UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi

**Análise da expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T em
pacientes com Esclerose Múltipla**

Ribeirão Preto – SP

2013

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi

**Análise da expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T em
pacientes com Esclerose Múltipla**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas-Área
de Genética.**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr, FMRP/USP

Colaboradores: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira, FMRP/USP
Prof. Dra Doralina Guimarães Brum, UNESP/Botucatu
Prof. Dra Maja Jagodic, Karolinska Institutet/Solna, Sweden

Ribeirão Preto – SP

2013

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

Lorenzi, Julio Cesar Cetrulo

Análise da expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T em pacientes com Esclerose Múltipla. Ribeirão Preto, 2013.

100p.:II; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva jr, Wilson Araújo

1. autoimunidade. 2. esclerose múltipla. 3 linfócitos T.
4. miRNAs

FOLHA DE APROVAÇÃO

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi

Análise da expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T em pacientes com Esclerose Múltipla.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Esta Tese recebeu fomento da Fundação de
Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FAPESP, processo 2010-00310-1**

“Não tenho talentos, sou apenas apaixonadamente curioso”

Albert Einstein

Dedicatória

*Aos meus Pais Acácio e Helena, meu irmão
Gustavo por todo incentivo amor e carinho.*

*A minha esposa Valéria por sua energia,
companheirismo e amor incondicional,*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Wilson Araújo da Silva Jr. por confiar no meu potencial, estimular meu progresso acadêmico, incentivar o meu interesse em bioinformática por todas oportunidades dadas para meu crescimento intelectual. Agradeço pelos ensinamentos, pelas sugestões.

À Dalila Zanete, um agradecimento especial, por sua amizade em todos momentos desses últimos quase 5 anos e por ter me ensinado o caminho das pedras no árduo mundo da biologia molecular em larga escala.

Aos antigos, atuais e novos amigos do LGMB, Carla Kaneto, Cristiane Aires, Ane Marie, Greice, Meire, Daniel Vidal, Naty, Rafaela, Luiza, Bruna Muys, Cleidson, Aline, Carol, Ana Julia, Isabela e Daniel Fantozi, pela convivência no laboratório, ensinamentos valiosos e ajuda essencial no desenvolvimento do projeto.

Também agradeço aos amigos do BIT; Marcelo, Israel Tojal, Daniel Guaris, Tiago, Leonardo Rippel, Simon Coetzee, e em especial ao Matheus (BIGER) por me auxiliar e ensinar no uso do R/Bioconductor. Um agradecimento especial também ao Prof. Dr. Houtan Noushmehr por toda ajuda e incentivo intelectual.

A todos os integrantes dos Laboratórios de Cultura Celular, Biologia Molecular e Transferencia Gênica, em especial a; Tathiane Malta, Virgina, Kátia, Maurício, Aline Ferreira, Lucas, Ricardo Bonfim. A todos funcionários do Hemocentro em especial ao laboratório de Citometria de Fluxo, especialmente a Patrícia, Camila e Daiane, pela ajuda inestimável, pela paciência e por todas as conversas nos longo experimentos de sorting e fenotipagem.

Aos integrantes do ambulatório de Neuro-muscular do HCFMRP-USP, em especial para a Dra. Doralina Guimaraes Brum por sua ajuda na seleção dos pacientes e ao Dr. Amilton Antunes Barreira por toda ajuda na seleção dos pacientes e por possibilitar a colaboração. A Susie, secretária do Departamento de Genética, pela dedicação, atenção e paciência.

