

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL DE OBSTETRICĂ-GINECOLOGIE**

VIZITIU ANDA-CORNELIA



REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

**EVALUAREA EXPRESIEI MICROARN CARTAȚI PE
CROMOZOMUL 21 CA POSIBILI BIOMARKERI
PENTRU DIAGNOSTICUL PRENATAL AL
SINDROMULUI DOWN**

Conducător Științific

PROF. UNIV. DR. ANASTASIU DORU-MIHAI

Timișoara 2019

Cuprins

Introducere.....	3
Scopul și obiectivele studiului.....	4
Rezultate.....	4
Studiul 1. Quantificarea expresiei microARN maturi exprimați de pe cromozomul 21 din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale.....	5
Studiul 2. Quantificarea expresiei microARN maturi din cadrul clusterului miR-371-3, din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale.....	6
Studiul 3. Quantificarea expresiei pri-microARN din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale.....	7
Studiul 4. Quantificarea expresiei let-7c în probe de placentă de șoareci transgenici Dp(16)1Yey/+	9
Studiul 5. Analiza bioinformatică a microARN semnificativ diferențiați.....	9
Concluzie și discuții.....	10

Cuvinte cheie: microARN, sindrom Down, sarcină, diagnostic prenatal.

Introducere

Sindromul Down (SD) este nu numai cea mai frecventă anomalie cromozomială autozomală dar și cea mai viabilă trisomie, fiind determinată în 95% din cazuri de trisomia 21. Pentru moment, înțelegerea mecanismelor patogenice ale SD se bazează pe două teorii: teoria 'dozajului genic', care postulează expresia disproporționată a genelor de pe regiunile duplicate ale cromozomului 21 și teoria 'instabilității dezvoltării', care ia în calcul alterarea non-specifică a expresiei genice (18, 24, 25). Diagnosticul prenatal al SD se bazează în primul rând pe proceduri invazive precum puncția vilozităților coriale (CVS) și amniocenteză (AF), cu un risc de pierdere a sarcinii de 1-2% (1, 4). Mai multe studii clinice au validat analiza ADN-ului fetal liber circulant ca fiind o metodă cu mare sensibilitate și specificitate pentru screeningul aneuploidiilor, ceea ce a dus la implementarea clinică a testării prenatale non-invazive (NIPT) încă din anul 2011 (62). La 9 ani de la introducerea în clinică, NIPT rămâne un test costisitor și accesibil doar unui mic procent din populație. Deasemenea, este un test de screening ale cărui rezultate sunt exprimate în grade de risc. Probabilitatea de a nu obține un rezultat concludent din cauza prezenței reduse a ADN-ului fetal în sângele matern este unul dintre dezavantajele acestui test, din acest motiv este util doar după săptămâna a 10-a de sarcină. (18, 67).

Riscurile asociate, costurile crescute și diagnosticul tardiv în sarcină prin metodele actuale de testare justifică eforturile de a descoperi o metodă non-invazivă, cost-eficientă pentru diagnosticarea prenatală precoce a sindromului Down. În acest scop, microARN sunt candidați ideali, datorită stabilității lor crescute în lichidele biologice.

MicroARN sunt molecule de ARN non-codant de dimensiuni mici (22-25 de nucleotide), a căror principală acțiune este reglarea posttranscripțională a expresiei genice, și care au fost intens studiați și în vederea utilizării lor ca biomarkeri pentru diagnosticul non-invaziv al diverselor patologii datorită stabilității crescute în lichidele biologice (98,131-137).

Plecând de la ipoteza conform căreia prezența a trei copii ale cromozomului 21 determină creșterea expresiei cu cel puțin 50% a genelor corespondente (inclusiv a celor care codează microARN), prezentul studiu are ca obiectiv cuantificarea expresiei microARN cartajați pe cromozomul 21 (dintre care doar cinci au fost confirmați experimental: miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 și miR-802), prin qRT-PCR, cu scopul de a evalua posibilitatea utilizării acestora ca potențiali biomarkeri pentru diagnosticul prenatal al sindromului Down. În plus, ne-am propus să analizăm mecanismul alterării expresiei microARN maturi (transcripțional sau post-transcripțional) și să evaluăm impactul pe care microRNA diferențial exprimați îl au asupra transcriptomului în sindromul Down.

