miméticos e inibidores, utilizados nos ensaios de transfecção.....	14
Quadro 2.	Dados dos genes utilizados nos ensaios de expressão gênica.....	18
Quadro 3.	Dados dos anticorpos utilizados na técnica de Western blotting.....	19
Quadro 4.	Dados dos genes apoptóticos selecionados para análise da expressão em cérebros de indivíduos com SD.....	23
Quadro 5.	Valores de RQ médio da expressão relativa de IKBKB em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic e inibidor 942-5p.....	26
Quadro 6.	Valores de RQ médio da expressão relativa de BCL2 em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic e inibidor 942-5p.....	28
Quadro 7.	Valores de RQ médio da expressão relativa de BCL2 em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-378a-3p mimic e inibidor 378a-3p.....	29
Quadro 8.	Valores de Log FC para 4 genes apoptóticos expressos em diferentes faixas etárias no cérebro de indivíduos com SD.....	33
Quadro 9.	Valores de log FC da expressão de quatro genes apoptóticos em múltiplas estruturas cerebrais de indivíduos com Síndrome de Down.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADRB1	<i>Adrenergic Receptor Beta 1</i>
ADRB2	<i>Adrenergic Receptor Beta 2</i>
ALOX12	<i>Arachidonate 12-Lipoxygenase</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BBC3	<i>BCL2 Binding Component 3</i>
BCL-X	<i>B-cell lymphoma-X</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2 Like 1</i>
BDKRB1	<i>Bradykinin Receptor B1</i>
CACNA1D	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D</i>
CASP1	<i>Caspase 1</i>
CASP7	<i>Caspase 7</i>
CASP9	<i>Caspase 9</i>
CBC	<i>Cerebellar Cortex</i>
CCL3	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 3</i>
CCR2	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
CCR5	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 5</i>
CCR7	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 7</i>
CD19	<i>Cluster of Differentiation 19</i>
CD40	<i>Cluster of Differentiation 40</i>
CD40LG	<i>CD40 Ligand</i>
CD80	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CO₂	<i>Carbon Dioxide</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DA	<i>Doença de Alzheimer</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
DFC	<i>Dorsolateral Prefrontal Cortex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>

EDN1	<i>Endothelin 1</i>
FC	<i>Fold Change</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HIP	<i>Hippocampus</i>
HTR3A	<i>5-Hydroxytryptamine Receptor 3A</i>
ICAM1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IKBKB	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta</i>
IL-1β	<i>Interleukin 1 Beta</i>
IL-18	<i>Interleukin 18</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL10	<i>Interleukin 10</i>
IPC	<i>Inferior Parietal Cortex</i>
IRAK1	<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1</i>
ITC	<i>Inferior Temporal Cortex</i>
ITGAM	<i>Integrin Subunit Alpha M</i>
ITGB	<i>Integrin Subunit Beta</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LTA4H	<i>Leukotriene A4 Hydrolase</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
miRNAs	<i>MicroRNAs</i>
MFC	<i>Medial Frontal Cortex</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
NOS2	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
NLRP3	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NUPR1	<i>Nuclear Protein 1</i>
OFC	<i>Orbitofrontal Cortex</i>
PDE4C	<i>Phosphodiesterase 4C</i>
PFK1	<i>Phosphofructokinase 1</i>
PLA2G2D	<i>Phospholipase A2 Group IID</i>

PLA2G5	<i>Phospholipase A2 Group V</i>
PLCB4	<i>Phospholipase C Beta 4</i>
PLCD1	<i>Phospholipase C Delta 1</i>
PMBC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PPI	<i>Protein-Protein Interaction</i>
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PCRq	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RIPK1	<i>Receptor Interacting Serine/Threonine-protein Kinase 1</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-seq	<i>RNA Sequencing</i>
RNA_m	<i>Messenger RNA</i>
RPLP0	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>
RQ	<i>Relative Quantification</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
S1C	<i>Primary Somatosensory Cortex</i>
SD	<i>Síndrome de Down</i>
SFB	<i>Serum-Free Bovine</i>
SKI	<i>SKI Proto-oncogene</i>
SOCS1	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 1</i>
STC	<i>Superior Temporal Cortex</i>
T21	<i>Trisomy 21</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
TBXAS1	<i>Thromboxane A Synthase 1</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNFRSF1B	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 1B</i>
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VFC	<i>Ventromedial Frontal Cortex</i>
V1C	<i>Primary Visual Cortex</i>

RESUMO

Introdução: Trissomia do cromossomo 21 resulta em várias disfunções, incluindo comprometimento cognitivo e deficiência do sistema imunológico. MicroRNAs (miRNAs) influenciam processos biológicos como apoptose e proliferação celular, desempenhando papel significativo em distúrbios associados à síndrome de Down (SD). **Objetivos:** Avaliar a expressão gênica e proteica de IKBKB e BCL2 em fibroblastos dissômicos e trissômicos para o cromossomo 21, após transfecção com miR-942-5p e miR-378a-3p e analisar, por bioinformática, a expressão dos genes apoptóticos (*BCL2*, *BAX*, *BBC3* e *CASP7*) em cérebros pós-morte de indivíduos com SD. **Material e Método:** Fibroblastos foram transfectados com mimics e inibidores de miRNAs para avaliar suas interações com os genes BCL2 e IKBKB. RNAs e proteínas foram analisados por PCR quantitativo em tempo real e Western Blotting, respectivamente. Microarray de genes apoptóticos expressos em cérebros de 58 indivíduos SD e 58 controles, provenientes do banco de dados GEO foram analisados por bioinformática pelo GEO2R; a interação entre proteínas foi investigada usando STRING-DB e Metascape. **Resultados:** A expressão de IKBKB diminuiu após transfecção com miR-942-5p mimic em fibroblastos dissômicos ($p<0.0001$) e trissômicos ($p<0.0001$), enquanto aumentou, com o inibidor, em fibroblastos dissômicos ($p<0.0001$) e trissômicos ($p=0.02$). A expressão de BCL2 em fibroblastos dissômicos diminuiu após transfecção com miR-942-5p mimic ($p=0.0016$) e aumentou com o inibidor ($p=0.01$). Nos fibroblastos trissômicos, a expressão de BCL2 diminuiu com o mimic ($p<0.0001$) e inibidor ($p<0.0001$). Para miR-378a-3p, a expressão de BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com mimic não mostrou diferença significativa ($p=0.09$), mas aumentou com o inibidor ($p<0.0001$). Nos fibroblastos trissômicos, a expressão de BCL2 diminuiu com mimic ($p<0.0001$) e inibidor ($p=0.0001$). Não foi observada diferenças significativas na expressão proteica de IKBKB e BCL2 entre fibroblastos transfectados e controles negativos. A análise de bioinformática revelou que a expressão de BCL2 aumentou no período pré-natal ($\log FC=1,16$) nas faixas etárias de 13-22 anos ($\log FC=0,71$) e 30-39 anos ($\log FC=0,93$). Expressão aumentada também foi observada para BBC3 no período pré-natal ($\log FC=0,65$) e entre 40-42 anos ($\log FC=0,67$) e para CASP7 entre 13-22 anos ($\log FC=0,66$) e 40-42 anos ($\log FC=0,77$). A expressão de BAX diminuiu entre 30-39 anos ($\log FC=-1,10$). No córtex frontal ventrolateral SD foi observada expressão aumentada de BCL2 ($\log FC=0,74$). A análise pelo STRING-DB mostrou uma rede de interação entre BCL2, BAX, BBC3 e CASP7 com alta confiança (0,700) e significância ($p=2,2e-06$), indicando sua importância na regulação da apoptose em SD. **Conclusão:** Sugere-se que miR-942-5p regula *IKBKB*, independente da trissomia 21 e regula *BCL2* apenas nos fibroblastos dissômicos. Os achados dos outros ensaios de transfecção não são compatíveis com a função esperada dos miRNAs. A discrepância dos níveis de mRNA e proteína de IKBKB e BCL2 indica a complexidade da regulação pós-transcricional. Nas amostras de cérebro, a expressão diferencial dos genes *BCL2*, *BBC3*, *CASP7* e *BAX* em SD nas diferentes faixas etárias sugere desequilíbrio na regulação da via apoptótica na SD. A expressão aumentada de *BCL2* no córtex frontal ventrolateral sugere uma possível importância da expressão desse gene em áreas específicas do cérebro de indivíduos SD, possivelmente contribuindo para a sobrevivência celular e proteção contra a neurodegeneração.

Palavras-chave: Trissomia do 21; Regulação da expressão gênica; microRNAs; Apoptose; Biologia Computacional.

ABSTRACT

Introduction: Trisomy of chromosome 21 results in various dysfunctions, including cognitive impairment and immune system deficiency. MicroRNAs (miRNAs) influence biological processes such as apoptosis and cell proliferation, playing a significant role in disorders associated with Down syndrome (DS). **Objectives:** To assess the gene and protein expression of *IKBKB* and *BCL2* in disomic and trisomic fibroblasts for chromosome 21, after transfection with miR-942-5p and miR-378a-3p, and to analyze, through bioinformatics, the expression of apoptotic genes (*BCL2*, *BAX*, *BBC3*, and *CASP7*) in post-mortem brains of individuals with DS. **Materials and Methods:** Fibroblasts were transfected with miRNA mimics and inhibitors to evaluate their interactions with the *BCL2* and *IKBKB* genes. RNAs and proteins were extracted and analyzed by quantitative real-time PCR and Western Blotting, respectively. Microarray data of apoptotic genes expressed in brains of 58 DS individuals and 58 controls, from the public GEO database, were analyzed using the bioinformatics tool GEO2R; protein interactions were investigated using STRING-DB and Metascape. **Results:** The expression of *IKBKB* decreased after transfection with miR-942-5p mimic in disomic ($p<0.0001$) and trisomic ($p<0.0001$) fibroblasts, while it increased in disomic ($p<0.0001$) and trisomic ($p=0.02$) fibroblasts with the inhibitor. The expression of *BCL2* in disomic fibroblasts decreased after transfection with miR-942-5p mimic ($p=0.0016$) and increased with the inhibitor ($p=0.01$). In trisomic fibroblasts, *BCL2* expression decreased with the mimic ($p<0.0001$) and inhibitor ($p<0.0001$). For miR-378a-3p, *BCL2* expression in disomic fibroblasts transfected with the mimic did not show significant difference ($p=0.09$), but increased with the inhibitor ($p<0.0001$). In trisomic fibroblasts, *BCL2* expression decreased with mimic ($p<0.0001$) and inhibitor ($p=0.0001$). Western Blotting analysis did not show significant differences in the protein expression of *IKBKB* and *BCL2* between transfected fibroblasts and negative controls. Bioinformatics analysis revealed that *BCL2* expression increased during the prenatal period ($\log FC=1,16$) and in the age ranges of 13-22 years ($\log FC=0,71$) and 30-39 years ($\log FC=0,93$). Increased expression was also observed for *BBC3* during the prenatal period ($\log FC=0,65$) and between 40-42 years ($\log FC=0,67$) and for *CASP7* between 13-22 years ($\log FC=0,66$) and 40-42 years ($\log FC=0,77$). *BAX* expression decreased between 30-39 years ($\log FC=-1,10$). In the ventrolateral frontal cortex of DS, increased expression of *BCL2* ($\log FC=0,74$) was observed. STRING-DB analysis showed a high-confidence (0,700) and significant ($p=2,2e-06$) interaction network between *BCL2*, *BAX*, *BBC3*, and *CASP7*, indicating their importance in regulating apoptosis in DS. **Conclusion:** It is suggested that miR-942-5p regulates *IKBKB* independently of trisomy 21 and regulates *BCL2* only in disomic fibroblasts. The findings from the others transfection assays are not consistent with the expected function of the miRNAs. The discrepancy between mRNA and protein levels of *IKBKB* and *BCL2* indicates the complexity of post-transcriptional regulation. In brain samples, the differential expression of the genes *BCL2*, *BBC3*, *CASP7*, and *BAX* in DS across different age groups suggests an imbalance in apoptotic pathway regulation in DS. The increased expression of *BCL2* in the ventrolateral frontal cortex suggests a potential importance of this gene expression in specific brain areas of DS individuals, possibly contributing to cellular survival and protection against neurodegeneration.

Keywords: Trisomy 21; Gene expression regulation; microRNAs; Apoptosis; Computational Biology.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Down

A síndrome de Down (SD), uma das condições genéticas mais comuns, com incidência de aproximadamente um a cada 1.000 nativos ⁽¹⁾ teve sua descrição inicial em 1866, pelo médico britânico John Langdon Down. A origem cromossômica da síndrome foi descoberta de maneira independente, em 1959, pelo francês Jérôme Lejeune e pela inglesa Pat Jacobs e é caracterizada pela trissomia do cromossomo 21 (T21).⁽²⁾

A T21 ocorre, em cerca de 95% dos casos, como resultado da não disjunção cromossômica durante a gametogênese, principalmente na meiose materna. O mosaïcismo, caracterizado pela presença de células trissômicas e dissômicas em um mesmo indivíduo, e a translocação Robertsoniana entre o cromossomo 21 e outros cromossomos acrocêntricos, em especial o 14, são as alterações menos frequentes, com ocorrência aproximada de 1 a 4%, respectivamente.⁽³⁾

As pessoas com T21 apresentam incapacidade intelectual que dificulta a aquisição das habilidades cognitivas tais como: coordenação motora, linguagem, compreensão e memória.⁽³⁻⁶⁾ Além disso, essa anormalidade cromossômica favorece aos acometidos uma variedade de problemas de saúde, das quais os mais comuns são deficiência auditiva (84%), demência (68-80%), dificuldades de sono (65%), problemas visuais (56.8%), disfagia (55%), hipotireoidismo (50%), doença cardíaca congênita (44%) e infecção do trato respiratório (34-40%),⁽⁷⁾ o que diminui a expectativa de vida das pessoas com a trissomia.⁽⁸⁾ Entretanto, ressalta-se que, atualmente, a promoção à saúde tem aumentado a expectativa de vida dessa população para, em média, 60 anos.⁽⁹⁾

Em geral, também se observa na T21 maior prevalência de transtornos neuropsíquicos como depressão, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), autismo, transtorno bipolar e esquizofrenia.⁽¹⁰⁾ Destaca-se ainda a alta prevalência de demência, uma forma variante da doença de Alzheimer (DA) de início precoce, reportada em indivíduos com 40-49 anos de idade.⁽¹¹⁻¹³⁾

Outro aspecto relevante, é que indivíduos com T21 apresentam uma marcante desregulação imunológica com maior propensão a processos inflamatórios.^(14,15) Essa condição impacta os sistemas imune inato e adaptativo, resultando em aumento de risco à infecções e de manifestações autoinflamatórias.⁽¹⁵⁾ A inflamação sistêmica acentuada é uma característica peculiar da SD, podendo agravar a resposta neuroinflamatória.⁽¹⁶⁾ Neste processo, células do sistema imune e endoteliais produzem mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio. Esses mediadores participam do recrutamento de células imunes, agem em lesões teciduais, edemas e em processos de morte celular no cérebro e na medula espinhal. Além disso, a inflamação sistêmica pode levar a infiltração de células imunes periféricas (monócitos, macrófagos e linfócitos T), ativação e proliferação de microglias e astrócitos e apoptose das células nervosas.⁽¹⁷⁾ Crianças com T21 exibem níveis significativamente elevados de IL-1 β , associados a diversas complicações de saúde, como doença inflamatória intestinal e desordens metabólicas.⁽¹⁵⁾ O aumento na expressão e regulação de IL-1 β também leva a formação de placas senis por meio da deposição de A β .^(18,19) As alterações do sistema imune em associação com o aumento da susceptibilidade à apoptose, as alterações epigenéticas e a expressão aumentada de genes supressores de tumor, presentes no cromossomo 21, podem contribuir para a proteção do desenvolvimento de tumores sólidos nessa população.^(20,21)

As manifestações clínicas observadas na T21 têm sido associadas com a presença do cromossomo 21 extra. O estudo recente de Edie et. al demonstrou uma associação entre o fenótipo físico da T21 e os efeitos da triplicação dos genes do cromossomo 21. Utilizando zebrafish como organismo modelo, eles demonstraram que a T21 resultou em uma grande variedade de defeitos no desenvolvimento, o que incluiu dismorfismo craniofacial, defeitos congênitos no coração e redução do tamanho do cérebro.⁽²²⁾ Um outro estudo, de Aivazidis e colaboradores, encontrou que a expressão em triplicata do cromossomo 21 pode levar a problemas na homeostase do organismo, o que contribui para as manifestações patológicas nos indivíduos com T21.⁽²³⁾

Uma meta-análise sobre genes diferencialmente expressos, realizada em indivíduos com T21 e controles, a partir de dados de microarray e sequenciamento de RNA (RNA-seq) publicados no Gene Expression Omnibus, mostrou que mais de 60% dos genes presentes no cromossomo 21 apresentam expressão aumentada, enquanto nenhum gene apresentou expressão diminuída com significância estatística.⁽²⁴⁾

Considerando a presença de um cromossomo 21 extra no genoma, espera-se 50% a mais da composição genética desse cromossomo nos indivíduos com T21, entretanto, nem sempre os genes presentes nesse cromossomo apresentam equivalente aumento de expressão. Variações na expressão gênica na SD podem levar a um desbalanço da dosagem gênica, dos quais alguns genes mostram-se mais expressos, alguns apresentam compensação na expressão e outros são altamente variáveis entre as pessoas com T21. Essa expressão gênica diferencial pode contribuir para as alterações fenotípicas/clínicas observadas nessa população. Portanto, embora exista um aumento na expressão dos genes do cromossomo 21, o impacto de cada gene ao longo do genoma pode variar.⁽²⁵⁾

Alguns estudos, incluindo os do nosso grupo de pesquisa têm identificado expressão diferencial de genes não localizados no cromossomo 21 na SD em relação à grupo controle sem a síndrome, confirmando a hipótese de que a T21 pode afetar a regulação gênica de todo o genoma.^(26,27) Após utilizar array de baixa densidade, foi possível identificar, em células mononucleadas de sangue periférico (PMBC) de crianças com SD a expressão diferencial de 36 genes, todos localizados em cromossomos dissômicos, sendo que 20 destes apresentaram expressão reduzida (*BCL2*, *CCL3*, *CCR7*, *CD19*, *CD28*, *CD40*, *CD40LG*, *CD80*, *EDN1*, *IKBKB*, *IL6*, *NOS2*, *SKI*, *LTA4H*, *BDKRB1*, *ADRB2*, *ITGAM*, *TNFRSF1B*, *ITGB* e *TBXAS1*) enquanto 16 foram identificados com a expressão elevada (*BCL2L1*, *CCR2*, *CCR5*, *IL10*, *PLA2G2D*, *CACNA1D*, *ALOX12*, *VCAM1*, *ICAM1*, *PLCD1*, *ADRB1*, *HTR3A*, *PDE4C*, *CASPI*, *PLA2G5* e *PLCB4*).^(26,27)