Agradeço também especialmente a Dra. Maja Jagodic e o Dr. Thomas Olsson do Instituto Karolinska, por me receberem em seus laboratórios na Suécia. Neste laboratório também agradeço a; Petra Bergman, Sabrina Ruhrman, Lara Kullar e André Ortileb, pela ajuda nos experimentos e principalmente por tornar mais suave a estada no inverno severo da Suécia. Às agências de fomento: FAPESP, CNPq, FAEPA, FUNDERHP pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

LORENZI, J.C.C. **Análise da expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T em pacientes com Esclerose Múltipla**. 2013, 100f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O presente estudo discute o papel dos miRNAs na “fisiopatologia molecular” de Esclerose Múltipla Recorrente Remitente (EMRR). O estudo demonstrou que em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com EMRR em surto ocorre a diminuição da expressão do miR-15a e do miR16-1 em contraposição ao aumento de seu gene alvo BCL-2, um importante gene regulador da apoptose. Esses achados sugerem a participação desses miRNAs no controle da apoptose na EM. Para explorar essa associação, foi analisado a expressão global de miRNAs nas subpopulações de linfócitos T de pacientes com EMRR no estágio de remissão. O resultado dessa análise determinou de forma inédita o aumento significativo da expressão de 9 miRNAs (miRNAs-16, miRNAs-20a, miRNAs-21, miRNAs-24, miRNAs-155, miRNAs-221, miRNAs-222, miRNAs-720 e miRNAs-1281) nos linfócitos T CD8⁺ de memória central. A análise *in silico* dos alvos desses miRNAs indicou que três vias canônicas, relacionadas à ativação da apoptose, eram enriquecidas com alvos preditos e validados experimentalmente desses miRNAs. Desse modo sugerimos a forte relação desses miRNAs no controle da apoptose nos linfócitos T dos pacientes com EMRR. A fim de aprofundar nossos estudos, selecionamos os miRNAs miR-21 e miR-24, para a realização de experimentos funcionais *in vivo*. Foi verificada a indução da expressão miR-21 somente nos linfócitos T CD4⁺ de modelo experimental da EM. Adicionalmente, experimentos *in vitro* demonstraram que a expressão do miR-21 é restrita as populações de células Th2 e Th17. Nesse caso, miR-21 parece ser regulado pelo fator de transcrição STAT3, sugerindo assim que o aumento da expressão do miR-21 verificada no modelo animal possa estar relacionada com a presença de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th17 nesse tecido. Em resumo, o conjunto desses resultados demonstra a relevância dos miRNAs na fisiopatologia da EMRR, principalmente no controle da apoptose.

Palavras chave: autoimunidade, esclerose múltipla, linfócitos T, miRNA.

ABSTRACT

LORENZI, J.C.C. **miRNA expression analysis in T lymphocytes subpopulations from Multiple sclerosis patients.** 2013, 100f. Thesis (PhD). School of Medicine of Ribeirão Preto University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2013.

This study discusses the role of miRNA in the “Molecular Pathophysiology” of Relapse Remitting Multiple Sclerosis (RRMS). The study has shown that CD4⁺ lymphocytes from relapsed RRMS patients had lower expression of miR15a and miR-16-1 in contraposition of higher expression of the target gene BCL-2, a key regulator of apoptosis. These findings suggest the role of those on the control of apoptosis in MS. In order to explore this association, the global expression of miRNAs was analysed in T lymphocyte subpopulations from remission RRMS patients. The result of this analysis has demonstrated for the first time a significant higher expression of 9 miRNAs (miRNAs-16, miRNAs-20a, miRNAs-21, miRNAs-24, miRNAs-155, miRNAs-221, miRNAs-222, miRNAs-720 e miRNAs-1281) in central memory T CD8⁺ lymphocytes. *In silico* analysis of the miRNAs targets indicates that three canonical pathways related to the activation of apoptosis were enriched with predicted and experimental validated gene targets for those miRNAs. In this way, we suggest the strong relation of these miRNAs in the control of apoptosis in the lymphocytes from RRMS patients. In order to intensify our studies we selected miR-21 and miR-24 to perform *in vivo* functional experiments. It was verified miR-21 induction only in T CD4⁺ lymphocytes from MS animal model. Additionally, *in vitro* experiments have demonstrated that miR-21 expression was restricted to Th2 and Th17 cell populations. In this way, miR-21 seems to be regulated by the STAT3 transcription factor, thereby suggesting that the increase of miR-21 expression observed *in vivo* could be related with Th17 CD4⁺ present in this tissue. In summary, this set of results showed the relevance of miRNAs in the RRMS pathophysiology, mainly in the control of apoptosis.