Din cunoștințele noastre, aceasta este prima comunicare a unor date care indică posibilitatea alterării mecanismelor posttranscripționale ale microARN în context trisomic. De remarcat că la momentul inițierii studiului nostru (2014), în literatura de specialitate exista un singur articol publicat de către Kotlabova et al. în care era analizată posibilitatea utilizării miR(21) ca biomarkeri pentru diagnosticul prenatal al sindromului Down (168).

Scopul și obiectivele studiului

Scopul acestui studiu este 1) de a evalua utilitatea microARN cartăți pe cromozomul 21 ca biomarkeri pentru diagnosticul prenatal al SD, 2) de a analiza mecanismul alterării expresiei acestor microARN maturi și 3) de a evalua impactul pe care microRNA diferențial exprimați îl au asupra transcriptomului amniocitelor și celulelor cardiace în sindromul Down.

În acest sens au fost atinse următoarele obiective:

1. formarea lotului de studiu;
2. cuantificarea microARN cartăți pe cromozomul 21 și a clusterului specific-placentar miR-371/3 (folosit ca și control biologic) în probe biologice de vilozități coriale și lichid amniotic care provin de la sarcini cu sindrom Down și sarcini euploide;
3. cuantificarea expresiei pri-microARN, corespunzători microARN maturi identificați ca având expresie semnificativ alterată, în probe biologice de vilozități coriale și lichid amniotic care provin de la sarcini cu sindrom Down și sarcini euploide;
4. cuantificarea expresiei let-7c în probe de placentă recoltate de la șoareci transgenici Dp(16)1Yey/+ (model experimental de sindrom Down);
5. analiza statistică a rezultatelor de expresie genică;
6. analiza bioinformatică a impactului dereglării expresiei microARN asupra expresiei genice la nivel placentar și fetal.

Rezultate

În acest studiu au fost incluse gravide care, la recomandarea medicului de obstetrică-ginecologie au urmat screeningul prenatal pentru aneuploidie. Recrutarea pacientelor în studiu s-a realizat între anii 2014-2016. Au fost incluse 59 de paciente cu vârsta cuprinsă între 21 și 42 de ani, dintre care 23 au fost diagnosticate cu sarcină cu sindrom Down iar 36 cu sarcini normale, euploide. Vârsta medie a pacientelor cu sarcini control a fost 35,45 ani, iar a pacientelor cu sarcini trisomice 34,94 ani, fără diferențe semnificative din punct de vedere

statistic ($p=0,7$). În total, 34 de paciente au avut sarcini cu feți de sex feminin (F), iar 25 paciente au avut sarcini cu făt de sex masculin (M), fără diferențe semnificative în ce privește sexul fetal, între cele două loturi.

Studiul s-a desfășurat conform principiilor de etică din cadrul Declarației de la Helsinki, după ce a fost obținută aprobarea comisiei locale de etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara (nr. 73/ 20 decembrie 2014).

Materialul biologic a fost obținut de la paciente cu risc crescut de aneuploidie în urma screeningului prenatal prin biopsia vilozităților coriale (CVS) și amniocenteză (AC) de către obstetricieni cu experiență, ca parte a procedurii de diagnostic a unei eventuale aneuploidii.

Studiul 1. Cuantificarea expresiei microARN maturi exprimați de pe cromozomul 21 din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale

Evaluarea expresiei microARN de pe cromozomul 21 (miR(21)) în probe biologice provenite de la sarcini cu sindrom Down și sarcini euploide a fost făcută prin qRT-PCR, folosind kitul TaqMan MicroRNA Cells-to-Ct kit (Ambion) și primeri TaqMan specifici.

Contrar așteptărilor, niciunul dintre microARN exprimați de pe cromozomul 21 și cuantificabili (miR-99a, miR-125b-2, miR-155, let-7c) nu au avut o expresie semnificativ diferențiată în sarcinile Down vs euploide. De remarcat existența unui trend de creștere a expresiei pentru miR-99a, miR-125b-2 și miR-155 și de scădere a expresiei pentru let-7c, atât în probele de AF cât și în cele de CVS (Fig 1). Menționez că miR-802 s-a amplificat după limita maximă de detecție stabilită ($Ct=40$) în peste 70% din probe, fiind considerat nedeterminat, motiv pentru care rezultatele obținute în urma analizei statistice nu au fost luate în considerare.