A regulação da expressão gênica ocorre em nível transcricional e pós-transcricional.⁽²⁸⁾ A regulação transcricional engloba os processos de remodelamento da cromatina, modificações epigenéticas e ligação de fatores de transcrição, os quais são proteínas que irão atuar na regulação gênica por meio da ligação específica em sequências do DNA.⁽²⁸⁾ A regulação pós-transcricional acontece após a síntese do RNA mensageiro (RNAm) e pode ocorrer por meio de mecanismos como o splicing,⁽²⁹⁾ a edição do RNA,⁽²⁸⁾ e silenciamento gênico mediado por microRNAs (miRNAs).⁽³⁰⁾

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante, em geral contendo 21 a 25 nucleotídeos, que atuam como potentes reguladores da expressão gênica por meio de sua ligação aos RNAm no citoplasma das células, que leva à degradação destes ou repressão da tradução proteica, a depender do grau de complementaridade entre miRNA e RNAm.⁽³¹⁾ São conservados evolutivamente, ou

seja, a maioria dos vertebrados compartilham os mesmos miRNAs e seus alvos podem ser um ou mais RNAm.⁽³²⁾

A biogênese dessas moléculas pode acontecer por ao menos três vias principais,⁽³³⁾ porém a mais comum é conhecida como via canônica. No núcleo celular, a enzima RNA polimerase II (pol II) produz um longo transcrito inicial, chamado de miRNA primário (pri-miRNA). Por meio da poliadenilação da região 3' e da inserção de um nucleotídeo modificado na região 5', chamado de 5' CAP, esses transcritos ficam protegidos da ação de ribonucleases e formam uma estrutura secundária estável em forma de grampo (*hairpin*).^(31,34) Os pri-miRNAs são então clivados pelo complexo microprocessador formado pela enzima do tipo ribonuclease III Drosha e seu cofator, a proteína de ligação de RNA DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGRC8), gerando as moléculas precursoras de miRNAs (pre-miRNAs).^(33,35)

Em seguida, os pre-miRNAs são transportados, pela ação das proteínas exportina-5 e Ran-GTP, do núcleo para o citoplasma, onde serão processados pela enzima Dicer, a qual cliva o pre-miRNA gerando um miRNA de fita dupla.^(33,34) O miRNA duplex se associa ao chamado complexo silenciador induzido por RNA (RISC), o qual é formado por proteínas argonautas e chaperonas moleculares.⁽³²⁾ A proteína AGO2 é o componente do complexo RISC responsável por separar o duplex e, dessa forma, uma das fitas, chamada de fita passageira, é degradada enquanto a outra fita (fita guia), correspondente ao miRNA maduro, irá permanecer incorporada ao complexo RISC (miRISC), conforme ilustrado na Figura 1.^(32,34,36) O miRISC irá atuar como uma sonda procurando sequências complementares nos RNAm alvos, afim de interagir e reprimir a síntese proteica, seja por meio da repressão da tradução quanto pela desestabilização do mRNA.^(32,34)

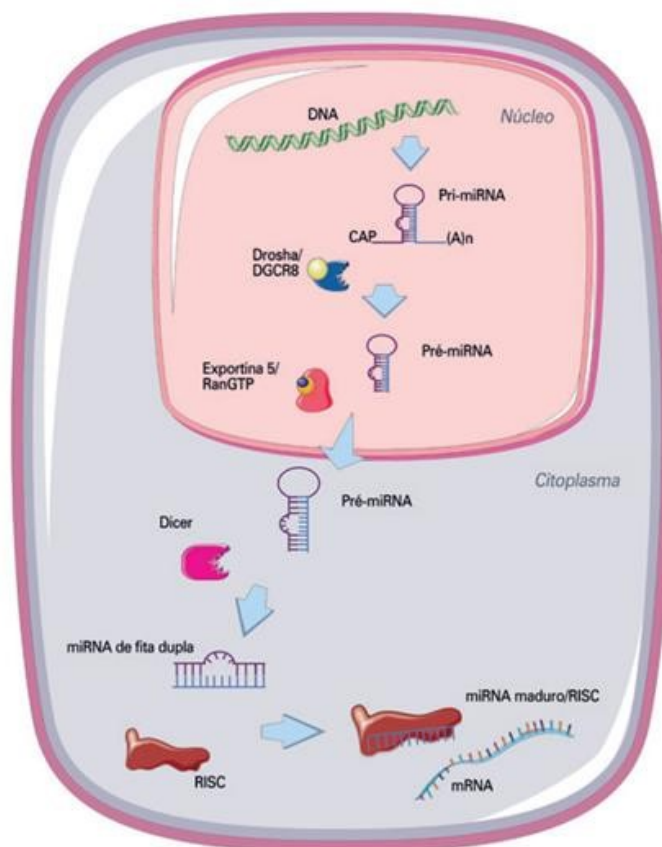


Figura 1. Biogênese dos miRNAs

Fonte: Jorge *et al.**

Os miRNAs são cruciais para o controle da expressão de genes durante processos apoptóticos e inflamatórios, desempenhando um papel significativo em distúrbios associados à SD. Estas pequenas moléculas de RNA ao afetar a expressão gênica podem controlar a apoptose, inibindo ou promovendo a morte celular (37).

Exemplos clássicos desse controle são observados em células cancerígenas. Em células primárias de mieloma múltiplo, a expressão aumentada do miR-637 pode ativar a via apoptótica ao se ligar com seu gene-alvo *NUPRI* (Proteína Nuclear 1) e suprimir a proliferação celular.⁽³⁸⁾ Em células de câncer de mama, que apresentam expressão reduzida do miR-148a e expressão aumentada do gene *BCL2* (Linfoma de Células B2),

* Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira ES, Menon ETN, Diniz SN, *et al.* MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *einstein* (São Paulo) 2021;19:1-7. DOI: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996.

o qual possui um importante papel anti-apoptótico, o reestabelecimento da expressão do miR-148a, em cultivo celular, diminuiu expressão de *BCL2*, e resultou em redução da proliferação celular e aumento da apoptose.⁽³⁹⁾

Por outro lado, Li *et al.*⁽⁴⁰⁾ analisaram a relação entre o microRNA miR-378, sobrevivência celular e apoptose em miócitos. Seus resultados sugeriram que a expressão aumentada de miR-378 em miócitos suprimiu a expressão tanto de CASP9, uma das caspases iniciadoras da cascata intrínseca de apoptose, resultando no aumento do limiar de ativação da via intrínseca de apoptose aumentasse, e da proteína PFK1 (Fosfofrutoquinase 1), principal ponto de regulação da glicólise, o que promoveu a eliminação de mitocôndrias disfuncionais ou danificadas por meio de autofagia

Em relação à atuação dos microRNAs na processos inflamatórios, o miR-10a desempenha um papel crucial no controle da inflamação em rins diabéticos, uma vez que funciona como regulador negativo do gene *NLRP3* (Proteína 3 que contém o domínio de pirina da família NLR), diminuindo a ativação do inflamassoma NLRP3, o qual é responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias.^(41,42) Também foi demonstrado, em ratos com acidente vascular cerebral isquêmico, que o miR-146a-5p possui efeito neuroprotetor, visto que inibe a ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa B), mediada pela via de sinalização IRAK1/TRAF6, o que contribui para a redução da neuroinflamação.⁽⁴³⁾ A família de fatores de transcrição do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) possui um papel fundamental no contexto das respostas imune e inflamatórias, uma vez que os genes dessa família codificam proteínas citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.⁽⁴⁴⁾ O miR-130a possui intensa capacidade pró-inflamatória, na medida em que o aumento de sua expressão promove o aumento dos níveis de fatores de inflamação como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18, além de reduzir a expressão de PPAR γ (proliferador

de peroxissoma tipo gama) e elevar a expressão de NF- κ B.⁽⁴⁵⁾ A via de sinalização inflamatória de NF- κ B também pode ser estimulada pelo miR-210-3p, que se liga e silencia a expressão do Supressor de Sinalização de Citocinas 1 (SOCS1), regulador negativo da via NF- κ B.⁽⁴⁶⁾

Recentemente, os miRNAs são alvos de estudo na SD, devido ao reconhecimento do potencial terapêutico dessas moléculas. Morsiani *et al.*⁽⁴⁷⁾ identificaram miRNAs circulantes na corrente sanguínea em indivíduos com SD com 31 ± 2 anos em comparação aos indivíduos SD com 66 ± 2 anos de idade. De acordo com este estudo, a presença dos miRNAs miR-628-5p, miR-152-3p, miR-28-5p e let-7d-5p nessa população representa assinatura biológica para detecção do envelhecimento precoce, antes dos 50 anos. Expressão diferencial de miRNAs no Sistema Nervoso Central (SNC) de indivíduos com T21 também pode ser encontrada, como mostra estudo de Pérez-Villareal *et al.*,⁽⁴⁸⁾ que observaram a expressão aumentada do miR-let-7c bem como uma relação inversa entre a expressão do miR-155 e níveis de colesterol HDL, o que pode ter um papel crucial na homeostase de moléculas relacionadas a função cognitiva e ao desenvolvimento precoce da DA, uma vez que a dislipidemia tem sido associada ao comprometimento cognitivo⁽⁴⁹⁾.

Os miRNAs também podem apresentar diferenças na expressão entre suas formas pré e pós transcricionais, como demonstrado no estudo de Vizitiu *et al.*⁽⁵⁰⁾ Após coleta de fluido amniótico e confirmação da T21, foi avaliado, por PCR em tempo real quantitativo (PCRq), os níveis de expressão das formas madura e dos precursores pri-miRNA de miRNAs presentes no cromossomo 21. Essa análise mostrou que o miR-99a maduro apresentou expressão elevada enquanto a sua forma precursora pri-miR-99a se manteve inalterada. Esses autores também demonstraram na SD uma associação entre o

aumento da expressão da forma madura de miR-99a com a presença de defeitos cardíacos fetais.⁽⁵¹⁾

Nosso grupo de pesquisa identificou em crianças com T21 expressão alterada de miRNAs, que têm como alvos genes envolvidos em disfunções imunológicas⁽⁵¹⁾. Nesse estudo o perfil de expressão de miRNAs foi investigado em PMBC de seis crianças com T21 e seis crianças controles por meio de PCRq em placas de *array*. Dentre 754 miRNAs analisados, foram encontrados quatro miRNAs (miR-378a-3p, miR-130b-5p, miR-942-5p e miR-424-3p) com expressão aumentada e dois miRNAs com expressão reduzida (miR-452-5p e miR-668-3p) nas crianças com T21. Esses miRNAs têm como alvos genes da família dos receptores Toll-Like e integrantes da via de sinalização do fator de crescimento β , entre outros, o que sugere que a expressão alterada desses miRNAs favorece o quadro de disfunções inflamatórias e imunológicas presente em indivíduos com T21.⁽⁵¹⁾

No presente trabalho, os genes *IKBKB*, envolvido na resposta imune⁽⁴⁴⁾, e o *BCL2*, que tem função anti-apoptótica⁽³⁹⁾ com importância na sobrevivência celular, foram investigados, pois apresentaram expressão diminuída em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa. Além disso, os microRNAs miR-942-5p e miR-378a-3p, que apresentaram interação in silico com esses genes, também foram avaliados in vitro.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de genes e proteínas, envolvidos em processos inflamatórios e apoptóticos, em tecidos trissômicos para o cromossomo 21 e comparar com tecidos euploides, por meio de ensaios funcionais com miRNAs.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar *in vitro* a regulação de *IKBKB* e *BCL2* pelos microRNAs miR-942-5p e miR-378a-3p em fibroblastos dissômicos e trissômicos para o cromossomo 21;
2. Analisar *in silico* o padrão de expressão dos genes apoptóticos *BCL2*, *BAX*, *BBC3* e *CASP7* em amostras de cérebro pós-morte de indivíduos com SD, por meio de ferramentas de bioinformática.

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

2.1 Cultura dos fibroblastos dissômicos e trissômicos

Fibroblastos trissômicos e dissômicos foram provenientes de linhagens primárias de amostras de líquido amniótico (idade gestacional: - semanas e – semanas, respectivamente). Para o cultivo dos fibroblastos dissômicos e trissômicos, foi adicionado meio de crescimento DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle media*), com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico e 1% de antimicótico em garrafas de 75 cm². A cada três dias, ou com maior frequência, dependendo do crescimento celular, o meio de cultura das garrafas, que estavam mantidas a 37°C e 5% de CO₂ foi substituído. A contagem das células em cultura foi feita diariamente em microscópio invertido e os testes de transfecção foram realizados sempre que as células atingiram 70% de confluência ou a concentração necessária (1×10^6 por poço).

2.2 Ensaios de Transfecção

A técnica de transfecção indireta foi utilizada para transfectar os miRNAs hsa-miR-942-5p e hsa-miR-378a-3p. Para estes ensaios, foram utilizados miRNAs miméticos, para aumentar a expressão dos miRNAs, e miRNAs inibidores que diminuem a expressão dos miRNAs, O Quadro 1 apresenta os miRNAs utilizados nos ensaios:

Quadro 1. Dados dos miRNAs miméticos e inibidores, utilizados nos ensaios de transfecção.

MiRNA	Código	Empresa
miR-942-5p <i>mimic</i>	4464084	Ambion-Thermoscientific
miR-378a-3p <i>mimic</i>	4464066	Ambion-Thermoscientific
Controle negativo <i>mimic</i>	4464078	Ambion-Thermoscientific

Controle positivo miR-1 <i>mimic</i>	4464064	Ambion-Thermoscientific
miR-942-5p inibidor	4464084	Ambion-Thermoscientific
miR-378a-3p inibidor	4464084	Ambion-Thermoscientific
Controle negativo inibidor	4464076	Ambion-Thermoscientific
Controle positivo miR-1 inibidor	4464081	Ambion-Thermoscientific

As soluções *stock* dos miRNAs *mimics* e do controle negativo *mimic* foram diluídas em 164 uL de água, fornecida pelo kit, na concentração final de 30 pmol/uL. As soluções *stock* dos miRNAs inibidores e do controle negativo inibidor foram ressuspendidas em 164 uL de água, fornecida pelo kit, na concentração final de 20 pmol/uL. Após a diluição, um teste de concentração dos miRNAs miméticos e inibidores foi realizado em cultura de fibroblastos, com os controles positivos miR-1 *mimic* e inibidor, nas concentrações de 6, 12 e 24 pmol por cada amostra transfectada. A concentração de 12 pmol foi selecionada para os ensaios.

No dia anterior à transfecção, as células foram semeadas para obtenção de adesão aos poços da placa. Cerca de 0,5 a 2×10^5 células foram distribuídas por poço, a fim de se obter uma confluência de 60-80% no momento da transfecção. O meio de cultura utilizado foi o DMEM (600 uL/poço), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, sem antibiótico/antimicótico. As placas foram incubadas a 37°C, com CO₂ 5%, por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi descartado e as células foram diluídas em 496 uL de meio DMEM, suplementado com SFB 10%.

Para realizar a transfecção foi preparada uma solução contendo meio Optimen (200uL), miRNA *mimic*/inibidor (2uM) e lipofectamina (2uL), que foi mantida em repouso por 15 minutos. Após, foram distribuídos 104 uL dessa solução em seus respectivos poços da placa de cultura, que foi incubada a 37°C, com 5% de CO₂ por 48

horas. Após esse período, as células foram tripsinizadas e transferidas com meio DMEM para tubos de 1,5 mL para posterior extração de RNA e proteínas.

Todas as análises funcionais dos miRNAs em fibroblastos dissômicos e trissômicos foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas, conforme Figura 2.

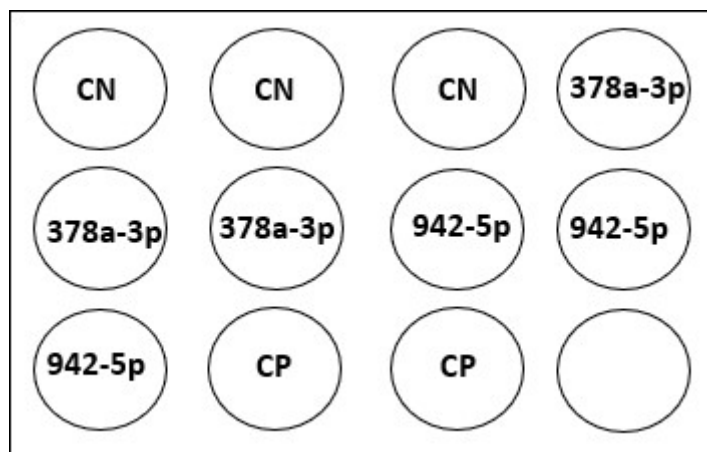


Figura 2. Desenho da placa para cultivo dos fibroblastos após a transfecção. Contendo controle negativo (CN), controle positivo (CP), mimic/inibidor miR-378a-3p e miR-942.

2.3 Extração de RNA e Proteínas

O tubo contendo as células foi centrifugado a 450 rcf por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas, por 5 minutos em 250 µL de *Trizol Reagent (Ambion)*. Em seguida, adicionou-se 50 µL de clorofórmio e, após rápida agitação e incubação por 5 minutos, o tubo foi centrifugado a 12000 rcf por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo para continuidade da extração de RNA, enquanto o *pellet* foi armazenado para posterior extração de proteínas.

Para a extração de RNA, foram adicionados ao sobrenadante 250 µL de isopropanol. Após incubação, por 10 minutos a temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 12000 rcf por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e 500 µL de etanol 75% com água DEPEC foram adicionados ao *pellet*. Em seguida, após breve

agitação, o tubo foi centrifugado a 7500 ref por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA total, após secagem em temperatura ambiente, foi ressuscitado em 40 µL de água DEPEC e incubado por 10 minutos em banho seco a 55°C para eluição. As amostras de RNA foram quantificadas por meio do espectofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), em comprimento de onda de 260 nm, e armazenadas em freezer -80°C.