Keywords: autoimmunity, multiple sclerosis, T lymphocytes, miRNAs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Esclerose múltipla.....	13
1.2 MicroRNAs como moduladores da Expressão Gênica	16
1.3 MicroRNAs e o Sistema Imune	18
1.4 MicroRNAs e a Esclerose Múltipla	20
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Coleta das amostras	26
4.1.1 Controles saudáveis	26
4.1.2 Pacientes portadores de EMRR em estágio de surto	26
4.1.3 Pacientes portadores de EMRR em estágio de remissão	27
4.2 Coleta dos indivíduos da população Sueca.....	28
4.2.1 Controles saudáveis	28
4.2.2 Pacientes portadores de EM	28
4.3 Obtenção das populações de células sanguíneas	29
4.3.1 PBMC e linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	29
4.3.2 Extração e processamento do RNA total.....	30
4.3.3 Análise da expressão dos miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-155.	30
4.3.4 Análise da expressão do gene BCL-2.....	31
4.3.5 Fenotipagem das subpopulações de linfócitos.....	31
4.3.6 Obtenção das subpopulações de Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	32
4.3.7 Extração de RNA das subpopulações isoladas por <i>Sorting</i>	34
4.3.8 Análise da qualidade do RNA extraído	34
4.3.9 Análise quantitativa da expressão dos miRNAs utilizando a metodologia de microarranjos de miRNA.....	35
4.3.10 Análise bioinformática dos experimentos de microarranjos de miRNA	36
4.3.11 Avaliação da expressão dos miRNAs pela técnica de PCR em tempo real.....	36

4.3.12 Análise bioinformática dos genes alvos dos miRNAs validados	37
4.4 Experimentos em Ratos	38
4.4.1 Indução da encefalomielite auto-imune experimental (EAE) em ratos.....	38
4.4.2 Obtenção dos linfonodos e subpopulações celulares dos Ratos induzidos com EAE	39
4.4.3 Obtenção de linfócitos T CD4 ⁺ Naive de ratos	39
4.4.4 Proliferação <i>in vitro</i> de linfócitos T CD4 ⁺ de ratos	40
4.4.5 Diferenciação <i>in vitro</i> de linfócitos T CD4 ⁺ de ratos DA	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Os miRNAs miR-15a e miR-16-1 são menos expressos em PBMC proveniente de pacientes com EMRR em surto	42
5.1.1 Os miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-155 são menos expressos em linfócitos T CD4 ⁺ mas não em linfócitos T CD8 ⁺ proveniente de pacientes com EMRR em surto	42
5.1.2 O gene BCL2, alvo dos miRNAs 15a e 16-1, apresentou expressão aumentada em PBMCs e linfócitos T CD4 ⁺ provenientes de pacientes com EMRR em surto	44
5.2 Avaliação do perfil de expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ isolados de pacientes com EMRR em estágio de remissão	45
5.3 Análise pareada do perfil de expressão de miRNAs entre as subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ isolados de pacientes com EMRR em estágio de remissão e amostras controles.	47
5.4 Validação da expressão gênica dos miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações de linfócitos T	55
5.5 Redes gênicas possivelmente afetadas pela expressão dos miRNAs nas células de memória central CD8 ⁺ em pacientes com EMRR em estágio de remissão	61
5.6 Comparação da expressão dos miRNAs miR-21 e miR-24 em linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em pacientes com EMRR e EMSP do Brasil e da Suécia	68
5.7 Indução do miR-21 durante o curso da EAE.....	69
5.8 Regulação <i>in vitro</i> do miR-21 em resposta a estímulos específicos durante a proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺	69
5.8.1 Proliferação.....	69
5.8.2 Diferenciação.....	70
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Associação do miRNAs miR-15a e 16-1 na modulação de vias de apoptose em em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com EMRR em surto	72
6.2 Pacientes com EMRR em remissão apresentam diminuição do número de linfócitos T CD8 ⁺ de memória central.....	73