Analiza expresiei miR(21) nu a identificat modificari semnificative în probele trisomice provenite de la sarcini cu făt de sex masculin, cand au fost comparate cu probe euploide de același sex, dar s-a observat un pattern de expresie opus între probele de vilozități coriale și cele de lichid amniotic.

În probele de lichid amniotic provenite de la sarcini cu feți de sex feminin, miR-99a a fost găsit semnificativ supraexprimat ($FC=3,769$; $p=0,0005$) în sarcinile cu sindrom Down comparativ cu cele euploide (Fig 2). De menționat că în cazul probelor de vilozități coriale provenite de la sarcini trisomice cu feți de sex feminin, toți miR(21) au fost supra-exprimați, dar nesemnificativ din punct de vedere statistic (Fig 2).

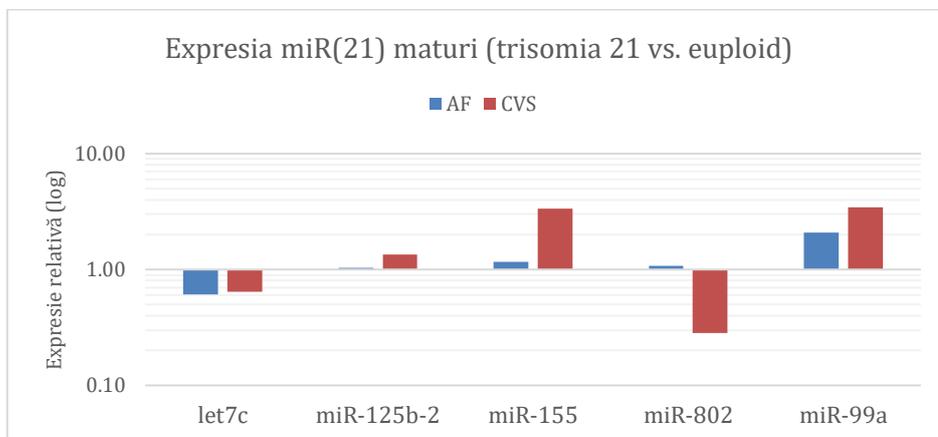


Fig 1. Modificarea nivelului de expresie a microARN maturi exprimați de pe cromozomul 21, în probe biologice trisomice de AF și CVS;

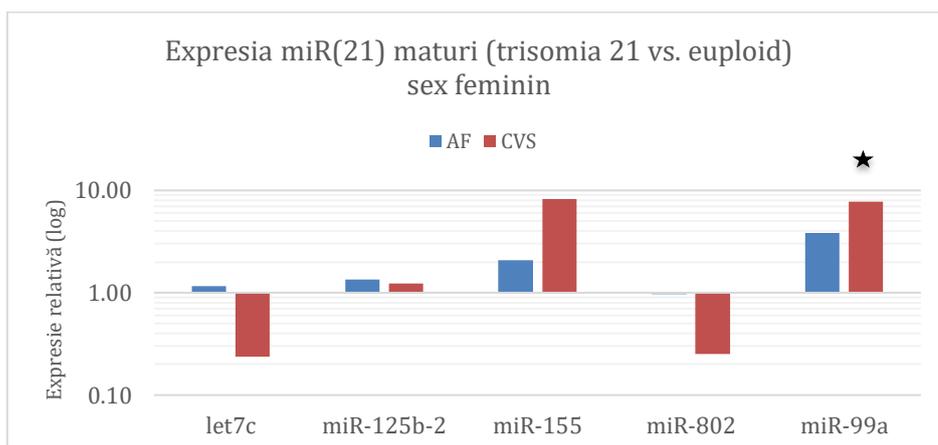


Fig 2. Modificarea nivelului de expresie a microARN maturi exprimați de pe cromozomul 21, în probe biologice trisomice de AF și CVS provenite de la embrioni de sex feminin; ★ $P < 0,001$.