Para a extração de proteínas, foram adicionados 1,2 mL de acetona gelada ao *pellet* armazenado anteriormente. Na sequência, o tubo foi homogeneizado, incubado a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado a 1500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 400 µL de etanol absoluto gelado. Após centrifugação, por 1500 g por 1 minuto, o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* de proteínas foi ressuscitado em 100 µL solução de *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) 1%. As amostras de proteínas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior quantificação, que foi realizada utilizando o equipamento Multiskan FC (Thermo Scientific™), com Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™), seguindo as instruções do fabricante.

2.4 Quantificação da expressão dos genes *IKBKB* e *BCL2*

Primeiramente foi realizada a síntese de cDNA, por meio da reação em cadeia da polimerase reversa (RT-PCR), usando o kit Applied Biosystems® High-Capacity cDNA Reverse Transcription. Para tanto, em uma reação de 20 µL, utilizou-se 1 µg de RNA total, 0,8 µL desoxinucleotídeos trifosfatados (25XdNTP) a 10 mM 1X, 2,0 µL de RT random primers 10X, 2 µL de tampão 10X, 1 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase e

6,2 µL de água livre de RNase. A reação foi submetida a três temperaturas diferentes em um termociclador: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 80°C por cinco minutos.

A expressão dos genes *IKBKB* (*Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta*) e *BCL2* (*B-Cell Lymphoma 2*) foram analisadas usando sondas TaqMan contendo fluoróforo FAM (Applied Biosystems®). Como genes de referências, foram utilizados GAPDH e RPLPO (Quadro 2). Para realizar a reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) em tempo real foram realizadas reações com 10 µL de *Applied Biosystems™ Fast Advanced Master Mix*, 1 µL da sonda específica para cada gene, 7 µL de água livre de RNase e 2 µL do produto da RT-PCR. Utilizando o termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems®), reações de PCRq em triplicata foram realizadas em placas de 96 poços. A etapa de pré-amplificação consistiu em 2 minutos a 50°C e 20 segundos a 95°C, seguidos por 45 ciclos de um segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C. O Quadro 2 apresenta as referências dos genes utilizados nos ensaios.

Quadro 2. Dados dos genes utilizados nos ensaios de expressão gênica.

Genes	Código do produto
<i>IKBKB</i>	TaqMan [®] Assay ID. Hs01559469_m1
<i>BCL2</i>	TaqMan [®] Assay ID. Hs00608023_m1
<i>GAPDH</i>	TaqMan [®] 4333764
<i>RPLPO</i>	TaqMan [®] 4326314

2.5 Quantificação da expressão proteica de IKBKB e BCL2

Para realização da análise da expressão proteica de IKBKB e BCL2 foi realizada a técnica de *Western Blotting*, padronizada por meio de teste de concentração proteica com anticorpo primário contra a proteína beta-actina, controle positivo da expressão. Primeiramente, 30ug de proteína total foram homogeneizados em *Novex Bolt LDS Sample Buffer 1x (Novex®)* e *Novex Bolt Sample Reducing Agent 1X (Novex®)*. Após a homogeneização, as amostras foram levadas ao termociclador por 10 minutos a 95°C, para desnaturação proteica. Em seguida, as amostras foram aplicadas no *Novex Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gel, 10 Wells (Novex®)* e submetidas à um campo elétrico em tampão *Novex Bolt MES SDS Running Buffer (Novex®)* por 180 minutos a 100V e 100mA. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada a 20 Volts por 7 minutos, utilizando o *Novex iBlot Gel Transfer Regular Stacks Nitrocellulose (Novex®)* e o dispositivo de transferência *iBlot (Invitrogen)*.

Em seguida, 50 mililitros de TBS-T 0.1% foram diluídos com 2.5% de leite desnatado e essa solução foi usada para bloquear as membranas (tampão de bloqueio). O bloqueio foi realizado com agitação gradual e contínua por uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi então tratada com anticorpos primários contra beta-actina em uma concentração de 1:5.000 por mais 5 minutos a 4°C.

Depois desse período de incubação, a membrana foi lavada por três vezes a cada 10 minutos, com TBS-T 0,1%. Em seguida, foi incubada com anticorpo secundário *Anti-mouse IgG, peroxidase Antibody* na diluição de 1:50000 por 1 hora. A detecção das proteínas foi realizada por meio do substrato quimioluminescente ECL *Select* (GE Healthcare), por meio da exposição da membrana à quimioluminescência no fotodocumentador (Vilber), onde também foram realizadas as fotografias.

O volume e a concentração da proteína beta-actina foram ajustados após o resultado do teste de concentração de proteína, que mostrou variações na intensidade da banda correspondente à proteína. A mesma metodologia usada para a medição da beta-actina foi então aplicada às proteínas alvo. O Quadro 3 lista os anticorpos que foram utilizados para identificar as proteínas de interesse usando *Western blotting*.

Quadro 3. Dados dos anticorpos utilizados na técnica de *Western blotting*.

Proteína	Código	Diluição	Empresa
IKBKB (IKK-Beta)	PA5-81927	1:10.000	Invitrogen
BCL2 (B-Cell Lymphoma 2)	13-8800	1:1.000	Invitrogen
Beta-actina	A1978	1:5.000	Sigma-Aldrich
Secundário Anti-Mouse	76085	1:50.000	Sigma-Aldrich
Secundário Anti-Rabbit	18772	1:50.000	Sigma-Aldrich

2.6 Análise Estatística

Os dados de expressão dos genes *IKBKB* e *BCL2* entre os grupos caso e controle foram comparados utilizando a técnica comparativa de *Threshold* Cíclico (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems®) utilizado nesta investigação foi fabricado com instruções para detecção de expressão de genes ou miRNAs que indicam que um valor de Ct de 37 deve ser usado como referência. Consequentemente, apenas

amostras que tiveram valores de Ct inferiores a 37 foram consideradas expressas. As amostras excluídas apresentaram valores de Ct maiores que 0,5 entre réplicas técnicas, ou valores fora do desvio padrão previsto. Valores de Ct que não se encontravam no interior dos 80% da massa de dados para cada grupo foram eliminados e considerados *outliers* para criar uma distribuição normal dos dados.

A média aritmética dos valores de Ct das réplicas técnicas para os genes de referência de cada amostra e para os genes e miRNAs alvos em investigação foi utilizada para calcular a quantificação relativa (RQ) utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados de RQ do grupo caso são apresentados em relação ao grupo controle, onde o RQ é definido como 1, uma vez que o grupo controle serviu como calibrador.⁽⁵²⁾

O software utilizado para realizar a análise estatística foi o *GraphPad Prism v.9*. Foi aplicado o teste de normalidade de *Anderson Darling* aos valores de RQ e para as comparações entre grupos controle e caso foram utilizados os testes de *Wilcoxon Signed Rank Test* e teste T de *Student*, com $\alpha=0,05$.

2.7 Mineração de dados

Para realização da análise de bioinformática, primeiramente foi realizada uma busca no site *GEO DataSets* com os termos “*Down Syndrome*” and “*Gene expression analysis*”, no qual foi identificado o estudo de Olmos-Serrano *et al.*,⁽⁵³⁾ intitulado “*Longitudinal Gene Expression Analysis in Human Brain identifies biological processes underlying neuropathology in Down Syndrome*”, que é um experimento de *microarray* de DNA de acesso livre cujo código de registro no banco de dados GEO é GSE59630. O *Gene Expression Omnibus* (GEO), do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi utilizado para obter dados brutos de expressão gênica da série GSE59630 para amostras de SD e sem a síndrome (controle). Os dados foram analisados pelo

GEO2R. Primeiro, foram selecionados os genes da via apoptótica intrínseca (rede N00098, Figura 3), de acordo com o Banco de Dados de Pathway *KEGG*, e que haviam sido atribuídos à seção Gene Entrez do banco de dados NCBI para as análises conduzidas na pesquisa atual (Quadro 4). Foram utilizados os valores de expressão do experimento GSE59630 que se apresentavam em escala de $\log_2$ (*log fold change* ou $\log FC$). Os genes apoptóticos selecionados com valores de $\log FC \leq -0,59$ e $\log FC \geq 0,59$ e valores de $p < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos. Assim, considerou-se genes de expressão aumentada aqueles com valores de $\log FC \geq 0,59$ e genes de expressão diminuída aqueles com valores de $\log FC \leq -0,59$.

|



Figura 3. Via de apoptose em humanos, de acordo com o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Em destaque, a via de apoptose intrínseca (rede N000098).

Quadro 4. Dados dos genes apoptóticos selecionados para análise da expressão em cérebros de indivíduos com SD.

Gene	Gene ID	Locus	Gene Name
<i>BCL2</i>	596	18q21.33	B-Cell lymphoma 2
<i>BAX</i>	581	19q13.33	BCL2 associated X, apoptosis regulator
<i>BBC3</i>	27113	19q13.32	BCL2 binding componente 3
<i>CASP7</i>	840	10q25.3	Caspase 7

Fonte: National Center for Biotechnology Information[†]

O experimento de microarray selecionado para o presente estudo incluiu dados de expressão gênica de mais de 17.500 sondas de 58 amostras de cérebro *post-mortem* de indivíduos com SD (33 do sexo masculino e 25 do sexo feminino) e 58 amostras controles euploides (33 do sexo masculino e 25 do sexo feminino), conforme declarado no material submetido ao banco de dados GEO. Essas amostras foram classificadas por idade, sexo e pelas seguintes áreas do cérebro: córtex cerebelar (CBC), córtex pré-frontal dorsolateral (DFC), hipocampo (HIP), córtex parietal inferior (IPC), córtex temporal inferior (ITC), córtex pré-frontal medial (MFC), córtex pré-frontal orbital (OFC), córtex somatossensorial primário (S1C), córtex visual primário (V1C), córtex temporal superior (STC) e córtex pré-frontal ventrolateral (VFC).

2.8 Análise pelo String-db

Para criar uma rede de interação proteína-proteína (PPI) contendo os genes apoptóticos selecionados, foi utilizada a plataforma de acesso livre *STRING*[‡], um algoritmo de integração de rede de associação múltipla em tempo real para prever a função dos genes que utiliza uma vasta quantidade de dados de associação funcional.⁽⁵⁴⁾

[†] National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Library of Medicine; 2024 [acesso em 31 mar. 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[‡] STRING [Internet]. Search; 2024 [acesso em 30 mar. 2023]. Disponível em: <https://string-db.org/>

2.9 Análise pelo Metascape

A análise analítica *on-line* usada para enriquecimento funcional, ou seja, análise de conexão de enriquecimento entre os genes (interactoma) e de anotação de genes específicos⁽⁵⁵⁾ foi realizada utilizando a ferramenta *Metascape*, da base de dados *OMICS*[§].

[§] Metascape [Internet]. A Gene Annotation & Analysis Resource; 2024 [acesso em 15 abr. 2023]. Disponível em: <https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Análise da expressão gênica relativa

A expressão relativa do gene *IKBKB* em fibroblastos dissômicos, após a transfecção com o miR-942-5p *mimic*, mostrou-se reduzida em comparação aos fibroblastos dissômicos transfectados com o controle negativo (RQ=0,49). Por outro lado, a transfecção das células dissômicas com miR-942-5p inibidor, aumentou a expressão relativa do gene *IKBKB* (RQ=1,68) em relação ao controle negativo. O mesmo foi observado nos fibroblastos trissômicos; após a transfecção com o miR-942-5p *mimic*, o gene *IKBKB* apresentou expressão relativa diminuída (RQ=0,65) em relação ao controle negativo, enquanto sua expressão aumentou após a transfecção com o inibidor miR-942-5p (RQ=1,44), conforme pode ser observado no Quadro 5 e na Figura 4.

Quadro 5. Valores de RQ médio da expressão relativa de *IKBKB* em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-942-5p *mimic* e inibidor 942-5p.

<i>IKBKB</i>		
	Fibroblastos Dissômicos	Fibroblastos Trissômicos
942-5p <i>mimic</i>	0,49*	0,65*
inibidor 942-5p	1,68*	1,44*

*valores de p significante

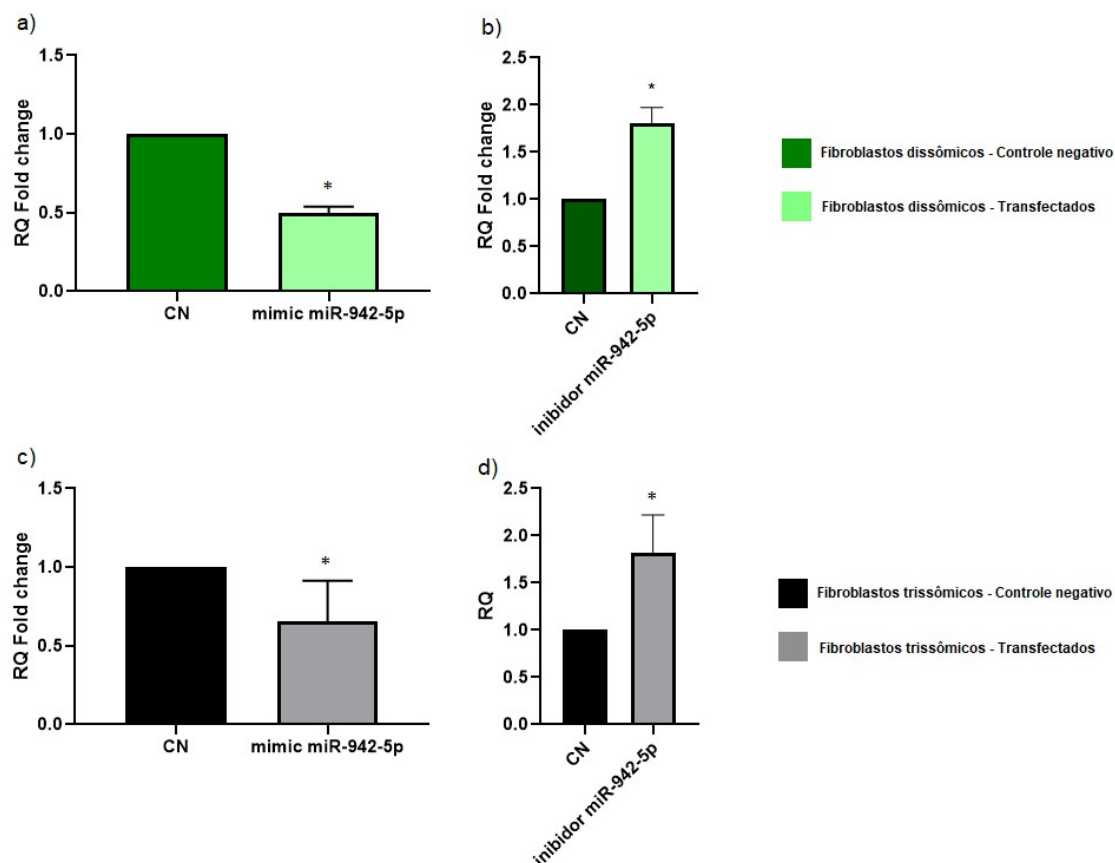


Figura 4. a) Expressão do gene *IKBKB* em fibroblastos dissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic; b) Expressão do gene *IKBKB* em fibroblastos dissômicos, transfectados com inibidor miR-942-5p; c) Expressão do gene *IKBKB* em fibroblastos trissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic; d) Expressão do gene *IKBKB* em fibroblastos trissômicos, transfectados com inibidor miR-942-5p.

Para o gene *BCL2*, os experimentos de transfecção foram realizados com os *mimics* e inibidores dos miRNAs miR-378a-3p e miR-942-5p. Em fibroblastos dissômicos, o gene *BCL2* apresentou expressão reduzida quando comparado ao controle negativo (RQ=0,75) após transfecção com o miR-942-5p *mimic* e expressão aumentada após transfecção com o inibidor miR-942-5p (RQ=1,53). Em fibroblastos trissômicos as transfecções com o *mimic* e com o inibidor miR-942-5p resultaram em expressão reduzida do gene *BCL2* (RQ=0,36 e RQ=0,07, respectivamente), conforme mostram o Quadro 6 e a Figura 5.

Quadro 6. Valores de RQ médio da expressão relativa de *BCL2* em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic e inibidor 942-5p.

BCL2		
	Fibroblastos Dissômicos	Fibroblastos Trissômicos
942-5p mimic	0,75*	0,36*
inibidor 942-5p	1,53*	0,07*

*valores de p significante

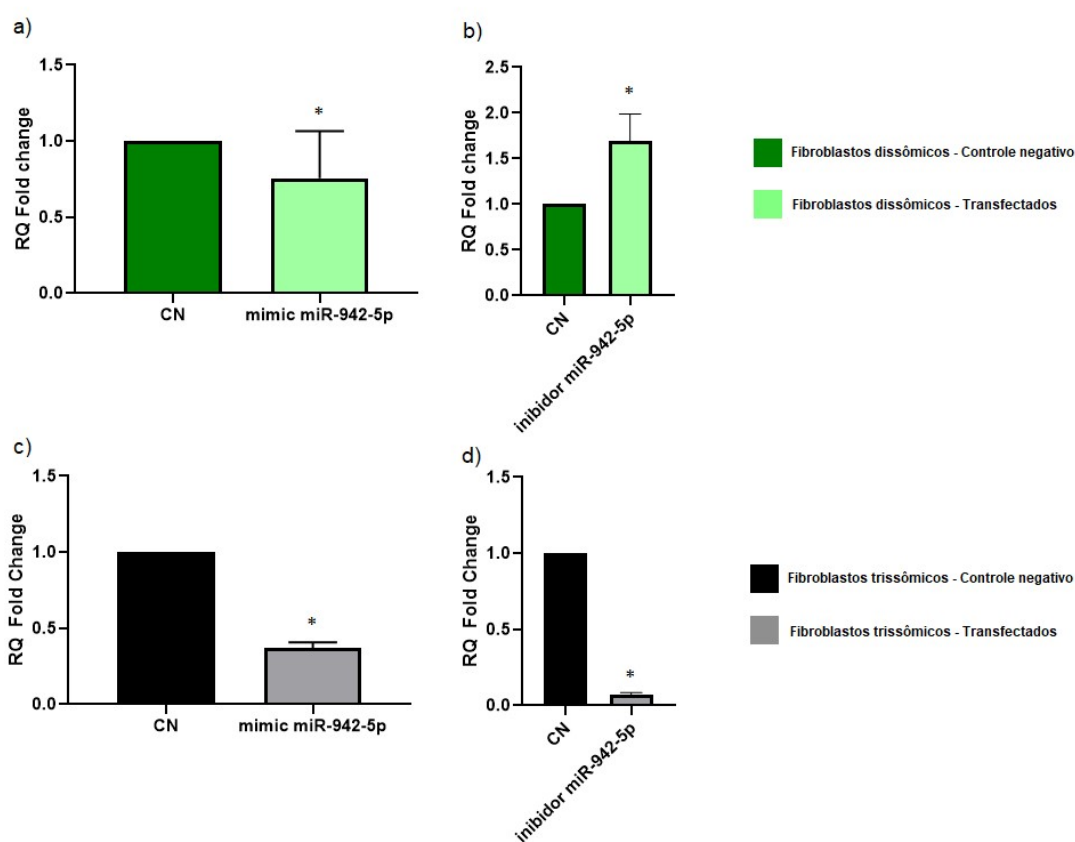


Figura 5. a) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos dissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic; b) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos dissômicos, transfectados com inibidor miR-942-5p; c) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos trissômicos, transfectados com miR-942-5p mimic; d) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos trissômicos, transfectados com inibidor miR-942-5p.