6.3 Expressão elevada de miRNAs em linfócitos T CD8 ⁺ de memória central em pacientes com EMRR em remissão	74
6.4 Regulação da apoptose por miRNAs em linfócitos T CD8 ⁺ de memória central	76
6.5 Expressão aumentada do miR-21 em linfócitos CD4 ⁺ em modelo animal de EM.....	78
7 CONCLUSÕES.....	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS.....	94
ARTIGO PUBLICADO	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante inflamatória crônica, autoimune, confinada ao SNC. As proteínas da bainha de mielina constituem os alvos das agressões (PETTE *et al.*, 1990).

A EM é altamente prevalente em caucasianos e estima-se que pelo menos 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela doença (WEINSHENKER *et al.*, 1989; WEINSHENKER *et al.*, 1991; COTTRELL *et al.*, 1999; EBERS *et al.*, 2000; KREMENCHUTZKY *et al.*, 2006; SCALFARI *et al.*, 2010). A sua prevalência é entre 1/500 e 1/1500 na população da Europa, América do Norte e Austrália, afetando principalmente adultos jovens, com idade entre 15 e 45 anos, sendo as mulheres duas vezes mais afetadas em relação aos homens (NYLANDER e HAFLER, 2012). No Brasil a prevalência da doença é de aproximadamente 18 casos por 100 000 habitantes (LANA-PEIXOTO *et al.*, 2012)

A doença pode ocorrer em surtos com manifestações neurológicas focais extremamente variáveis (de formigamentos a tetraplegias). Esses surtos, particularmente no início da doença, são espontaneamente reversíveis ou podem ser revertidos com tratamento adequado, podendo ou não deixar sequelas. Essas sequelas tendem a se acumular ao longo do tempo, de tal maneira que 80% dos pacientes apresentam algum tipo de sequela grave com o passar do tempo. Essa forma clínica da doença é denominada Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente (EMRR) (KALMAN e LUBLIN, 1999). Outra forma clínica da doença é a secundariamente progressiva, ou seja: há progressão contínua da doença, independentemente do tratamento. Essa progressão pode ter caráter exclusivamente contínuo ou pode haver surtos se sobrepondo à referida progressão contínua e agravando mais ainda a doença (THOMPSON *et al.*, 1991). Outra forma de apresentação é a forma progressiva primária, quando ocorre progressão contínua muito lenta

desde o diagnóstico, com lesões não muito extensas à ressonância magnética nuclear (BARREIRA, 2008), porém muito debate tem sido gerado sobre a real correlação deste tipo de EM com os outros uma vez que este tipo tem sintomas muito diferentes (ANTEL *et al.*, 2012)