Studiul 2. Quantificarea expresiei microARN maturi din cadrul clusterului miR-371-3, din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale

Evaluarea expresiei clusterului miR-371/3 în probe biologice provenite de la sarcini cu sindrom Down și sarcini euploide a fost făcută prin qRT-PCR, folosind kitul TaqMan MicroRNA Cells-to-Ct kit (Ambion) și primeri TaqMan specifici. Am evaluat expresia acestui cluster specific-placentar, conservat în evoluție, cu rol de control în cadrul experimentului.

miR-371 a fost exclus din analiza ulterioară pentru că în peste 70% dintre probe s-a amplificat sub limita de detecție stabilită ($Ct=40$), fiind astfel considerat nedeterminat. Toti ceilalti microARN din cadrul clusterului miR-371-3 (miR-372,

miR-373, miR-373*) au fost găsiți subexprimați în probele de lichid amniotic provenite de la sarcini cu sindrom Down comparativ cu probele euploide (Fig 3). În probele de vilozități coriale, cu excepția miR-373* care este subexprimat, toți ceilalți microARN din cadrul clusterului sunt supraexprimați. Cu toate acestea, doar pentru miR-373 a putut fi probată o variație semnificativă statistic a expresiei (FC= 10,10; p= 0,02) (Fig 3).

Analiza expresiei clusterului miR-371-3 nu a identificat modificări semnificative în probele trisomice de lichid amniotic sau vilozități coriale provenite de la sarcini cu făt de sex masculin sau feminin, când au fost comparate cu probe euploide de același sex.

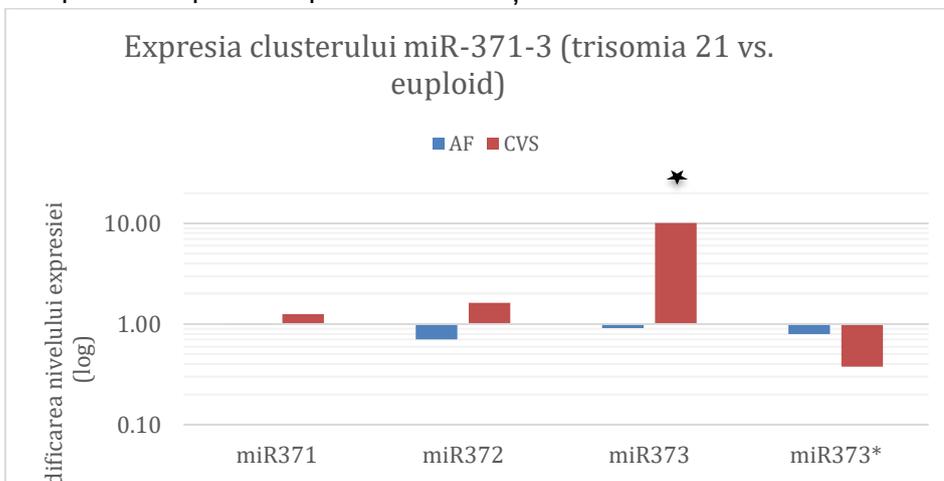


Fig 3. Modificarea nivelului de expresie a clusterului miR-371-3, în probe biologice trisomice de AF și CVS; ★ P <0,05.

Studiul 3. Quantificarea expresiei pri-microARN din probe biologice de lichid amniotic și vilozități coriale

Am decis cuantificarea a 4 pri-microARN (pri-let-7c, pri-miR-99a, pri-miR-155, pri-miR-373), corespunzători microARN maturi cuantificați anterior și care au prezentat nivele de expresie modificate semnificativ din punct de vedere statistic; pentru aceasta am folosit kitul TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct (Ambion) și primeri specifici.

Cu excepția pri-miR-99a, care este ușor crescut în probele de lichid amniotic (FC=1,11), similar de altfel miR-99a matur, toți ceilalți pri-miR cuantificați sunt subexprimați în probele trisomice, atât în lichid amniotic, cât și în vilozități coriale. Cu toate acestea, niciun pri-microARN analizat nu a prezentat modificări de expresie semnificative din punct de vedere statistic (Fig 4).