Em fibroblastos dissômicos, transfectados com o miR-378a-3p *mimic*, a expressão relativa do gene *BCL2* aumentou (RQ=2,33), mas não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (p=0,09). A transfecção com o inibidor miR-378a-3p, aumentou a expressão do gene *BCL2* em fibroblastos dissômicos (RQ=1,69). Em fibroblastos trissômicos as transfecções com o miR-378a-3p *mimic* e com o inibidor miR-378a-3p resultaram em expressão reduzida do gene *BCL2* (RQ=0,34; RQ=0,21, respectivamente).

Quadro 7. Valores de RQ médio da expressão relativa de *BCL2* em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-378a-3p *mimic* e inibidor 378a-3p

BCL2		
	Fibroblastos Dissômicos	Fibroblastos Trissômicos
mimic 378a-3p	2,33	0,34 *
inibidor 378a-3p	1,69 *	0,21 *

*valores de p significante

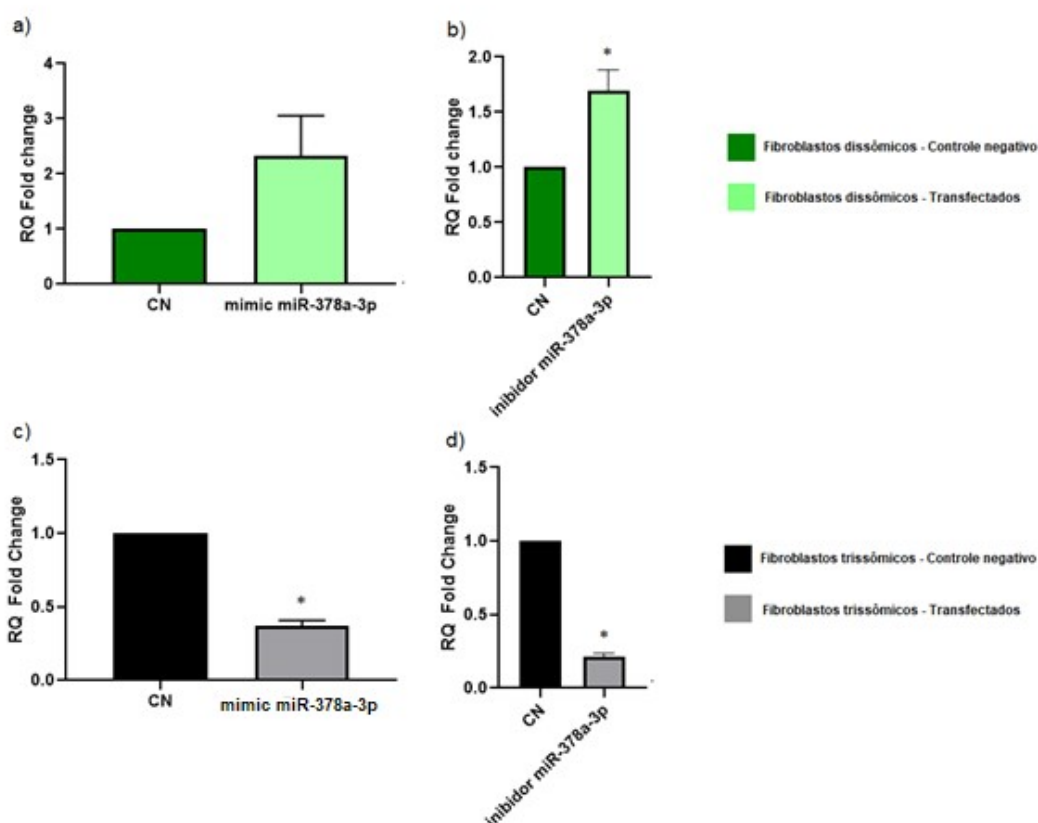


Figura 6. a) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos dissômicos, transfectados com miR-378a-3p mimic; b) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos, dissômicos transfectados com inibidor miR-378a-3p; c) Expressão do gene *BCL2*, em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-378a-3p mimic; d) Expressão do gene *BCL2* em fibroblastos trissômicos, transfectados com inibidor miR-378a-3p.

3.2 Análise da expressão proteica

A análise proteica, por *Western Blotting*, em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com o miR-942-5p *mimic*, mostrou que não houve alteração da expressão de IKBKB nessas células em relação ao controle negativo, como pode ser observado na Figura 7. Entretanto, foi observado que o nível de expressão proteica de IKBKB, após transfecção com o inibidor de mir-942-5p apresentou-se maior em fibroblastos dissômicos comparado ao controle negativo e, relativamente menor em fibroblastos trissômicos em relação ao controle negativo. (Figura 8)

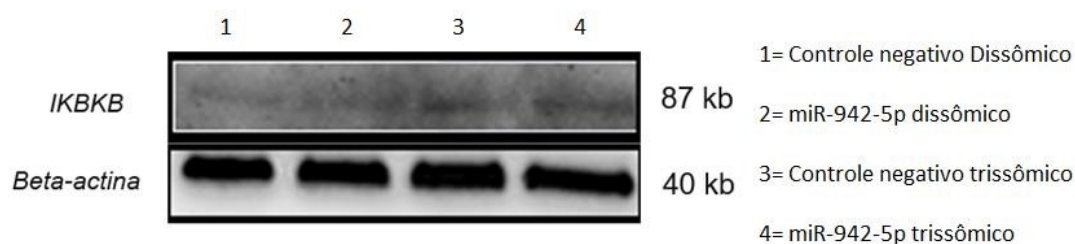


Figura 7. Análise da expressão proteica de IKBKB em fibroblastos transfectados com miR-942-5p mimic.

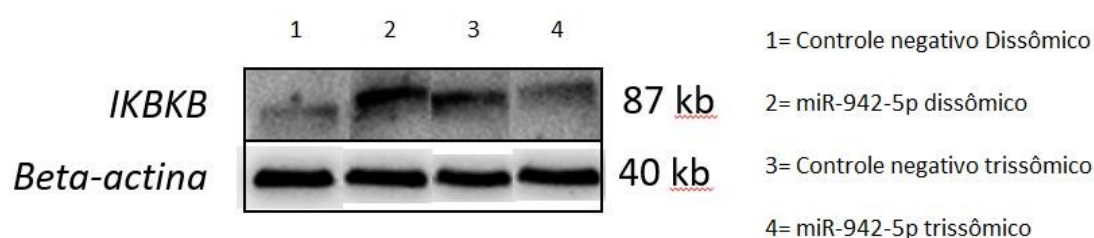


Figura 8. Análise da expressão proteica de IKBKB em fibroblastos transfectados com inibidor de miR-942-5p.

A expressão proteica de BCL2 em fibroblastos dissômicos e trissômicos, transfectados com miR-378a-3p e miR-942-5p *mimics*, não alterou em comparação aos controles negativos. (Figuras 9 e 10)

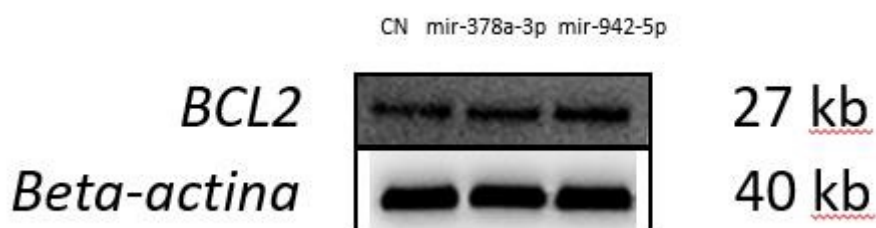


Figura 9. Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com miR-378a-3p e miR-942-5p mimics.

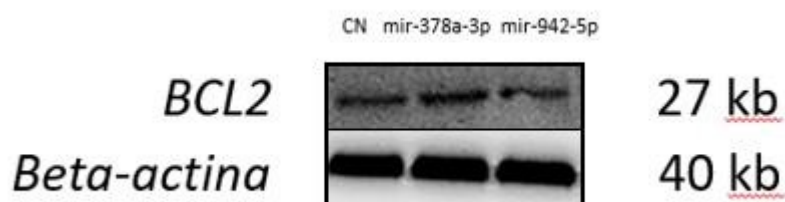


Figura 10. Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com miR-378a-3p mimic e miR-942-5p mimic.

A transfecção com o inibidor de miR-378a-3p aumentou a expressão de BCL2 tanto nos fibroblastos dissômicos quanto nos trissômicos, enquanto com o inibidor de miR-942-5p não resultou em alteração de expressão em ambos os tipos celulares. (Figuras 11 e 12)

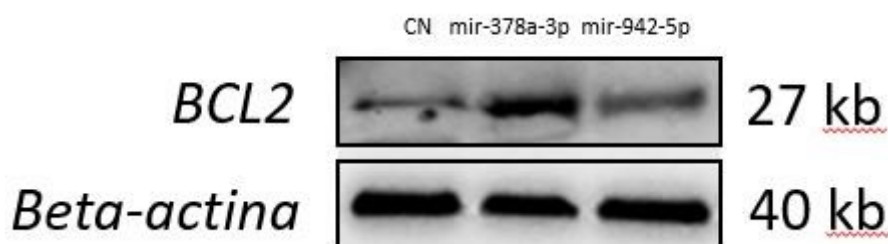


Figura 11. Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos dissômicos transfectados com inibidores de miR-378a-3p e miR-942-5p.

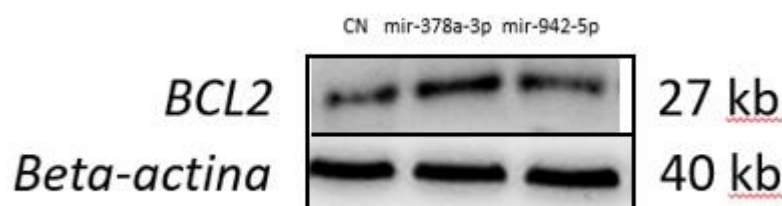


Figura 12. Análise da expressão proteica de BCL2 em fibroblastos trissômicos transfectados com inibidores de miR-378a-3p e miR-942-5p.

3.3 Análise de Bioinformática

Quatro genes (*BCL2*, *BAX*, *BBC3* e *CASP7*) apresentaram valores estatisticamente significante de log FC, compatível com os critérios de expressão diferencial utilizados no presente trabalho, nas amostras de cérebro SD em relação aos controles, em pelo menos uma das faixas etárias. O gene *BCL2* mostrou aumento significativo de expressão no período pré-natal (16-22 semanas de gestação) (logFC=1,16) e nas faixas etárias de 13-22 anos (logFC=0,71) e 30-39 anos (logFC=0,93). Aumento significativo de expressão também foi observado no período pré-natal (logFC=0,65) e no intervalo de idade entre 40-42 anos (logFC=0,67) para o gene *BBC3* e nas faixas etárias de 13-22 anos (logFC=0,66) e 40-42 anos (logFC=0,77) para o gene *CASP7*. Por outro lado, expressão significativamente diminuída foi observada para o gene *BAX* no intervalo de idade entre 30-39 anos (logFC=-1,10) (Quadro 8).

Quadro 8. Valores de log FC para os quatro genes apoptóticos diferencialmente expressos em diferentes faixas etárias no cérebro de indivíduos com SD.

Gene	16-22 SG	0-12 M	2-10 A	13-22 A	30-39 A	40-42 A
<i>BCL2</i>	1,16*	0,57	0,16	0,71*	0,93*	0,10
<i>BAX</i>	-0,33	-0,19	-0,35	-0,15	-1,10*	-0,10
<i>BBC3</i>	0,65*	0,31	0,25	0,43	0,58	0,67*
<i>CASP7</i>	0,45	-0,13	0,44	0,66*	0,50	0,77*

* |logFC|≥0,59 e p valor < 0,05; SG: semanas de gestação; M: meses; A: anos.

Embora os valores de p mostraram-se significantes na análise por faixas etárias (p<0,05), nenhum dos quatro genes apresentaram-se diferencialmente expressos nas amostras SD de cérebro total sem divisão por faixa etária, segundo o critério de corte que foi utilizado no presente estudo (Quadro 9).

Em relação à análise de expressão em diferentes estruturas anatômicas do cérebro apenas o gene *BCL2* apresentou expressão significativamente aumentada em VFC (logFC=0,74) (Quadro 9).

Quadro 9. Valores de log FC da expressão de quatro genes apoptóticos em múltiplas estruturas cerebrais de indivíduos com SD.

Gene	Gene ID	Cérebro total	HIP	CBC	DFC	OFC	V1C	VFC	ITC
BCL2	596	0,58	0,91	0,58	0,52	0,40	0,25	0,74*	0,62
BAX	581	-0,34	-0,48	-0,48	-0,41	-0,33	-0,20	-0,48	-0,52
BBC3	27113	0,40	0,47	0,23	0,55	0,33	0,48	0,44	0,51
CASP7	840	0,26	0,42	0,22	0,60	0,31	0,18	0,45	0,41

** $|\log FC| \geq 0,59$ e p valor $< 0,05$; CBC: Córtex cerebelar; DFC: Córtex pré-frontal dorsolateral; HIP: Hipocampo; IPC: Córtex parietal inferior; ITC: Córtex temporal inferior; MFC: Córtex pré-frontal medial; OFC: Córtex pré-frontal orbital; S1C: Córtex somatossensorial primário; V1C: Córtex visual primário; STC: Córtex temporal superior; VFC: Córtex pré-frontal ventrolateral.

Para analisar as interações proteicas entre os genes que apresentaram expressão diferencial em pelo menos uma faixa etária, utilizou-se o banco de dados String. A análise de interações proteicas revelou uma rede fundamental de proteínas envolvidas em processos biológicos essenciais. A Figura 13 ilustra a interconexão das quatro proteínas-chave: BCL2, BAX, BBC3 e CASP7. Cada nó representa uma proteína, enquanto as arestas indicam suas interações. Essas interações são fundamentais para entender os mecanismos moleculares subjacentes a eventos biológicos cruciais.

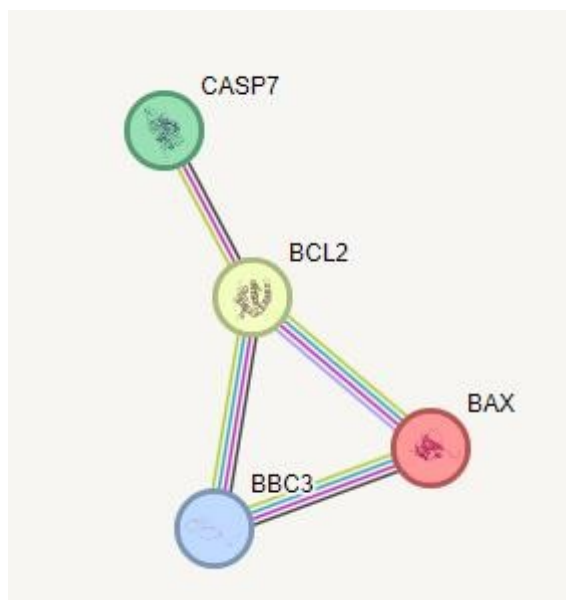


Figura 13. Rede de interação proteica gerada pelo website String-db.

A análise revelou quatro nós na rede, representando as quatro proteínas de interesse, e quatro arestas, indicando as interações entre elas. O escore mínimo de interação requerido foi de 0,700 (alta confiança) e o valor de p para enriquecimento da interação proteína-proteína (PPI) foi extraordinariamente baixo, com um valor de $2,2 \times 10^{-6}$, destacando a importância biológica dessas interações.

A Figura 14 apresenta o gráfico resultante na análise pelo *Metascape*, destacando os principais processos biológicos enriquecidos relacionados à rede de interações entre as proteínas BCL2, BAX, BBC3 e CASP7. Esses processos fornecem *insights* valiosos sobre os eventos celulares e moleculares que podem ser afetados por essa rede. As redes de termos enriquecidos são mostradas na Figura 15 e são coloridas por ID de cluster. Nós com o mesmo ID de *cluster* geralmente são adjacentes uns aos outros.

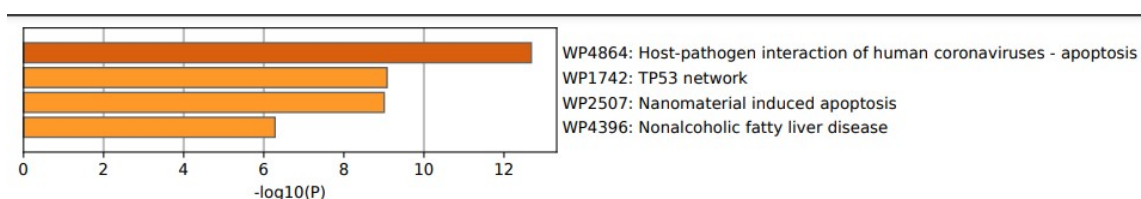


Figura 14. Gráfico de barras de termos enriquecidos após a lista dos genes ser incluída, coloridos por valores de p.