Uma das teorias correntes para explicar a EM é de que esta seja uma doença autoimune decorrente da interação de um ou mais fatores ambientais em indivíduo que tenha predisposição genética para adquiri-la. A doença seria poligênica e cada gene influenciaria a susceptibilidade genética à doença, em pequena intensidade. Essa teoria foi reafirmada recentemente pela definição de diversos alelos distribuídos pelo genoma que conferem risco a EM (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS *et al.*, 2011). O infiltrado inflamatório com linfócitos T, macrófagos, linfócitos B e axônios desmielinizados, circunjantes a uma vênula, são a marca registrada da patologia da EM (KASPER e SHOEMAKER). Tais lesões podem ocorrer em qualquer área do SNC onde haja axônios mielinizados. As imagens de lesões desmielinizantes vistas à ressonância magnética (RM) paralelizam os achados neuropatológicos quanto à forma, localização e natureza inflamatória da lesão. As lesões visualizadas em T2 (brilhantes) são inespecíficas podendo significar inflamação, gliose, edema, desmielinização, remielinização, degeneração Walleriana e perda axonal. Após a infusão de contraste, o realce de uma ou mais lesões pode ocorrer, significando inflamação ativa e sugerindo a quebra localizada da barreira hematoencefálica (BHE) (MONTALBAN *et al.*, 2010). Esse evento pode ser assintomático ou se apresentar na forma de surto. Esse se caracteriza por sintomas neurológicos focais, geralmente sugestivos de acometimento do nervo óptico, medula espinhal e tronco cerebral, de instalação subaguda em dias a semanas, atingem um platô onde se mantém por tempo variável seguido de resolução parcial ou completa. O período de remissão vai até o próximo surto. A realização de RM, particularmente durante os surtos e antes do uso de corticosteroides pode demonstrar lesões com captação de contraste, que significam quebra de barreira hematoencefálica, na topografia sugerida pelos sintomas e sinais ou outra(s) (BECKMANN *et al.*, 2009).

A inflamação na EM corresponde à resposta imune adquirida contra componentes da bainha de mielina, semelhante à que ocorre na encefalite alérgica experimental (EAE) murina (MACKAY e ANDERSON, 2010). A EAE pode ser induzida em animal sadio através de inoculação de células T CD4⁺ reativas à PBM (proteína básica de mielina). No homem não é conhecida a gênese da doença ou quais são os antígenos-alvo da mesma. É descrito que linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, células B e anticorpos, células NK, macrófagos, moléculas do complemento, citocinas e quimiocinas participam na patogênese (WEINER, 2009). O conjunto de evidências mais convincentes de participação na resposta imune está relacionado às células T CD4⁺. Essas células estão presentes no infiltrado inflamatório do SNC e no líquido céfalo raquidiano (LCR). A maior quantidade de linfócitos T ativados, específicos contra a mielina, parece ser o evento central na EM. A migração de células T ativadas contra a mielina, através da barreira hematoencefálica inicia a sequência de eventos inflamatórios locais (BAHBOUHI *et al.*, 2009). O processo de extravasamento de leucócitos para as regiões de inflamação se dá inicialmente através do enfileiramento dos leucócitos ao longo da superfície interna das células endoteliais dos vasos. Tal evento ocorre pela ativação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular-1 (VCAM-1) (ALLAVENA *et al.*, 2010). A manutenção do processo é garantida pela ação de quimiotáticos como C5a e fator ativador de plaqueta (FAP) (THORNTON *et al.*, 2010). Desse modo, ocorre uma amplificação local da inflamação e ativação de células apresentadoras de antígenos, como as da micróglia.

Nesse ambiente ocorre a indução de diferentes mecanismos celulares efetores e reguladores do processo inflamatório específico envolvendo diretamente os linfócitos T reguladores (Treg) e as células efectoras. Tem sido descrito que não ocorre mudança em termos numéricos das Tregs em pacientes com EM, porém já foi demonstrado que ocorre uma deficiência funcional dessas células em pacientes com EM (VENKEN *et al.*, 2008).

Na EM, o surto reflete a atividade inflamatória focal autolimitada e a recorrência pode sugerir um desequilíbrio de função entre subpopulações celulares *naïves* (virgens), de

memória, as capazes de lesar (células efetoras) e as de suprimir a função de células T autorreativa (células reguladoras). A compreensão da imunopatogenia da EM passa, necessariamente, pela identificação de fatores contribuintes para o desencadeamento e resolução do surto (BARREIRA, 2008).