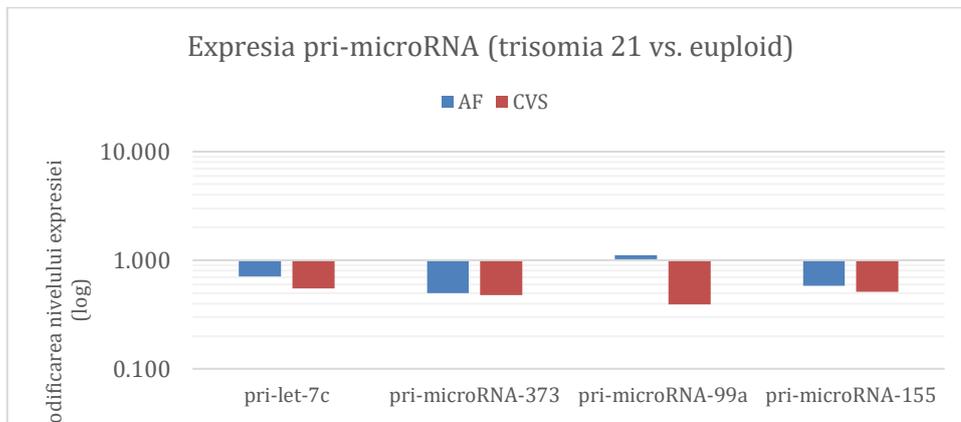


Fig 4. Modificarea nivelului de expresie a pri-microARN, în probe biologice trisomice de AF și CVS.

Analiza pri-microARN în probe biologice de vilozități coriale și lichid amniotic asociate cu făt de sex masculin, nu a evidențiat modificări de expresie semnificative din punct de vedere statistic.

În probele de vilozități coriale recoltate de la sarcini cu feți de sex feminin, toți cei patru pri-microARN prezintă variații de expresie semnificative statistic: pri-let-7c (FC= 0,094; p= 0,038), pri-miR-99a (FC= 0,198; p= 0,019) și pri-miR-373 (FC= 0,092; p= 0,033) (Fig 5). În probele de lichid amniotic toți pri-miR prezintă o expresie crescută, dar ne semnificativ modificată (FC= 1,01-1,05) (Fig 5).

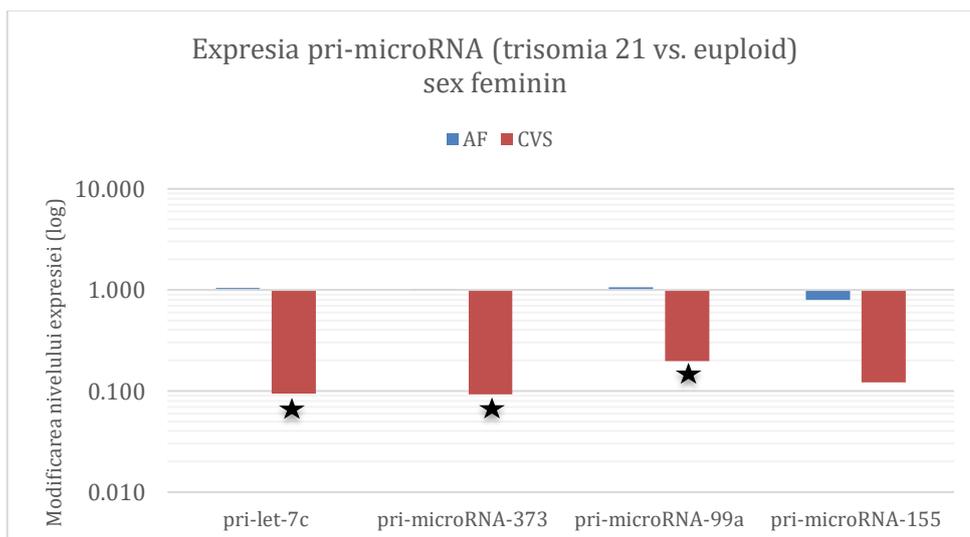


Fig 5. Modificarea nivelului de expresie a pri-microARN, în probe biologice trisomice de AF și CVS provenite de la embrioni de sex feminin.

Studiul 4. Cuantificarea expresiei let-7c în probe de placentă de șoareci transgenici Dp(16)1Yey/+

Pentru cuantificarea microARN și pri-microARN din probele de placentă de șoareci am optat pentru o metodă de izolare și purificare ARN de dimensiuni mici din probe biologice (kitul *mirVana* miRNA Isolation, Ambion), urmat de revers-transcripție (kitul TaqMan MicroRNA Reverse Transcription, applied biosystems) și cuantificarea prin qPCR (kitul Universal Master Mix no UNG II, Applied Biosystems) folosind primeri specifici.