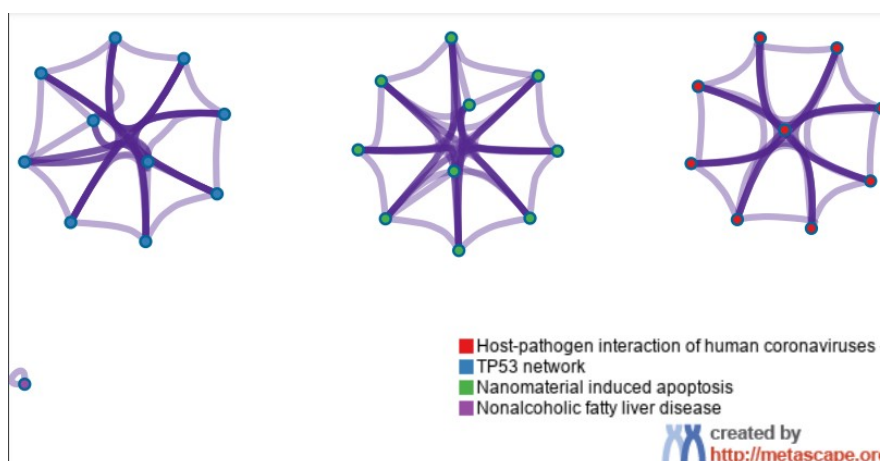


Figura 15. Rede de interação de termos enriquecidos colorida por ID de cluster - nós com o mesmo ID de cluster estão frequentemente próximos uns aos outros.

Os processos biológicos mais fortemente enriquecidos encontrados no *Metascape* incluem: interação hospedeiro-patógeno de coronavírus humanos - apoptose, rede *TP53*, apoptose induzida por nanomateriais e doença hepática gordurosa não alcoólica. Os componentes da rede densamente ligados foram identificados usando a técnica de Detecção de Complexo Molecular (MCODE). A Figura 16 exibe as redes MCODE para BCL2, BAX, CASP7 e BBC3.

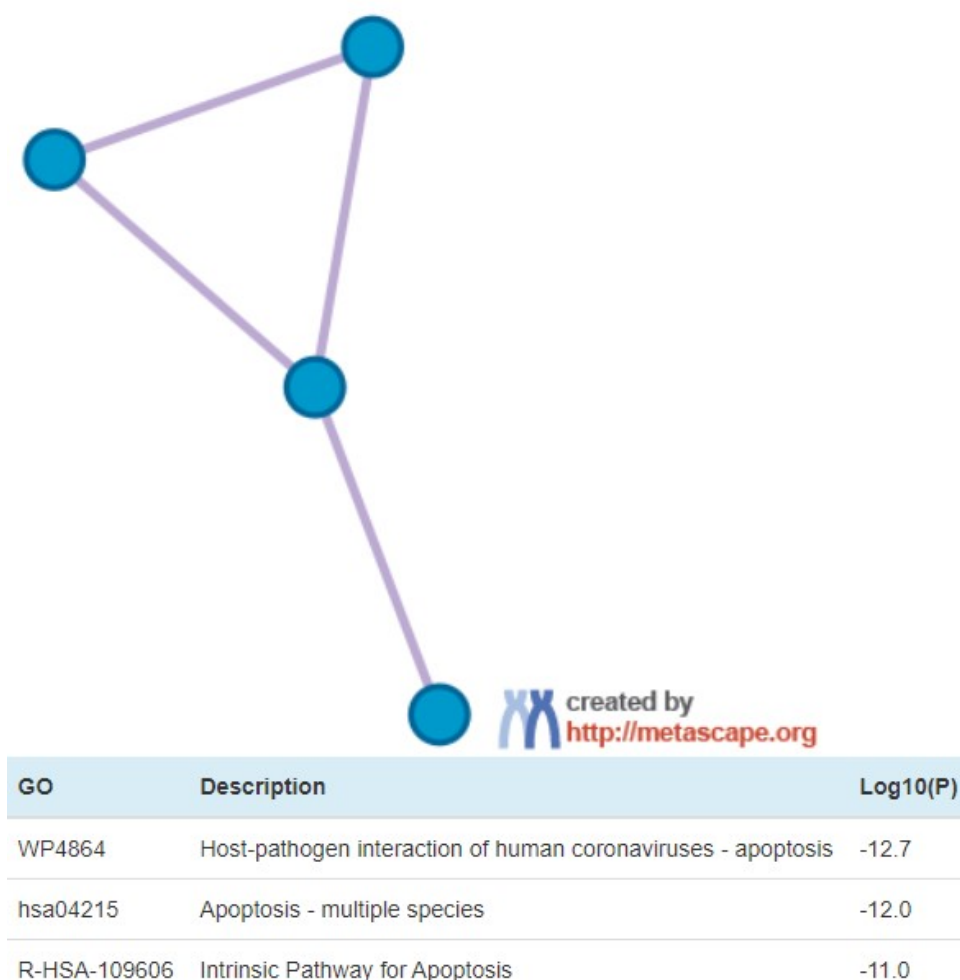


Figura 16. Redes de interação proteína-proteína e componentes MCODE identificados para os genes selecionados.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Considerando que a T21 causa uma sobrecarga de material genético resultando em expressão diferencial de genes, não localizados no cromossomo 21, com consequente alterações em múltiplas vias moleculares de sinalização que impacta nos fenótipos da SD⁽²⁴⁾, no presente estudo avaliamos a regulação dos microRNAs miR-942-5p e miR-378a-3p nos genes *IKBKB* e *BCL2*, envolvidos em processos imunológicos, que se mostraram com expressão alterada em indivíduos com SD em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa^(26, 27, 51) e também analisamos, computacionalmente, dados de microarray provenientes de amostras de cérebro SD e controle disponíveis em banco de dados público.

Os genes *IKBKB* e *BCL2*, que apresentaram expressão diminuída, e os miRNAs miR-942-5p e miR-378a-3p, que se mostraram com expressão aumentada, em PBMC de seis crianças SD nos estudos citados acima^(26, 27, 51), podem contribuir com patologias presentes na SD. A proteína codificada pelo gene *IKBKB*, ao fosforilar o inibidor de NF-κB, ativa esse fator de transcrição que subsequentemente induz a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias⁽⁵⁶⁾; adicionalmente, atua na ativação, diferenciação e proliferação de células T^(57,58), processos envolvidos na resposta imune que é prejudicada na SD. O gene *BCL2*, possui atividade chave na regulação da apoptose e a desregulação de sua expressão pode contribuir com o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, cuja manifestação é precoce nas pessoas com SD⁽⁵⁹⁾.

Em fibroblastos dissômicos observamos, no presente estudo, uma redução na expressão relativa do gene *IKBKB*, após transfecção com o miR-942-5p *mimic*, e um aumento na expressão do gene nas células transfectadas com o inibidor correspondente. Esses resultados são congruentes com a função esperada dos miRNAs, onde o *mimic*

inibe a expressão do gene-alvo e o inibidor aumenta sua expressão⁽⁶⁰⁾. Em fibroblastos trissômicos, após transfecção com miR-942-5p *mimic* e inibidor, a expressão relativa do gene *IKBKB* também diminuiu e aumentou, respectivamente.

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa⁽⁶¹⁾ foi observada a redução da expressão do gene *IKBKB* em células dissômicas provenientes de linfócitos T (linhagem Jurkat), transfectadas com o miR-942-5p *mimic*, em comparação com as células transfectadas com o controle negativo, o que sugere que independentemente do tipo celular, o padrão da expressão gênica de *IKBKB* pode sofrer regulação pelo miR-942-5p.

A diminuição da expressão proteica de IKBKB nas células da linhagem Jurkat, transfectadas com o miR-942-5p *mimic*, foi confirmada por meio de *Western Blotting* em estudo anterior⁽⁶⁰⁾. No presente estudo, não foram observadas diferenças na expressão proteica de IKBKB de fibroblastos, tanto dissômicos quanto trissômicos, transfectados com mimics/inibidores em relação aos controles negativos, sugerindo que os efeitos dessa regulação, em nível proteico, neste tipo celular sejam sutis e/ou compensados^(62,63,64), refletindo a complexidade da regulação pós-transcricional. A discordância entre a expressão ou a dose de um gene e de seu produto também tem sido relatada em outros estudos, inclusive na T21^(65,66,67).

Em relação ao gene *BCL2*, os resultados do presente estudo em fibroblastos dissômicos mostrou que a expressão desse gene diminuiu, após transfecção com o *mimic* miR-942-5p, e aumentou após a transfecção com os inibidores de ambos os microRNAs (miR-942-5p e miR-378a-3p), conforme esperado. Por outro lado, a expressão desse gene aumentou nas células transfectadas com o *mimic* miR-378a-3p;

embora o aumento da expressão gênica com o mimic não seja esperado, esse resultado não foi estatisticamente significativo.

Em fibroblastos trissômicos, a transfecção com os miR-942-5p e miR-378a-3p *mimic* resultou em uma diminuição significativa na expressão de *BCL2*, também conforme esperado. Entretanto, as células trissômicas transfectadas com os inibidores de ambos os MicroRNAs (miR-942-5p e miR-378a-3p) mostraram expressão desse gene significativamente diminuída, o que não está de acordo com o que se esperava nesse ensaio.

Também foi observada discrepâncias entre os níveis de mRNA e proteína de *BCL2*, após os experimentos de transfecção, nos fibroblastos dissômicos e trissômicos do presente estudo. Conforme citado acima, tal discordância não é totalmente inesperada, uma vez que somente em torno de 40% da variação na expressão proteica pode ser decorrente de alterações no nível de expressão gênica.⁽⁶⁸⁾ Frequentemente, os achados não concordante entre níveis de RNA e proteína podem ser atribuídos a outros processos de regulação entre o transcrito e o produto proteico, como regulação pós-transcricional, taxas de tradução, meia-vida das proteínas e degradação proteica.^(69,70) Embora a expressão de mRNA seja informativa na previsão da expressão proteica, a correlação entre os níveis de expressão de mRNA e proteína pode variar significativamente entre diferentes categorias biológicas de genes.⁽⁷¹⁾ Portanto, as diferenças entre os níveis de expressão de genes e proteínas podem ser influenciadas por diversos fatores biológicos e técnicos, sendo essencial considerar a relação complexa entre a expressão de mRNA e proteína ao interpretar os resultados experimentais.

Em relação à análise de bioinformática nas amostras de cérebro de SD, os quatro genes selecionados participam da via intrínseca da apoptose. A regulação da expressão

de genes pró e antiapoptóticos no cérebro é essencial para manter um equilíbrio e evitar a perda ou acúmulo de neurônios. A apoptose pode causar a morte excessiva de células neuronais, contribuindo para a perda de função cerebral e acarretando em prejuízo da cognição⁽⁷²⁾ e alterações no desenvolvimento morfológico e fisiológico do cérebro, aspectos observados na SD⁽⁵⁾. Essa população também é suscetível ao desenvolvimento precoce de doenças neurodegenerativas, como a DA^(73,74), que é caracterizada pelo acúmulo de placas beta-amiloide e emaranhados neurofibrilares⁽⁷⁴⁾. Uma vez que a beta-amiloide é um forte indutor de apoptose neuronal *in vitro*, acredita-se que o excesso de beta-amiloide no cérebro é um fator importante para a perda gradual de neurônios, observada na DA.^(72,73)

Dentre os quatro genes, selecionados no estudo, o *BCL2* codifica uma proteína com atividade antiapoptótica⁽⁷⁵⁾, enquanto os outros três genes (*BAX*,⁽⁷⁶⁾ *BBC3*⁽⁷⁷⁾ e *CASP7*⁽⁷⁸⁾) codificam proteínas pró-apoptóticas. Diferentes investigações têm produzido resultados distintos devido à complexa interação entre a expressão gênica pró e antiapoptótica. De acordo com estudos a respeito de apoptose cerebral,^(79,80) a expressão de genes pró-apoptóticos é significativamente aumentada, enquanto a expressão gênica antiapoptótica é reduzida. No entanto, outros estudos também indicam resultados opostos,^(81,82,83) na qual os genes pró-apoptóticos são expressos de forma reduzida e os genes antiapoptóticos apresentam expressão aumentada. Estudo de Engidawork *et al.*,⁽⁸⁴⁾ demonstrou expressão proteica aumentada de *BCL2* no córtex frontal do cérebro e no cerebelo de indivíduos com SD, enquanto não observou diferenças significativas dos níveis proteicos de *BAX* nas regiões cortical e cerebelar, proteína esta que forma um dímero com *BCL2* e que, em condições normais, devido à sua atuação pró-apoptótica, tende a promover o equilíbrio com as atividades antiapoptóticas de *BCL2*.

Os autores sugeriram que o aumento da expressão proteica de BCL2 poderia ser indicativo de um efeito compensatório na tentativa de proteger as células neuronais da apoptose.⁽⁸³⁾ Em estudo realizado por Sawa *et al.*,⁽⁸⁵⁾ foi evidenciado um aumento na vulnerabilidade das células neuronais de indivíduos SD à apoptose, visto que foi demonstrada uma expressão diminuída dos genes antiapoptóticos *BCL2* e *BCL-X* nos lobos temporais de indivíduos SD. Esses resultados contraditórios destacam os intricados mecanismos moleculares incluídos na patogênese de doenças ou condições que afetam o cérebro humano, incluindo a SD.

No presente estudo, observou-se expressão aumentada de genes-chave envolvidos na apoptose, como *BCL2*, *BBC3* e *CASP7*, em uma variedade de faixas etárias. Diversos estudos^(86, 87, 88) exploram a relação entre alterações na expressão de genes apoptóticos e o avanço da idade, mostrando como a morte programada de células pode atuar no processo de envelhecimento e no surgimento de algumas doenças. Cheng *et al.* observaram em condrócitos o aumento na expressão da proteína *RIPK1*, importante na regulação da sobrevivência celular, e alterações no padrão de expressão de genes envolvidos no metabolismo da matriz extracelular em tecidos conjuntivos, associando ao desenvolvimento de osteoartrite⁽⁸⁶⁾. Após análise da expressão gênica de todo o transcriptoma em linhagens de células linfoblásticas de um grupo de indivíduos com idade entre 70 e 76 anos, foram encontradas alterações significativas em 1.741 transcritos. Esses resultados indicaram que as mudanças na expressão gênica que ocorrem no decorrer dos anos estão associadas com declínio cognitivo e físico.⁽⁸⁷⁾ Além disso, um estudo identificou 1.037 genes apoptóticos com padrões de expressão alterados, sendo 603 com a expressão diminuída e 434 com a expressão aumentada, em tecido cerebral de camundongos ao longo do período embrionário até o dia do

nascimento. Os níveis de expressão desses genes são muito variáveis, o que sugere que a regulação da apoptose é reprogramada constantemente durante o desenvolvimento e, possivelmente, durante a vida⁽⁸⁸⁾.

A região do cortex pré-frontal ventrolateral (VFC) possui papel importante no processamento emocional, controle cognitivo e memória de trabalho ^(89, 90). No presente estudo, o aumento observado na expressão de *BCL2* nessa região pode indicar uma resposta protetiva contra a apoptose e potencial envolvimento no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Não há relatos na literatura que relacionem diretamente as diferenças na expressão de *BCL2* e as funções atribuídas à VFC e, portanto, são necessários mais estudos que avaliem essa relação e sua relevância clínica.

Uma vez que a via apoptótica intrínseca pode ser regulada por uma rede de genes, proteínas e fatores epigenéticos, a desregulação na expressão gênica e proteica relatada na SD se destaca como uma importante área de investigação. O equilíbrio preciso entre sobrevivência celular e morte celular programada é determinado pelas complexas interações entre esses componentes moleculares. Os achados sugerem que pessoas com SD podem ser mais suscetíveis a perturbações nesse equilíbrio, o que pode ser um fator nas características associadas à condição.

A análise de enriquecimento de vias dos genes *CASP7*, *BAX*, *BBC3* e *BCL2* indica uma associação importante com processos biológicos-chave. Como demonstrado na investigação realizada no Metascape, a análise de enriquecimento de vias desses genes indica uma forte ligação com processos biológicos cruciais. Os processos biológicos mais enriquecidos são apoptose, rede *TP53*, interação hospedeiro-patógeno de coronavírus humanos, apoptose induzida por nanomateriais e doença hepática gordurosa não alcoólica. Essas relações diversificadas sugerem papéis potenciais para

esses genes em funções fisiológicas importantes, incluindo regulação do ciclo celular, resposta a patógenos e até mesmo condições como doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbio cuja incidência é maior na SD.⁽⁹¹⁾

Um entendimento mais profundo das interações entre esses genes foi possível por meio da identificação de complexos moleculares utilizando a abordagem de Detecção de Complexo Molecular (MCODE), que identifica elementos fortemente ligados na rede. As redes MCODE encontradas para BCL2, BAX, CASP7 e BBC3 exibem três processos biológicos primários associados a esta rede de interação proteína-proteína: a via de apoptose intrínseca, apoptose - múltiplas espécies e interação hospedeiro-patógeno de coronavírus humanos.

A relação com a interação hospedeiro-patógeno de coronavírus humanos é especialmente significativa, pois levanta a possibilidade de que esses genes estejam envolvidos em processos cruciais durante infecções virais⁽⁹²⁾. Além disso, a apoptose aparece como o principal elemento, evidenciando mais uma vez o envolvimento desses genes no controle da morte celular programada. A rede TP53, conhecida por seu papel essencial no controle do ciclo celular e na resposta da célula a situações estressantes, também sugere implicações importantes para a funcionalidade desses genes em vários contextos celulares, especialmente na SD. Em experimento realizado tanto em cérebros de indivíduos SD como em camundongos Ts65Dn (mutados com a trissomia do 21), foi observada uma relação entre a ativação da via de TP53 e o aumento apoptose, além da regulação de vários alvos na via de apoptose⁽⁹¹⁾. Além disso, o desenvolvimento de aneuploidias, incluindo a SD, tem sido ligado aos genes TP53 e seu regulador MDM2, uma vez que foi observado uma correlação entre o avanço da idade, o surgimento de polimorfismos nestes genes e o aumento de aneuploidias fetais.⁽⁹³⁾ Portanto, a via de

TP53, importante no controle da apoptose, também possui papel importante nas alterações neuropatológicas e no aumento do risco de desenvolvimento de DA em indivíduos SD.^(94,95)

Por fim, a regulação dos genes *IKBKB* e *BCL2* por miRNAs e a análise de genes apoptóticos no cérebro de indivíduos com SD oferecem uma perspectiva valiosa sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa condição. No entanto, a compreensão completa dessa complexa rede de regulação ainda carece de estudos, a fim de elucidar com maior clareza como essas interações afetam o sistema imune e a patologia neurológica associada à SD. Esse aprofundamento pode revelar novas estratégias para intervenções terapêuticas e melhorar nosso conhecimento sobre as bases biológicas da T21.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

1. É possível que o miR-942-5p regule o gene *IKBKB*, independente da trissomia do cromossomo 21, uma vez que esse MicroRNA reduziu a expressão relativa de *IKBKB* após transfecção com o mimic e aumentou com inibidor tanto nos fibroblastos dissômicos quanto trissômicos.