1.2 MicroRNAs como moduladores da Expressão Gênica

Os Micro RNAs (miRNAs) representam uma classe de RNAs pequenos e funcionais, variando de 19-23 nucleotídeos quando maduros e tem como precursores moléculas em forma de alça que apresentam tamanho variando de 60-100 nucleotídeos (GARCIA *et al.*, 2011). Centenas de miRNAs tem sido identificados em plantas e animais, estando envolvidos nos mais variados processos biológicos (AMBROS, 2003). Sua ação ocorre desde o processo de diferenciação e proliferação celular (AMBROS, 2004), passando pela etapa de desenvolvimento celular, até processos de regulação mais refinados como a resposta ao estresse, o metabolismo de ácidos graxos e a regulação da expressão gênica (AMBROS, 2001). Além disso, já foi descrita a participação de diversos miRNAs em processos patológicos como no câncer gástrico (GUO *et al.*, 2009) e no câncer de colo de útero (GILABERT-ESTELLES *et al.*, 2012).

Atualmente está bem estabelecido que a desregulação de miRNAs pode dirigir ou contribuir para a tumorigênese. miRNAs superexpressos em tumores podem agir como oncogenes quando seus alvos são genes supressores tumorais; já miRNAs subexpressos quando do estabelecimento do câncer podem agir como supressores tumorais se seus alvos são oncogenes (CROCE, 2009). A desregulação dos miRNAs na tumorigênese pode-se dar por meio de vários mecanismos, como defeitos em sua biogênese; rearranjos cromossômicos; mutações de ponto em genes codificadores ou devido à desregulação transcricional. Dentro deste último mecanismo estão incluídas alterações

nas modificações epigenéticas nas regiões promotoras de genes de miRNAs, sendo a metilação do DNA uma das mais importantes destas alterações (LAGES *et al.*, 2012). Dessa forma, miRNAs que agem como supressores tumorais podem ser silenciados através da hipermetilação de ilhas CpGs em suas regiões promotoras (CROCE, 2009). O controle da expressão de determinado miRNA por metilação do DNA pode ser confirmado por meio de sua superexpressão após o uso de drogas demetilantes, como a 5-Aza-2'-deoxicitidina, que inibe a DNA metiltransferase (DNMT), em culturas de células tumorais (CROCE, 2009; LAGES *et al.*, 2012).

De maneira geral a ação dos miRNAs ocorre da seguinte forma: inicialmente os miRNAs são transcritos a partir de seus genes formando sequências longas de RNAs primários (pri-miRNAs). Usualmente os pri-miRNAs tem uma estrutura de CAP e uma calda poli-A, como qualquer RNA mensageiro (RNAm), com transcrição realizada também pela RNA polimerase II (SHIN *et al.*, 2009). No núcleo, os pri-miRNAs são processados pela proteína Drosha, membro da família de enzimas RNase II, a fim de formar os precursores de miRNAs (pre-miRNAs) que tem um tamanho variando de 60 a 100 nucleotídeos e uma estrutura de dupla fita em forma de alça. Os pré-miRNAs são então exportados do núcleo para o citoplasma com o auxílio da exportina-5. Uma vez no citoplasma os pré-miRNAs são processados pela proteína Dicer, outra proteína da família das RNases II. Esse processamento leva a produção de uma sequência de RNA dupla fita com aproximadamente 22 nucleotídeos que é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA de uma maneira análoga à observada no mecanismo dos siRNAs (LIU, FORTIN e MOURELATOS, 2008). Uma vez nesse complexo, uma das fitas do pré-miRNA é retida formando o miRNA maduro e a outra restante normalmente é degradada. Esse complexo agora pode atuar nos RNAs alvos. O miRNA maduro ligado ao complexo de silenciamento age se ligando a região 3' não traduzida do RNAm (MAJOROS e OHLER, 2007), e a partir dessa ligação a tradução do RNAm alvo é inibida (GU *et al.*, 2009).