Similar expresiei în probele de vilozități coriale umane, let-7c este subexprimat și în probele de placentă de șoarece (FC=0,7), dar modificările nu sunt semnificative din punct de vedere statistic (valoarea $p=0,17$) în placenta șoarecilor transgenici comparativ cu cea provenită de la șoareci normali.

Analiza expresiei let-7c în funcție de sexul embrionilor, a evidențiat o scădere a expresiei let-7c atât în probele de placentă asociate embrionilor de sex feminin, cât și în cele asociate embrionilor de sex masculin, fără modificări semnificative de expresie în placenta șoarecilor transgenici comparativ cu cei normali.

Studiul 5. Analiza bioinformatică a microARN semnificativ diferențiați

Pentru a releva semnificația biologică a supra-expresiei miR-99a în probele de lichid amniotic, am folosit algoritmul miRWalk3.0 pentru a determina lista de gene țintă ale miR-99a și am obținut 2134 gene (intrări unice) care sunt ținte potențiale a miR-99a. Apoi, am comparat această listă de gene cu setul de gene diferențial exprimate în amniocite (GSE16176) și țesut cardiac fetal (GSE1397, GSE1789) cu SD, rezultate după analiza Geo2R (p ajustat <0.05), și am obținut două seturi de 187 și, respectiv, 208 gene diferențial exprimate în sindromul Down și posibile ținte ale miR-99a (175,176). Analiza ontologică efectuată ulterior folosind algoritmul GATHER (p ajustat <0.05 , factor Bayes ≥ 10) a evidențiat două căi de semnalizare semnificativ exprimate ca potențiale ținte ale miR-99a atât în amniocite cât și în celulele fetale cardiace trisomice: adeziunea focală și interacțiunea receptorilor citokin-citokinici.

Pentru a evalua semnificația biologică a expresiei scăzute a let-7c în probele de vilozități coriale, am analizat impactul pe care acesta îl are asupra expresiei genice la nivel placentar. În urma analizei de predicție miRWalk3.0 am obținut 1828 gene care interacționează semnificativ cu let-7c și a căror expresie poate fi influențată de alterarea expresiei let-7c. Pentru a evalua care dintre aceste gene sunt diferențial exprimate în placentele provenite din sarcini cu sindrom Down, am interogată setul de date GSE70102 (GEO DataSets), iar în urma analizei Geo2R am obținut 1786 gene diferențial exprimate în probele de

placentă cu trisomie 21 ($p < 0,05$, după corecție Benjamini & Hochberg) (217). Dintre acestea, 214 gene se regăsesc în lista de gene care interacționează cu let-7c conform miRWalk, fiind potențiale ținte ale expresiei alterate a let-7c. Analiza ontologică efectuată ulterior folosind algoritmul GATHER (p ajustat $< 0,05$, factor Bayes ≥ 10) a evidențiat cinci căi de semnalizare semnificativ exprimate în placentă sarcinilor trisomice ca potențiale ținte ale let-7c: Jak-STAT, adeziuni focale, interacțiunea citokine-receptori pentru citokine, căile de semnalizare ale insulinei și apoptoza.

Discuții și concluzii

Ipoteza de la care am pornit este că prezența a trei copii (totale sau parțiale) ale cromozomului 21 determină supraexpresia microARN cartajii pe cromozomul 21 (miR(21)), iar aceasta se va regăsi la nivelul vilozităților coriale și a celulelor amniotice. Cu toate acestea, expresia majorității miR(21) nu este semnificativ modificată din punct de vedere statistic în probele de lichid amniotic și vilozități coriale provenite de la sarcini cu trisomie 21 comparativ cu sarcini normale. Analiza expresiei miR[21] din probele de lichid amniotic provenite de la sarcini cu făt de sex feminin și sindrom Down comparativ cu sarcinile euploide de același sex a arătat o expresie semnificativ crescută a miR-99a, dar nu și a pri-miR-99a, ceea ce sugerează alterarea mecanismului de formare și/sau de menținere a stabilității hsa-miR-99a la feții de sex feminin. Rezultatele obținute sunt promițătoare dar este evident că sunt necesare mult mai multe studii, care să includă un număr mai mare de cazuri, pentru a demonstra utilitatea miR-99a ca biomarker pentru diagnosticul prenatal (eventual non-invaziv) al sindromului Down.