2. Os resultados dos ensaios de transfecção para o gene *BCL2* não são compatíveis com a função esperada dos miRNAs, onde o mimic inibe a expressão do gene-alvo e o inibidor aumenta sua expressão, com exceção dos fibroblastos dissômicos, transfectados com miR-942-5p, onde é possível sugerir a regulação de *BCL2* por esse microRNA.

3. A falta de correlação entre expressão gênica e proteica observada após os experimentos de transfecção pode indicar que os efeitos da regulação por miRNAs sobre *IKBKB* e *BCL2* sejam sutis e/ou compensados em nível proteico, refletindo a complexidade da regulação pós-transcricional.

4. A expressão significativamente aumentada de *BCL2* no córtex frontal ventrolateral (VFC) sugere uma possível importância da expressão desse gene em áreas específicas do cérebro de indivíduos com SD, possivelmente contribuindo para a sobrevivência celular e proteção contra a neurodegeneração.

5. A expressão diferencial dos genes *BCL2*, *BBC3*, *CASP7* e *BAX* em diferentes faixas etárias sugere um desequilíbrio na regulação da via apoptótica na SD.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United Nations [Internet]. World Down Syndrome Day; 2024. [acesso em 19 mar. 2024]. Disponível em: <https://www.un.org/en/observances/down-syndrome-day>
2. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *Comptes Rendus Hebd Seances Acad Sci* 1959;248(11):1721–2.
3. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. Down syndrome: an insight of the disease. *J Biomed Sci* 2015 Jun 11;22(1):41. DOI: 10.1186/s12929-015-0138-y.1.
4. Malak R, Kostiukow A, Krawczyk-Wasielewska A, Mojs E, Samborski W. Delays in motor development in children with Down Syndrome. *Med Sci Monit* 2015 Jul 1;21:1904-10. DOI: 10.12659/MSM.893377.
5. Onnivello S, Pulina F, Locatelli C, Marcolin C, Ramacieri G, Antonaros F, *et al.* Cognitive profiles in children and adolescents with Down syndrome. *Sci Rep* 2022 Feb 4;12(1):1936. DOI: 10.1038/s41598-022-05825-4.
6. Lott IT, Dierssen M. Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol* 2010 Jun;9(6):623-33. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70112-5.
7. Bull MJ. Down Syndrome. *N Engl J Med* 2020 Jun 11;382(24):2344-2352. DOI: 10.1056/NEJMr1706537.
8. Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 2002 Nov;62(5):390-3. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2002.620506.x.
9. Snyder HM, Bain LJ, Brickman AM, Carrillo MC, Esbensen AJ, Espinosa JM, *et al.* Further understanding the connection between Alzheimer's disease and Down syndrome. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 2020 Jul;16(7):1065-1077. DOI: 10.1002/alz.12112.
10. Rivelli A, Fitzpatrick V, Chaudhari S, Chicoine L, Jia G, Rzhetsky A, *et al.* Prevalence of mental health conditions among 6078 individuals with Down Syndrome in the United States. *J Patient Cent Res Rev* 2022 Jan 17;9(1):58-63. DOI: 10.17294/2330-0698.1875.
11. Rubenstein E, Hartley S, Bishop L. Epidemiology of Dementia and Alzheimer disease in individuals with Down Syndrome. *JAMA Neurol.* 2020 Feb 1;77(2):262-264. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.3666.
12. Gomez W, Morales R, Maracaja-Coutinho V, Parra V, Nassif M. Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging (Albany NY)* 2020 Jan 9;12(1):1011-1033. DOI: 10.18632/aging.102677.

13. Akhtar TN, McGibbon E. Blindspot in the evidence base: A systematic review of psychological interventions for children and adolescents with intellectual disabilities and co-occurring obesity. *Res Dev Disabil* 2022 Jul;126:104240. DOI: 10.1016/j.ridd.2022.104240.
14. Colvin KL, Yeager ME. What people with Down Syndrome can teach us about cardiopulmonary disease. *Yeager European Respiratory Review* 2017;26(143):160098. DOI: 10.1183/16000617.0098-2016.
15. Huggard D, Doherty DG, Molloy EJ. Immune dysregulation in children with Down Syndrome. *Front Pediatr* 2020 Feb 27;8:73. DOI: 10.3389/fped.2020.00073.
16. Flores-Aguilar L, Iulita MF, Kovacs O, Torres MD, Levi SM, Zhang Y, *et al.* Evolution of neuroinflammation across the lifespan of individuals with Down syndrome. *Brain* 2020 Dez 1;143(12):3653-3671. DOI: 10.1093/brain/awaa326.
17. Moyse E, Krantic S, Djellouli N, Roger S, Angoulvant D, Debaq C, *et al.* Neuroinflammation: A Possible Link Between Chronic Vascular Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2022 Mai 19;14:827263. DOI: 10.3389/fnagi.2022.827263.
18. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation* 2013 Jul 16;10:84. DOI: 10.1186/1742-2094-10-84.
19. Gomes FC, Mattos MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. Alzheimer's Disease in the Down Syndrome: an overview of genetics and molecular aspects. *Neurol India* 2021 Jan-Feb;69(1):32-41. DOI: 10.4103/0028-3886.310062.
20. Ferrari M, Stagi S. Autoimmunity and Genetic Syndromes: a focus on Down Syndrome. *Genes (Basel)* 2021 Feb 13;12(2):268. DOI: 10.3390/genes12020268.
21. Osuna-Marco MP, López-Barahona M, López-Ibor B, Tejera ÁM. Ten reasons why people with Down Syndrome are protected from the development of most solid tumors - A review. *Front Genet* 2021 Nov 5;12:749480. DOI: 10.3389/fgene.2021.749480.
22. Edie S, Zaghloul NA, Leitch CC, Klinedinst DK, Lebron J, Thole JF, *et al.* Survey of human chromosome 21 gene expression effects on early development in Danio rerio. *G3 (Bethesda)* 2018 Jul 2;8(7):2215-2223. DOI: 10.1534/g3.118.200144.
23. Aivazidis S, Coughlan CM, Rauniyar AK, Jiang H, Liggett LA, Maclean KN, *et al.* The burden of trisomy 21 disrupts the proteostasis network in Down syndrome. *PLoS One* 2017 Abr 21;12(4):e0176307. DOI: 10.1371/journal.pone.0176307.
24. Pecze L, Szabo C. Meta-analysis of gene expression patterns in Down syndrome highlights significant alterations in mitochondrial and bioenergetic pathways. *Mitochondrion* 2021 Mar;57:163-172. DOI: 10.1016/j.mito.2020.12.017.

25. Aït Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, *et al.* Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down Syndrome: Impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007 Set;81(3):475-91. DOI: 10.1086/520000.
26. Zampieri BL, Biselli-Périco JM, Souza JES, Bürger MC, Júnior WAS, Goloni-Bertollo EM, *et al.* Altered expression of immune-related genes in children with Down Syndrome. *PLoS One* 2014 Set 15;9(9):e107218. DOI: 10.1371/journal.pone.0107218.
27. Silva CRS, Biselli-Périco JM, Zampieri BL, Silva WA, Souza JES, Bürger MC, *et al.* Differential expression of inflammation-related genes in children with Down Syndrome. *Mediators Inflamm* 2016;2016:6985903. DOI: 10.1155/2016/6985903.
28. Phillips T. Regulation of transcription and gene expression in Eukaryotes. *Nat Educ* 2008;1(1):199.
29. Cooper GM. Regulation of Transcription in Eukaryotes. *In*: Cooper GM. *The Cell: A molecular approach*. 2^a ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
30. Halbeisen RE, Galgano A, Scherrer T, Gerber AP. Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci* 2008 Mar;65(5):798-813. DOI: 10.1007/s00018-007-7447-6.
31. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004 Jul;5(7):522-31. DOI: 10.1038/nrg1379.
32. Annese T, Tamma R, Giorgis M, Ribatti D. microRNAs biogenesis, functions and role in tumor angiogenesis. *Front Oncol* 2020 Nov 27;10:581007. DOI: 10.3389/fonc.2020.581007.
33. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 Ago 3;9:402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.2.
34. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. MicroRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet* 2023 Dez;24(12):816-833. DOI: 10.1038/s41576-023-00611-y.
35. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004 Nov 11;432(7014):231-5. DOI: 10.1038/nature03049.
36. Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira ES, Menon ETN, Diniz SN, *et al.* MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *einstein (São Paulo)* 2021;19:1-7. DOI: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996.
37. Taghavipour M, Sadoughi F, Mirzaei H, Yousefi B, Moazzami B, Chaichian S, *et al.* Apoptotic functions of microRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of endometriosis. *Cell Biosci* 2020 Fev 11;10:12. DOI: 10.1186/s13578-020-0381-0.

38. Chen X, Li A, Zhan Q, Jing Z, Chen Y, Chen J. microRNA-637 promotes apoptosis and suppresses proliferation and autophagy in multiple myeloma cell lines via NUPR1. *FEBS Open Bio* 2021 Feb;11(2):519-528. DOI: 10.1002/2211-5463.13063.
39. Li Q, Ren P, Shi P, Chen Y, Xiang F, Zhang L, *et al.* MicroRNA-148a promotes apoptosis and suppresses growth of breast cancer cells by targeting B-cell lymphoma 2. *Anticancer Drugs* 2017 Jul;28(6):588-595. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000498.
40. 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* 2018 Nov 13;115(46):E10849-E10858. DOI: 10.1073/pnas.1803377115.
41. Das K, Rao LVM. The Role of microRNAs in Inflammation. *Int J Mol Sci* 2022 Dec 7;23(24):15479. DOI: 10.3390/ijms232415479.
42. Ding H, Li J, Li Y, Yang M, Nie S, Zhou M, *et al.* MicroRNA-10 negatively regulates inflammation in diabetic kidney via targeting activation of the NLRP3 inflammasome. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2021 Jul 7;29(7):2308-2320. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.03.012.
43. Zhang Z, Zou X, Zhang R, Xie Y, Feng Z, Li F, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a-5p reduces microglial-mediated neuroinflammation via suppression of the IRAK1/TRAF6 signaling pathway after ischemic stroke. *Aging* 2021 Jan 21;13(2):3060-3079. DOI: 10.18632/aging.202466.
44. Reale C, Zotti T, Scudiero I, Vito P, Stilo R. Chapter Nine: The NF- κ B family of transcription factors and its role in thyroid physiology. *In: Litwack G, editores. Thyroid Hormone: Vitamins and Hormones. Elsevier* 2018;106:195-210. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.05.003.
45. Liu F, Liu Y, Du Y, Li Y. MiRNA-130a promotes inflammation to accelerate atherosclerosis via the regulation of proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) expression. *Anatol J Cardiol* 2021 Set;25(9):630-637. DOI: 10.5152/AnatolJCardiol.2021.56721.
46. Patra D, Roy S, Arora L, Kabeer SW, Singh S, Dey U, *et al.* miR-210-3p Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by Targeting SOCS1-Mediated NF- κ B Pathway. *Diabetes* 2023 Mar 1;72(3):375-388. DOI: 10.2337/db22-0284.
47. Morsiani C, Bacalini MG, Collura S, Moreno-Villanueva M, Breusing N, Bürkle A, *et al.* Blood circulating miR-28-5p and let-7d-5p associate with premature ageing in Down syndrome. *Mech Ageing Dev* 2022 Set;206:111691. DOI: 10.1016/j.mad.2022.111691.
48. Pérez-Villarreal JM, Aviña-Padilla K, Beltrán-López E, Guadrón-Llanos AM, López-Bayghen E, Magaña-Gómez J, *et al.* Profiling of circulating chromosome 21-encoded microRNAs, miR-155, and let-7c, in Down Syndrome. *Mol Genet Genomic Med* 2022 Jun;10(6):e1938. DOI: 10.1002/mgg3.1938.

49. Zhao Y, Zhang H, Cheng J, Zou Y, Zhang D, Duan X. Association between dyslipidemia and cognitive impairment: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *J Integr Neurosci*. 2024 Feb 19;23(2):40. DOI: 10.31083/j.jin2302040.
50. Vizitiu AC, Stambouli D, Pavel AG, Muresan MC, Anastasiu DM, Bejinar C, *et al*. Mature miR-99a upregulation in the amniotic fluid samples from female fetus Down Syndrome pregnancies: a pilot study. *Medicina (Mex)* 2019 Nov 7;55(11):728. DOI: 10.3390/medicina55110728.
51. Biselli JM, Zampieri BL, Biselli-Chicote PM, Souza JES, Bürger MC, Silva WA, *et al*. Differential microRNA expression profile in blood of children with Down syndrome suggests a role in immunological dysfunction. *Hum Cell* 2022 Mar;35(2):639-648. DOI: 10.1007/s13577-022-00672-x.
52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. dezembro de 2001;25(4):402–8.
53. Olmos-Serrano JL, Kang HJ, Tyler WA, Silbereis JC, Cheng F, Zhu Y, *et al*. Down Syndrome Developmental brain transcriptome reveals defective Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Neuron* 2001 Dez;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
54. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, *et al*. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. DOI: 10.1093/nar/gku1003.
55. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, *et al*. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 2019 Abr 3;10(1):1523. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6.
56. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dez; 1(6):a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.
57. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF-kB control of T cell development. *Nat Immunol*. 2014 Jan; 15(1):15-25. DOI: 10.1038/ni.2785.
58. Hayden MS, Ghosh S. NF-kB in immunology. *Cell Res*. 2011 Fev;21(2):223-44. DOI: 10.1038/cr.2011.13.
59. Tessoulin B, Papin A, Gomez-Bougie P, Bellanger C, Amiot M, Pellat-Deceunynck C, *et al*. BCL2-family dysregulation in B-cell- malignancies: from gene expression regulation to a targeted therapy biomarker. *Front Oncol*. 2019 Jan 7. 8:645. DOI: 10.3389/fonc.2018.00645.
60. Wang Z. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods Mol Biol*. 2011;676:211-23. DOI: 10.1007/978-1-60761-863-8_15.

61. Mattos MF. Análise funcional dos genes IKBKB e CCR7 diferencialmente expressos na síndrome de Down [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2022.
62. Benoît PN, Monika CW. Limited but gene-class specific correlation of mRNA and protein expression in human CD8⁺ T cells. *BioRxiv* 2020. DOI: 10.1101/2020.04.21.053884
63. Perl K, Ushakov K, Pozniak Y, Yizhar-Barnea O, Bhonker Y, Shivatzki S, *et al.* Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics*. 2017 Abr 18;18(1):305. DOI: 10.1186/s12864-017-3683-9.
64. Abreu RS, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* Dez;5(12):1512-26. DOI: 10.1039/b908315d.
65. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep* 2015 Jun 8;5:10775. DOI: 10.1038/srep10775.
66. Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk Michael, Coleman IM, *et al.* Correlation of mRNA and protein levels: Cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*. 2008 Mai 23;9:246. DOI: 10.1186/1471-2164-9-246.
67. Cheon MS, Bajo M, Kim SH, Claudio JO, Stewart AK, Patterson D, *et al.* Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain: challenging the gene dosage effect hypothesis (Part II). *Amino Acids*. 2003;24(1-2):119-25. DOI: 10.1007/s00726-002-0337-1.
68. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 2020 Out;21(10):630-644. DOI: 10.1038/s41576-020-0258-4.
69. Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, *et al.* How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008 Mai;40(5):426-36. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00418.x.
70. Zhao P, Zhang J, Kuai J, Li L, Li X, Feng N, *et al.* TAT-PEP alleviated cognitive impairment by alleviating neuronal mitochondria damage and apoptosis after cerebral ischemic reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 2023 Out;60(10):5655-5671. DOI: 10.1007/s12035-023-03404-w.
71. Lott IT, Head E. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol* 2019 Mar;15(3):135-147. DOI: 10.1038/s41582-018-0132-6.

72. Goel P, Chakrabarti S, Goel K, Bhutani K, Chopra T, Bali S. Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: an insight. *Front Mol Neurosci* 2022 Ago 25;15:937133. DOI: 10.3389/fnmol.2022.937133.
73. Wójcik P, Jastrzębski MK, Zięba A, Matosiuk D, Kaczor AA. Caspases in Alzheimer's Disease: mechanism of activation, role, and potential treatment. *Mol Neurobiol* 2023 Dez 23;61:4834-4853. DOI: 10.1007/s12035-023-03847-1.
74. Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Out 26;23(21):12924. DOI: 10.3390/ijms232112924.
75. Lan YJ, Yeh PS, Kao TY, Lo YC, Sue SC, Chen YW, *et al.* Anti-apoptotic BCL-2 regulation by changes in dynamics of its long unstructured loop. *Commun Biol* 2020 Nov 12;3(1):668. DOI: 10.1038/s42003-020-01390-6.
76. Moori M, Norouzian D, Yaghmaei P, Farahmand L. Effects of 1Hz 100mT electromagnetic field on apoptosis induction and Bax/Bcl-2 expression ratio in breast cancer cells. *Multidiscip Cancer Investig* 2022;6(1):1-7. DOI: 10.30699/MCI.6.1.032-2
77. Dang Y, Zhang Y, Xu L, Zhou X, Gu Y, Yu J, *et al.* PUMA-mediated epithelial cell apoptosis promotes Helicobacter pylori infection-mediated gastritis. *Cell Death Dis* 2020 Feb 20;11(2):139. DOI: 10.1038/s41419-020-2339-x.
78. Anson F, Thayumanavan S, Hardy JA. Exogenous introduction of initiator and executioner caspases results in different apoptotic outcomes. *JACS Au* 2021 Jul 8;1(8):1240-1256. DOI: 10.1021/jacsau.1c00261.
79. Sindhu R, Manonmani HK. l-asparaginase induces intrinsic mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells and impedes tumor progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 Set 18;503(4):2393-2399. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.167.
80. Wybranska I, Polus A, Mikolajczyk M, Knapp A, Sliwa A, Zapala B, *et al.* Apoptosis-related gene expression in glioblastoma (LN-18) and medulloblastoma (Daoy) cell lines. *Hum Cell* 2013 Dez;26(4):137-48. DOI: 10.1007/s13577-011-0029-9.
81. Li G, Wu J, Li L, Jiang P. p53 deficiency induces MTHFD2 transcription to promote cell proliferation and restrain DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021 Jul 13;118(28):e2019822118. DOI: 10.1073/pnas.2019822118.
82. Blahovcova E, Richterova R, Kolarovszki B, Dobrota D, Racay P, Hatok J. Apoptosis-related gene expression in tumor tissue samples obtained from patients diagnosed with glioblastoma multiforme. *Int J Mol Med* 2015 Dez;36(6):1677-1684. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2369.
83. Wang Q, Zhang L, Yuan X, Ou Y, Zhu X, Cheng Z, *et al.* The Relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in

the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons. PLoS ONE 2016 Oct 5;11(10):e0163327. DOI: 10.1371/journal.pone.0163327.

84. Engidawork E, Gulesserian T, Seidl R, Cairns N, Lubec G. Expression of apoptosis related proteins: RAIDD, ZIP kinase, Bim/BOD, p21, Bax, Bcl-2 and NF-kB in brains of patients with Down syndrome. *In*: Lubec G, organizador. Protein expression in Down Syndrome brain. Vienna: Springer; 2001. p. 181-192. DOI: 10.1007/978-3-7091-6262-0_14.

85. Sawa A, Oyama F, Cairns NJ, Amano N, Matsushita M. Aberrant expression of bcl-2 gene family in Down's syndrome brains. Mol Brain Res 1997 Ago;48(1):53-9. DOI: 10.1016/s0169-328x(97)00078-8.

86. Cheng J, Duan X, Fu X, Jiang Y, Yang P, Cao C, *et al.* RIP1 Perturbation induces chondrocyte necroptosis and promotes osteoarthritis pathogenesis via targeting BMP7. Front Cell Dev Biol, 2021 Abr 16;9:638382. DOI: 10.3389/fcell.2021.638382.

87. Harris SE, Riggio V, Evenden L, Gilchrist T, McCafferty S, Murphy L, *et al.* Age-related gene expression changes, and transcriptome wide association study of physical and cognitive aging traits, in the Lothian Birth Cohort 1936. Aging (Albany NY). 2017 Dez 1;9(12):2489-2503. DOI: 10.18632/aging.101333.

88. Jiang W, Chen L, Zheng S. Global Reprogramming of Apoptosis-Related Genes during Brain Development. Cells. 2021 Oct 27;10(11):2901. DOI: 10.3390/cells10112901.

89. Ryman SG, El Shaikh AA, Shaff NA, Hanlon FM, Dodd AB, Wertz CJ *et al.* Proactive and reactive cognitive control rely on flexible use of the ventrolateral prefrontal cortex. Hum Brain Mapp. 2019 Feb 15;40(3):955-966. DOI: 10.1002/hbm.24424.

90. Kirk U, Lilleholt L, Freedberg D. Cognitive framing modulates emotional processing through dorsolateral prefrontal cortex and ventrolateral prefrontal cortex networks: A functional magnetic resonance imaging study. Brain Behav. 2020 Set;10(9):e01761. DOI: 10.1002/brb3.1761.

91. De Matteo A, Vajro P. Down Syndrome and pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a causal or casual relationship? J Pediatr 2017 Oct;189:11-13. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.07.011.

92. Fung TS, Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. Annu Rev Microbiol. 2019 Set 8;73:529-557. DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115759.

93. Wu D, Prives C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. Cell Death Differ. 2018 Jan;25(1):169-179. DOI: 10.1038/cdd.2017.187.

94. Tramutola A, Pupo G, Di Domenico F, Barone E, Arena A, Lanzillotta C, *et al.* Activation of p53 in Down Syndrome and in the Ts65Dn mouse brain is associated with

a pro-apoptotic phenotype. J Alzheimers Dis JAD 2016;52(1):359-371. DOI: 10.3233/JAD-151105.

95. Chan Y, Xu W, Feng Y, Zhang Y, Li S, Geng Z, *et al.* Association of TP53 rs1042522 G>C, MDM2 rs2279744 T>G, and miR-34b/c rs4938723 T>C polymorphisms with aneuploidy pregnancy susceptibility. BMC Pregnancy Childbirth 2023 Ago 30;23(1):624. DOI: 10.1186/s12884-023-05945-3.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Artigo redigido para defesa

Expression and correlation of apoptosis-related genes: *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* in brains of individuals with Down Syndrome – a spatial and temporal bioinformatic analysis

Abstract

Down Syndrome (DS) is a genetic alteration that affects the immunological, hematological, and neurodevelopment processes. Apoptosis dysregulation has been observed in the brain of DS individuals and this may be related to different phenotypes in the syndrome (1–4). Knowing the genes that regulate this process might therefore be helpful in the identification of biomarkers that could indicate evidence of the apoptotic process associated with normal neural development and the neuropathological process. The regulation of apoptosis is essential for maintaining the number of neurons in the brain, which is a key factor in the neuropathology of DS. The aim of this article was to perform a bioinformatic analysis of the expression of the apoptotic genes *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* in post-mortem brain samples of individuals with Down syndrome.

Methodology: We computationally analyzed the expression of Data from a DNA microarray experiment (GEO database ID GSE59630) of four human apoptotic genes in numerous brain regions related to cognition in 58 individuals with DS and in 58 health individuals using the transformed log2 data. Additionally, we investigated the correlation and protein interactions of selected genes utilizing data from *String-db* and *Metascape*.

Results: We reported that all four genes had significantly altered expression in the brain of DS individuals. According to age-rank comparisons between euploid control and DS individuals, *CASP7* and *BAG3* became overexpressed in the DS brain from 13 years old. An mCODE analysis showed that the biological process was predominantly enriched in nanomaterial-induced apoptosis, apoptotic factor-mediated response and host-pathogen interaction of human coronaviruses – apoptosis and Apoptosis modulation and signaling.

Conclusion: Our results give new information about the gene expression of apoptosis-related genes in the brains of DS individuals,

which may help to better comprehend the neuronal dysfunctions caused by this genetic condition.

1. Introduction

Down Syndrome (Trisomy 21, mosaic trisomy 21, translocation-associated Trisomy 21) is a genetic condition that affects about one in 1000 births (5) and results from the total or partial presence of an extra chromosome 21. This genetic alteration may cause many impaired cellular functions, which affects immunological (6) and hematological (7) processes, as well as neurodevelopment (8). DS individuals also presents reduced number of neurons and brain size compared with euploid individuals, cause of the intelectual disability, the most notable feature of DS (9). Throughout development, a crucial process in determining the number of neurons and their connections is the programmed cell death process, also called apoptosis (10). As neurons are generated in excess in most central nervous system structures, making the right connections with their intended targets is essential for ensuring their survival. Apoptosis is a key process here as it removes surplus neurons that are unable to connect with their targets because they lack the necessary survival factors (11). Thus, the regulation of the apoptotic process is quite crucial to ensure the balance of the number of neurons.

There are two major pathways that can lead to programmed cell death process: the intrinsic (or mitochondrial) pathway and the extrinsic (or death receptor) pathway. In the apoptosis intrinsic pathway, a stimulus (cellular stress, viral infection or decrease in growth factors, for example) triggers the release of pro-apoptotic proteins such as BAX protein from the mitochondrial compartment into the cytosol. These pro-apoptotic proteins neutralize anti-apoptotic proteins, like BCL2 protein, by binding to it, which will lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane and release of pro-apoptotic proteins such as cytochrome C into the cytosol. Once there, cytochrome C combine with adaptor proteins like APAF-1 protein and activate caspase-9 protein. Effector proteins, such as caspase-3 and caspase-7, are cleaved as a result of this cascade activation, which induces cellular apoptosis (12,13). On the other hand, external stimuli trigger the apoptosis extrinsic pathway through death receptors on the surface of many cells, such as DR4/DR5, Fas receptors, tumor necrosis factor receptors (TNF-R)

and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAIL-R) (13,14). These death receptors interact with their particular ligands and trigger the recruitment of the adaptor proteins Fas-associated protein with death domains (FADD), tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein (TRADD), caspase-8 and caspase-10, which ultimately results in caspase 3 and caspase 7 activation, the apoptosis execution pathway (14,15).

There are a lot of molecules that regulate the proteins that indeed are part of those pathways. BBC3, also known as PUMA, is a member of a subclass of the BCL2 family of proteins called BH3-only pro-apoptotic proteins, that plays a crucial role in the regulation of the apoptosis. When exposed to stressors and activated, these proteins can trigger the intrinsic apoptotic pathway by properly inhibiting the antiapoptotic BCL2 family members and also by leading the activation of the BAX and BAK proteins (16,17).

Gene	Gene ID	Locus	Gene Name
BCL2	596	18q21.33	B-Cell lymphoma 2
BAX	581	19q13.33	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BBC3	27113	19q13.32	BCL2 binding component 3
CASP7	840	10q25.3	Caspase 7

Tabel 1. Gene data of four encoding apoptotic human proteins. [Source of NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (accessed on 31 march 2023)]

It has been described that cortical neurons from fetal DS and age-matched normal brains develop correctly in culture, but DS neurons subsequently degenerate and suffer apoptosis while normal neurons remain alive (18). Alterations in proliferative and/or apoptotic processes in several tissues may contribute to other significant DS symptoms such as reduced growth rate, cardiac problems, and hematological/immunological abnormalities (19–21).

The general hypo-cellularity present in DS individuals' brains, which might result in impaired synaptogenesis, connection, and synaptic plasticity, has been hypothesized as one mechanism for the neurobiological correlate of cognitive dysfunction. In fact, DS affects fetuses, children, and adults, and is associated with a decrease in the quantity of neurons found in the hippocampus, parahippocampal gyrus, cerebellum, and neocortex (1,9,22,23). Nevertheless, until now, the genes of apoptosis in different stages and regions of the brain have not been investigated, which could lead to a better understanding of the different neurological phenotypes observed in DS.

Therefore, considering the genes involved in the apoptotic process in physiologic and pathologic conditions, identifying differentially expressed genes may help in the detection of target genes and their role in different brain areas. Here, we conducted an analysis of the expression of the apoptosis genes *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* in post-mortem brain samples of individuals with DS. The analysis was performed using bioinformatics techniques and was evaluated the expression of these genes in different age ranges and brain regions. Additionally, we look to highlight the correlation between these genes and their role in apoptosis in individuals with DS was investigated.

2. Methodology

2.1. Data Mining

To perform the bioinformatics analysis, a search was first conducted on the GEO DataSets website using the terms "Down Syndrome" and "Gene expression analysis," which identified the study by Olmos-Serrano et al. 2016, titled "Longitudinal Gene Expression Analysis in Human Brain identifies biological processes underlying neuropathology in Down Syndrome." This is a publicly accessible DNA microarray experiment with the GEO database registration code GSE59630 (accessed on January 20, 2023). The Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) was used to obtain raw gene expression data for DS samples and normal samples. Data were analyzed by GEO2R. First, it was selected genes in the Intrinsic apoptotic pathway (N00098 network), according to KEGG Pathway Database, and of the National Center for Biotechnology Information (accessed on January 25, 2023) (NCBI) that were analyzed by GEO2R. First, we selected the genes in the Intrinsic apoptotic pathway (N00098 network) according to KEGG Pathway Database for the analyses conducted in the current research. Additionally, we used the log2 transformed expression values (log fold change or log FC) of a free-access DNA microarray experiment whose registration code in the GEO database is GSE59630 (accessed on 20 January 2023). This experiment was previously deposited by Olmos-Serrano et al. 2016 (24). Genes with $\log FC \geq 0.59$ were considered overexpressed while genes with $\log FC \leq -0.59$ were underexpressed.

The chosen microarray experiment included gene expression data from over 17500 probes from 58 post-mortem brain samples of DS individuals (33 from males and 25 from females) and 58 euploid samples as euploid controls (33 from males and 25 from females), as stated by the material submitted in the GEO database. Those samples were classified by age, sex and the following brain areas: cerebellar cortex (CBC), dorsolateral prefrontal cortex (DFC), hippocampus (HIP), inferior parietal cortex (IPC), inferior temporal cortex (ITC), medial prefrontal cortex (MFC), orbital prefrontal cortex (OFC), primary somatosensory cortex (S1C), primary visual cortex (V1C), superior temporal cortex (STC) and ventrolateral prefrontal cortex (VFC).

2.2. Construction of Selected Apoptotic Genes Network Using String-db

To create a protein-protein interaction (PPI) network containing the selected apoptotic genes, we used the free-access platform *STRING* (<https://string-db.org/> (accessed on 30 March 2023), a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function that utilizes a vast amount of functional association data (25).

2.3. Metascape analysis

Metascape is an online analytical tool based on the *OMICS* database which can be used to perform interactome analysis, functional enrichment and it can also analyze and annotate specific genes (26). We subsequently examined and verified the enrichment association between the chosen genes.

3. Results

3.1. Variation on Expression of Apoptotic Genes in the DS Brains in Different Age Ranks

Four genes – *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* - showed log FC values of expression differently significant between healthy individuals and DS individuals in at least one age rank. *BCL2* showed significantly increased expression in the prenatal

period (logFC=1,163) and in two other age ranks [13-22 years (logFC=0,710 and 30-39 years (logFC=0,934)]. *BBC3* was significantly increased in the prenatal period (logFC=0,65) and in the last age rank 40-42 years (logFC=0,67). (Tabel 3). *CASP7* also showed an increased expression in age ranks 13-22 years (logFC=0,66) and 40-42 years (logFC=0,77). On the other hand, *BAX* was significantly decreased in age rank 30-39 years (logFC=-1,10).

Gene	16-22 WG	0-12 M	2-10 Y	13-22 Y	30-39 Y	40-42 Y
<i>BCL2</i>	1,16*	0,56	0,16	0,71*	0,93*	0,10
<i>BAX</i>	-0,33	-0,19	-0,34	-0,15	-1,10*	-0,10
<i>BBC3</i>	0,65*	0,31	0,25	0,43	0,57	0,67*
<i>CASP7</i>	0,45	-0,12	0,44	0,66*	0,50	0,77*

Tabel 2. Log FC values for the four apoptotic genes expressed in different age ranks of the brain of Down Syndrome (DS) individuals.

*|logFC| ≥ 0,59 and p value < 0,05

3.2 Differential Expression of Apoptotic Genes in Brain Areas from Individuals with DS

All four genes showed significantly p value (p<0,05) but none of them were considered differently expressed in DS individuals (|logFC|≥0,59) when it comes to the whole brain. Only *BCL2* exhibited expression significantly altered in a specific brain region – it was overexpressed in VFC (logFC=0,74) (Table 2).

Gene	Gene ID	Brain	HIP	CBC	DFC	OFC	V1C	VFC	ITC
<i>BCL2</i>	596	0,57	0,90	0,58	0,51	0,40	0,25	0,74*	0,61
<i>BAX</i>	581	-0,33	-0,48	-0,48	-0,41	-0,32	-0,20	-0,47	-0,51
<i>BBC3</i>	27113	0,39	0,47	0,23	0,54	0,33	0,47	0,43	0,51
<i>CASP7</i>	840	0,25	0,41	0,21	0,60	0,30	0,18	0,45	0,41

Tabel 3. Log FC values of expression for the 4 apoptotic genes in multiple brain structures of individuals with Down Syndrome (DS).

*|logFC| ≥ 0,59 and p value < 0,05

3.3. Analysis of Protein-Protein Interaction and Functional Enrichment of Apoptotic Genes in DS individuals

For the examination of protein-protein interactions among genes with varying expression in at least one age rank, we employed the String *STRING* database. Our analysis of protein interactions reveals a crucial network of proteins involved in essential biological processes. Figure 1 illustrates the interconnection of four key proteins: *BCL2*, *BAX*, *BBC3*, and *CASP7*. Each node represents a protein, while the

edges indicate their interactions. These interactions are fundamental for understanding the molecular mechanisms underlying crucial biological events.

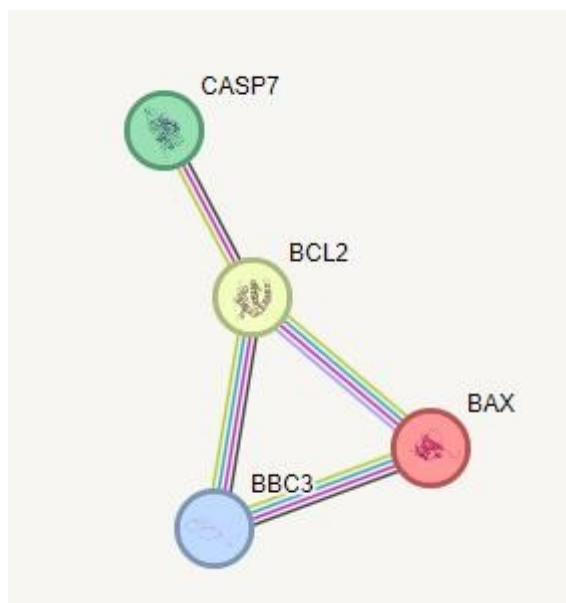


Figure 1. PPI network interaction network generated on String-db website

The analysis revealed that the number of nodes in the network is four, representing the four proteins of interest, and the number of edges is also four, indicating the identified interactions. The minimum required interaction score was 0.700 (high confidence) and the p-value for protein-protein interaction (PPI) enrichment was extraordinarily low, with a value of $2.2e-06$, highlighting the biological significance of these interactions.

Figure 2 presents a crucial table from Metascape highlighting the top enriched biological processes related to the network of interactions among the proteins BCL2, BAX, BBC3, and CASP7. These processes provide valuable insights into the cellular and molecular events that may be affected by this network. The networks of enriched terms are shown in Figure 3 and are colored by cluster ID. Nodes with the same cluster ID are often adjacent to one another.