Un alt scop al acestui studiu este de a evalua impactul pe care miR[21] diferențial exprimați îl au asupra defectelor congenitale cardiace în sindromul Down. Supra-expresia miR-99a în probele de lichid amniotic provenite de la sarcini trisomice cu făt de sex feminin poate altera semnificativ căile de semnalizare implicate în morfogeneza cardiacă. Dezvoltarea cardiacă implică etape multiple, parțial suprapuse, controlate de o rețea conservată evolutiv de căi de semnalizare și de reglatori ai transcripției, dintre care microARN în general (și în particular, miR-99a, prin alterarea semnalizării Nodal1/Smad2)) joacă un rol important (181, 187, 222). Multiple dovezi indică asocierea expresiei miR-99a cu defectele cardiace la feții de sex feminin cu SD (180). În plus, miR-99a este implicat precoce în cardiomiogeneză, iar creșterea nivelurilor plasmatiche ale miR-99a a fost asociată cu prezența defectelor cardiace fetale congenitale. Dată fiind comunicarea bidirecțională rapidă între făt și lichidul

amniotic, este absolut plauzibil ca inima fetală să fie o posibilă sursă a miR-99a plasmatic (182,183).

Folosind algoritmul GATHER, analiza căilor de semnalizare KEGG a posibilelor ținte ale miR-99a exprimate în amniocitele SD și țesutul cardiac fetal, indică două căi de semnalizare conservate: interacțiuni focale de adeziune și interacțiuni cu receptorii citokin-citokinici.

Datele noastre sugerează că supraexpresia miR-99a în lichid amniotic nu este un eveniment transcripțional, ci mai degrabă o alterare a mecanismului de degradare a formei mature a microARN. Distrugerea microARN este mai puțin cunoscută decât biogeneza, iar mulți factori (de la organizarea genomică, heterogenitatea structurală și modificările post-transcripționale, până la multitudinea targeturilor și contextul biologic) sunt cunoscuți ca modulatori ai degradării microRNA (208).

Din cunoștințele noastre, acesta este primul raport care indică o stabilitate alterată/degradare a unui microARN în mediul trisomic, oferind un nou posibil mecanism molecular pentru înțelegerea dozajului genic în sindromul Down.

Deși miR-99a este singurul miR(21) semnificativ exprimat din punct de vedere statistic, este important de menționat că, contrar așteptărilor, let-7c are o expresie scăzută atât în probele de lichid amniotic, cât și în cele de vilozități coriale, iar patternul de expresie se regăsește în expresia similară a transcriptului primar, pri-let-7c, care este semnificativ sub-exprimit în probele de vilozități coriale. Rezultatele au fost confirmate prin repetarea experimentului din probe de placentă de șoareci transgenici Dp(16)1Yey/+, însă, similar hsa-let-7c, modificările nu au fost semnificative statistic. Aceste date sugerează că modificările de expresie ale formelor mature ale microRNA în sindromul Down pot avea cauze diferite, operante la nivel transcripțional sau post-transcripțional.

Analiza bioinformatică pe care am realizat-o utilizând genele țintă ale let-7c și diferențial exprimate în placentele trisomice, a descris 5 căi de semnalizare: Jak-STAT, adeziuni focale, interacțiunea citokine-receptori pentru citokine, căile de semnalizare ale insulinei și apoptoza, efectul expresiei let-7c asupra primelor trei fiind, cel mai probabil, mediat de interacțiunea cu lin28 (105-107).

Cu toate că sunt necesare date suplimentare privind anomalile cardiace în sarcinile cu sindrom Down pe care le-am evaluat, îndrăznim să propunem o posibilă noua asociere între nivelul de expresie a miR-99a în lichidul amniotic și defectele cardiace la feții de sex feminin, în general, și sindrom Down, în special. Sunt necesare studii suplimentare pe un lot mult mai mare de probe, pentru a înțelege dacă nivelul semnificativ crescut al expresiei miR-99a în lichidul amniotic este predictiv pentru defectele cardiace fetale și dacă modificările

sugerate de alterare a procesării post transcripționale/ degradare sunt de asemenea prezente la feții de sex masculin cu sindrom Down (222).