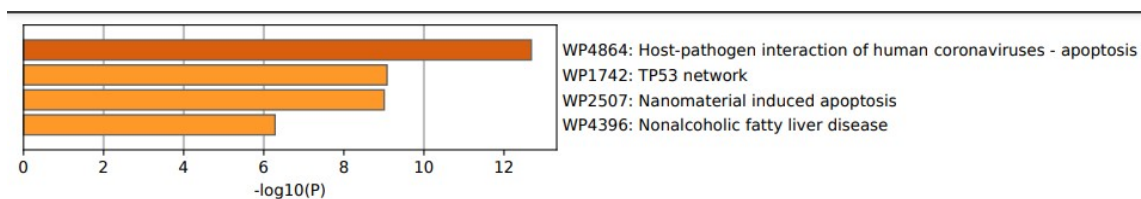


Figure 2. Bar graph of enriched terms across input gene lists, colored by p-values

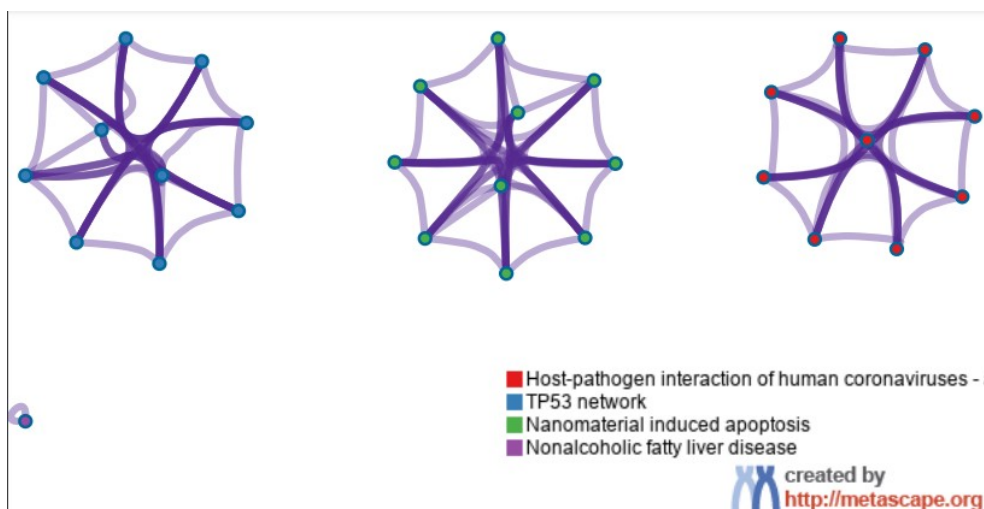


Figure 3. Network of enriched terms colored by cluster ID - nodes with the same cluster ID are often close to each other

The most strongly enriched biological processes found on Metascape include: host-pathogen interaction of human coronaviruses – apoptosis, TP53 network, nanomaterial induced apoptosis and nonalcoholic fatty liver disease.

The densely linked network components have been identified using the Molecular Complex Detection (MCODE) technique. Figure 3 displays the MCODE networks that have been discovered for BCL2, BAX, BBC3 and CASP7:

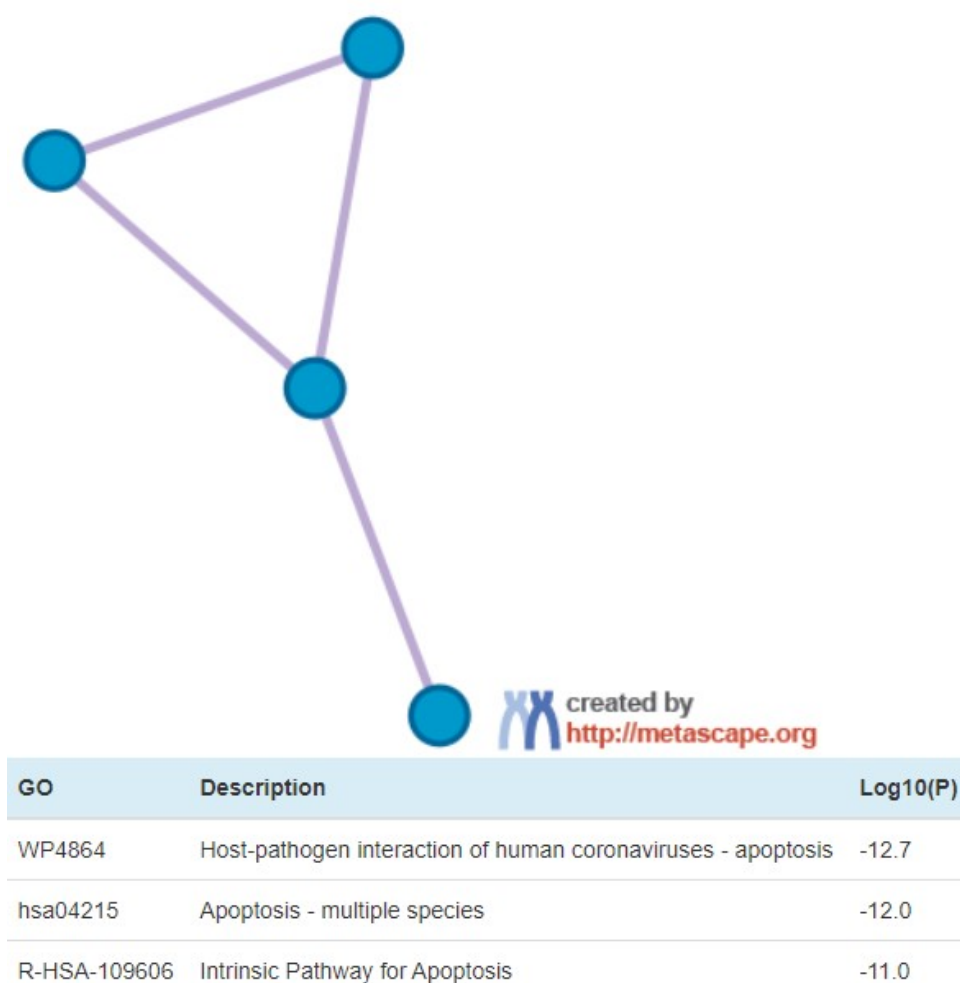


Figure 4. Protein-protein interaction network and MCODE componentes identified for selected genes

4. Discussion

Regulation of the expression of pro and anti-apoptotic genes in the brain is essential to maintain an equilibrium and prevent a loss or accumulation of neurons. DS individuals are reported to be more likely to develop neurodegenerative diseases, like Alzheimer's Disease (27). They also exhibit cognitive impairment (28) in addition to morphological and physiological development alterations, and one of the mechanisms that could lead to this is apoptosis.

Among the genes selected in this study, one gene codifies a protein with anti-apoptotic activity (BCL2 (29)), while three genes codify pro-apoptotic proteins (BAX (30), BBC3 (31) and CASP7 (32)). It is clear from studies on tumor growth that deregulation of apoptosis plays a major role in the malignant phenotype of cancer cells.

Remarkably, different investigations have produced diverse results due of the intricate interaction between pro- and anti-apoptotic gene expression. According to some studies, pro-apoptotic gene expression is significantly upregulated whereas anti-apoptotic gene expression is downregulated (33,34). Reports have also indicated an opposite tendency (35,36), in which pro-apoptotic genes are downregulated and anti-apoptotic genes are increased. These contradictory results highlight the intricate molecular mechanisms included in the pathogenesis of diseases or conditions impacting an individual's immune system.

The complex molecular network linked to DS has been highlighted by our study, which has shown interesting patterns of gene expression in these people. More specifically, we've seen overexpression of key genes such as *BCL2*, *BBC3*, and *CASP7* across a range of age groups, suggesting a possible connection between these genetic variables and the development of DS.

The downregulation of *BAX* in DS patients aged 30-39 years old is particularly intriguing. This observation implies a dynamic interaction between gene expression and the intrinsic apoptotic mechanism within this particular age range. Since a network of genes, proteins, and epigenetic factors closely regulates the intrinsic apoptotic pathway (37), the dysregulation in gene and protein expression reported in DS patients comes out an important area of investigation. The accuracy balance between cell survival and programmed cell death is determined by the complex interactions between these molecular components. Our findings suggest that persons with DS may be more susceptible to disturbances in this equilibrium, which might be a factor in the characteristic traits linked to the condition.

The pathway enrichment analysis of the *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* genes indicates an important association with key biological processes. The pathway enrichment analysis of the *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* genes indicates a strong link to crucial biological processes. These diversified relationships, mostly related to apoptosis, suggest potential roles for these genes in important physiological functions including cell cycle regulation, pathogen response, and even conditions like nonalcoholic fatty liver disease.

A deeper understanding of the interactions between these genes is possible through the identification of molecular complexes by Molecular Complex Detection

(MCODE) approach, which identifies highly linked elements in the network. The MCODE networks found for *BCL2*, *BAX*, *BBC3* and *CASP7* are shown in Figure 3, which also shows three primary biological processes associated with this protein-protein interaction network: the intrinsic apoptosis pathway, apoptosis - multiple species, and host-pathogen interaction of human coronaviruses.

The relationship to the host-pathogen interaction of human coronaviruses is especially significant, since it raises the possibility that these genes are involved in crucial processes during viral infections. Additionally, apoptosis appears as the main element, suggesting once more that these genes may be involved in the control of programmed cell death. The TP53 network, which is well-known for its essential role in controlling the cell cycle and the cell's response to stressful situations, also suggests important implications for the functionality of these genes in various cellular contexts.

5. Conclusion

The understanding the complex molecular pathways underlying DS requires a knowledge of the temporal dynamics of these gene expressions across various age groups. These findings could potentially open a path for focused therapy approaches that attempt to change or repair the expression of these vital genes, providing new possibilities for treating the molecular elements of Down syndrome.

The complex molecular environment linked to DS and its possible influence on the balance between pro- and anti-apoptotic gene expression in the brain. Key genes like *BCL2*, *BBC3*, *CASP7*, and *BAX* have been shown to be dysregulated in a variety of age groups, which highlights the intricate molecular pathways causing DS. Of particular interest is the downregulation of *BAX* in DS patients between the ages of 30 and 39, which suggests a dynamic interplay within the intrinsic apoptotic pathway at this age range. Significant relationships between the pathway enrichment analysis and important biological processes, such as apoptosis and host-pathogen interactions, are also shown. These links imply possible involvement in pathogen response, cell cycle control, and diseases such as nonalcoholic fatty liver disease. The identification of molecular complexes through the mCODE approach highlights the tightly connected components of the network and the roles played by these genes in apoptosis and reacting to viral

infections. This suggests that these genes are important regulators of these processes, opening up new paths for investigation into further implications of these molecular interactions.

References

1. Rueda N, Flórez J, Martínez-Cué C. Apoptosis in Down's syndrome: lessons from studies of human and mouse models. *Apoptosis*. 1º de fevereiro de 2013;18(2):121–34. DOI: 10.1007/s10495-012-0785-3.
2. Seidl R, Bidmon B, Bajo M, Yoo PC, Cairns N, LaCasse EC, et al. Evidence for apoptosis in the fetal Down syndrome brain. *J Child Neurol*. junho de 2001;16(6):438–42. DOI: 10.1177/088307380101600610
3. Engidawork E, Gulesserian T, Seidl R, Cairns N, Lubec G. Expression of apoptosis related proteins: RAIDD, ZIP kinase, Bim/BOD, p21, Bax, Bcl-2 and NF-kB in brains of patients with Down syndrome. Em: Lubec G, organizador. *Protein Expression in Down Syndrome Brain* [Internet]. Vienna: Springer; 2001 [citado 24 de fevereiro de 2023]. p. 181–92. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0_14
4. Shi Y, Ye D, Huang R, Xu Y, Lu P, Chen H, et al. Down Syndrome Critical Region 1 Reduces Oxidative Stress-Induced Retinal Ganglion Cells Apoptosis via CREB-Bcl-2 Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1º de outubro de 2020;61(12):23. DOI: 10.1167/iovs.61.12.23
5. Satgé D, Seidel MG. The Pattern of Malignancies in Down Syndrome and Its Potential Context With the Immune System. *Front Immunol*. 2018;9:3058. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03058.
6. Peeters D, Pico-Knijnenburg I, Wieringa D, Rad M, Cuperus R, Ruige M, et al. AKT Hyperphosphorylation and T Cell Exhaustion in Down Syndrome. *Front Immunol*. 2022;13:724436. DOI: 10.3389/fimmu.2022.724436
7. de Gonzalo-Calvo D, Barroeta I, Nan MN, Rives J, Garzón D, Carmona-Iragui M, et al. Evaluation of biochemical and hematological parameters in adults with Down syndrome. *Sci Rep*. 13 de agosto de 2020;10:13755. DOI: 10.1038/s41598-020-70719-2.
8. Klein JA, Haydar TF. Neurodevelopment in Down syndrome: Concordance in humans and models. *Front Cell Neurosci*. 15 de julho de 2022;16:941855. DOI: 10.3389/fncel.2022.941855.
9. Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, et al. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol Zurich Switz*. abril de 2008;18(2):180–97. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00113.x

10. Cavallaro S. Cracking the code of neuronal apoptosis and survival. *Cell Death Dis.* 1º de novembro de 2015;6(11):e1963–e1963. DOI: 10.1038/cddis.2015.309.
11. Murase S, Owens DF, McKay RD. In the newborn hippocampus, neurotrophin-dependent survival requires spontaneous activity and integrin signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 25 de maio de 2011;31(21):7791–800. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0202-11.2011.
12. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 18 de janeiro de 2019;39(1):BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992.
13. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev.* 1º de abril de 2018;98(2):813–80. DOI: 10.1152/physrev.00011.2017.
14. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Chapter Four - Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. Em: Donev R, organizador. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. Academic Press; 2021 [citado 13 de março de 2023]. p. 73–120. (Apoptosis in Health and Disease - Part A; vol. 125). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876162321000134> DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.
15. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495. DOI: 10.1080/01926230701320337.
16. Hutt KJ. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction.* 1º de fevereiro de 2015;149(2):R81–9. DOI: 10.1530/REP-14-0422.
17. Dai H, Ding H, Peterson KL, Meng XW, Schneider PA, Knorr KLB, et al. Measurement of BH3-only protein tolerance. *Cell Death Differ.* fevereiro de 2018;25(2):282–93. DOI: 10.1038/cdd.2017.156.
18. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature.* dezembro de 1995;378(6559):776–9. DOI: 10.1038/378776a0.
19. Gurbuxani S, Vyas P, Crispino JD. Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood.* 15 de janeiro de 2004;103(2):399–406. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1556.
20. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *The Lancet.* 12 de abril de 2003;361(9365):1281–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12987-X.
21. McElhinney DB, Straka M, Goldmuntz E, Zackai EH. Correlation between abnormal cardiac physical examination and echocardiographic findings in neonates with Down syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;113(3):238–41. DOI: 10.1002/ajmg.10803.

22. Guidi S, Ciani E, Bonasoni P, Santini D, Bartesaghi R. Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with down syndrome. *Brain Pathol Zurich Switz.* julho de 2011;21(4):361–73. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2010.00459.x
23. Larsen KB, Laursen H, Graem N, Samuelsen GB, Bogdanovic N, Pakkenberg B. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges.* 20 de novembro de 2008;190(5):421–7. DOI: 10.1016/j.aanat.2008.05.007.
24. Olmos-Serrano JL, Kang HJ, Tyler WA, Silbereis JC, Cheng F, Zhu Y, et al. Down Syndrome Developmental brain transcriptome reveals defective Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Neuron* 2001 Dez;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
25. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. DOI: 10.1093/nar/gku1003.
26. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 2019 Abr 3;10(1):1523. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6.
27. Lott IT, Head E. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol* 2019 Mar;15(3):135-147. DOI: 10.1038/s41582-018-0132-6.
28. Onnivello S, Pulina F, Locatelli C, Marcolin C, Ramacieri G, Antonaros F, et al. Cognitive profiles in children and adolescents with Down syndrome. *Sci Rep* 2022 Fev 4;12(1):1936. DOI: 10.1038/s41598-022-05825-4.
29. Lan YJ, Yeh PS, Kao TY, Lo YC, Sue SC, Chen YW, et al. Anti-apoptotic BCL-2 regulation by changes in dynamics of its long unstructured loop. *Commun Biol* 2020 Nov 12;3(1):668. DOI: 10.1038/s42003-020-01390-6.
30. Moori M, Norouzian D, Yaghmaei P, Farahmand L. Effects of 1Hz 100mT electromagnetic field on apoptosis induction and Bax/Bcl-2 expression ratio in breast cancer cells. *Multidiscip Cancer Investig.* 2022;6(1):1–7. DOI: 10.30699/MCI.6.1.032-2
31. Dang Y, Zhang Y, Xu L, Zhou X, Gu Y, Yu J, et al. PUMA-mediated epithelial cell apoptosis promotes *Helicobacter pylori* infection-mediated gastritis. *Cell Death Dis* 2020 Fev 20;11(2):139. DOI: 10.1038/s41419-020-2339-x.
32. Anson F, Thayumanavan S, Hardy JA. Exogenous introduction of initiator and executioner caspases results in different apoptotic outcomes. *JACS Au* 2021 Jul 8;1(8):1240-1256. DOI: 10.1021/jacsau.1c00261.
33. Sindhu R, Manonmani HK. l-asparaginase induces intrinsic mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells and impedes tumor

progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 Set 18;503(4):2393-2399. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.167.

34. Wybranska I, Polus A, Mikolajczyk M, Knapp A, Sliwa A, Zapala B, *et al.* Apoptosis-related gene expression in glioblastoma (LN-18) and medulloblastoma (Daoy) cell lines. *Hum Cell* 2013 Dez;26(4):137-48. DOI: 10.1007/s13577-011-0029-9.

35. Li G, Wu J, Li L, Jiang P. p53 deficiency induces MTHFD2 transcription to promote cell proliferation and restrain DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021 Jul 13;118(28):e2019822118. DOI: 10.1073/pnas.2019822118.

36. Blahovcova E, Richterova R, Kolarovszki B, Dobrota D, Racay P, Hatok J. Apoptosis-related gene expression in tumor tissue samples obtained from patients diagnosed with glioblastoma multiforme. *Int J Mol Med* 2015 Dez;36(6):1677-1684. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2369.

37. Roberts JZ, Crawford N, Longley DB. The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis. *Cell Death Differ.* fevereiro de 2022;29(2):272–84. DOI: 10.1038/s41418-021-00922-9

Anexo B – Aprovação do CEP

 Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

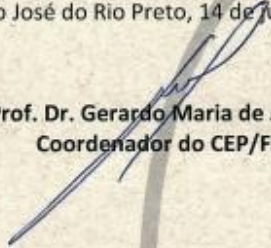
Parecer nº 2.712.338

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa **CAAE 88278218.4.0000.5415** sob a responsabilidade de **Érika Cristina Pavarino** com o título "Marcadores inflamatórios na síndrome de Down: análise de expressão gênica e funcional" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor (a) pesquisador (a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos e também da notificação da data de inclusão do primeiro participante de pesquisa, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 14 de junho de 2018.


Prof. Dr. Gerardo Maria de Araujo Filho
Coordenador do CEP/FAMERP


26/06/18

17 3201 5813
cep@famerp.br
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro
15090-000 | São José do Rio Preto SP
www.famerp.br/cep