Bibliografie:

18. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci.* 2015;22:41.
24. Lana-Elola E, Watson-Scales SD, Fisher EM, Tybulewicz VL. Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Dis Model Mech.* 2011;4(5):586-95.
25. Randall J. Roper RHR. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet.* 2006;2(3):e50.
1. Lola Cartier LM-K. Counselling Considerations for Prenatal Genetic Screening. *J Obstet Gynaecol Can.* 2012;34(5):489-93.
4. O'Connor C. Trisomy 21 causes Down syndrome. *Nature Education* 2008;1(1):42.
62. Gratacos E, Nicolaides K. Clinical perspective of cell-free DNA testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):151-5.
67. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(3):249-66.
98. Friedman RC FK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.
131. Tarang S, Weston MD. Macros in microRNA target identification: a comparative analysis of in silico, in vitro, and in vivo approaches to microRNA target identification. *RNA Biol.* 2014;11(4):324-33.
132. Patrick S. Mitchell RKP, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogossova-Agadjanyan, Amelia Peterson, Jennifer Noteboom, Kathy C. O'Briant, April Allen, Daniel W. Lin, Nicole Urban, Charles W. Drescher, Beatrice S. Knudsen, Derek L. Stirewalt, Robert Gentleman, Robert L. Vessella, Peter S. Nelson, Daniel B. Martin, Muneesh Tewari. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-8.
133. Gilad S ME, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, et al. . Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. *PLoS ONE* 2008;3(9):e3148.
134. Arroyo JDea. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):5003-8.
135. Vickers KCea. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13(4):423-33.
136. Wang Kea. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010;38(20):7248-59.
137. Hunter MP. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3(11):e3694.

168. Katerina Kotlabova JD, Daniel Chudoba, Pavel Calda, Klara Dlouha, Ilona Hromadnikova Extracellular chromosome 21-derived microRNAs in euploid & aneuploid pregnancies. *Indian J Med Res* 2013;138:935-43.
175. Ionim DK, Koide K, Johnson KL, Tantravahi U et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9425-9.
176. Mao R, Wang X, Spitznagel EL Jr, Frelin LP et al. Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol*. 2005;6(13):R107.
217. Bianco K, Gormley M, Farrell J, Zhou Y et al. Placental transcriptomes in the common aneuploidies reveal critical regions on the trisomic chromosomes and genome-wide effects. *Prenat Diagn*. 2016; 36(9):812-22.
181. Coppola A, Romito A, Borel C, Gehrig C, Gagnebin M, Falconnet E et al. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res*. 2014; 12(2):323-37.
187. Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, Hajjar RJ, Bridges CR. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310(5):H528-41.
222. Vizitiu Anda Cornelia, Stambouli Danae, Pavel Anca-Gabriela, Mureşan Maria-Cezara, Anastasiu Diana Maria, Bejinar Cristina, Alexa Anda, Marian Cătălin, Sîrbu Ioan-Ovidiu, Sima Laurenţiu. Mature miR-99a upregulation in the amniotic fluid samples from female fetus Down syndrome pregnancies: a pilot study. *Medicina* 2019, 55, 728; doi:10.3390/medicina55110728.
180. Izzo A, Manco R, de Cristofaro T et al. Overexpression of Chromosome 21 miRNAs May Affect Mitochondrial Function in the Hearts of Down Syndrome Fetuses. *Int J Genomics*. 2017;2017:8737649.
182. Kehler L, Biro O, Lazar L, Rigo J, Nagy B. Elevated hsa-miR-99a levels in maternal plasma may indicate congenital heart defects. *Biomedical Reports*. 2017; 3(6):869-873.
183. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol*. 2005; 25(5):341-8.
208. Marzi MJ, Ghini F, Cerruti B, de Pretis S, Bonetti P et al. Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res* 2016; 26(4):554-65.
105. Nachmani D, Zimmermann A, Oiknine Djian E, Weisblum Y, Livneh Y, Khanh Le VT, et al. MicroRNA editing facilitates immune elimination of HCMV infected cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(2):e1003963.
106. Haruhiko Siomi MCS. Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Molecular Cell* 2010;38(3):323-32.
107. Julia Starega-Roslan EK, Piotr Kozłowski, Włodzimierz J. Krzyżosiak The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:2859–71.