1.3 MicroRNAs e o Sistema Imune

A importância geral dos miRNAs durante a hematopoiese tem sido investigada pela deficiência de proteínas específicas do processamento dos miRNAs. A deleção condicional da proteína Dicer em células tronco hematopoiéticas tornou essas células incapazes de reconstituir o sistema hematopoiético, enquanto que a deleção da proteína Argonaute 2, proteína do complexo de silenciamento, com função crítica nessas mesmas células, resultou em uma produção imperfeita de linfócitos B. Na diferenciação de eritrócitos, a deleção dessa proteína culminou na expansão descontrolada da população de eritrócitos (O'CARROLL *et al.*, 2007). A deleção condicional de proteína Dicer em linfócitos T resultou na diminuição da contagem dessas células no timo e na periferia (MULJO *et al.*, 2005). Já em linfócitos B, a mesma deleção levou a diminuição da sobrevivência dessas células e também na produção anormal e muito menos variável de anticorpos (XU *et al.*, 2012). Esses dados demonstram de maneira geral uma função crítica para os miRNAs na biologia das células que compõe o sistema imune, uma vez que a ausência dos mesmos leva a diversos defeitos nas funções das células estudadas.

O miR-150 tem tido destaque na literatura pela sua associação com a diferenciação dos linfócitos B em camundongos sob o controle do fator de transcrição C-Myb (BRUCHOVA *et al.*, 2009). Também em camundongos, foi realizado um estudo profundo de expressão gênica de linfócitos T baseado em *microarrays* de miRNAs. O mesmo demonstrou que essas células tem uma expressão elevada dos miRNAs miR-16, miR-21, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-15b e let-7f em linfócitos T *naive* e de memória. Porém, quando essas células estão ativadas ocorre uma diminuição marcante da expressão desses miRNAs. A única exceção é o miR-21 que se mantém altamente expresso (WU *et al.*, 2007). Os autores sugerem que a mudança do perfil de expressão dos miRNAs esteja ligada ao fato do linfócito T ativado necessitar de um maior repertório proteico para exercer sua função. Outra importante célula do SI que teve a expressão de um miRNA

específico determinada, ligado a diferenciação celular, é o linfócito T da subpopulação regulatória ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) (Tregs). Foi determinado a partir de estudos utilizando camundongos deficientes para o miR-155, a participação desse miRNA na diferenciação das células Tregs (WU *et al.*, 2007). Nesses camundongos a população de Tregs era três vezes menor do que em camundongos normais, porém, quando Tregs provenientes de camundongos deficientes para o miR-155 eram testadas quanto a sua função supressora, foi demonstrado que essa deficiência não interferia na função dessas células, demonstrando que o miR-155 é importante para a diferenciação celular e não para a função das Tregs. Desse modo é possível notar que os miRNAs tem papel muito importante na diferenciação de células do SI. Outro miRNA envolvido na biologia das Tregs é o miR-142-3p que pode regular a expansão destas células pela repressão do gene GARP (ZHOU *et al.*, 2013). Outro grupo de trabalhos relacionados com a identificação de padrões de expressão de miRNAs em diferentes patologias tem demonstrado os mais variados tipos de doenças com destaque em humanos para vários cânceres. Uma busca na literatura mostra 1.433 trabalhos sobre esse tema nos últimos sete anos com grandes avanços produzidos nessa linha de pesquisa. Já foi demonstrado que ocorre uma modulação específica dos miRNAs dependendo do tecido onde ocorre o câncer (ROSENFELD *et al.*, 2008).

Outro importante estudo que contribuiu para a associação dos miRNAs em várias patologias, verificou que pacientes soropositivos para o vírus HIV-1 apresentavam variação no perfil de expressão de miRNAs dependente da carga viral e da contagem de células T $CD4^+$ na corrente sanguínea (HOUZET *et al.*, 2008). Esses resultados abre um caminho para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos clínicos precoces com base no padrão específico de expressão de alguns miRNAs ligados a doenças.

Outros estudos demonstraram a importância dos miRNAs para a resposta imune. Já foi demonstrada a ação do miR-223 na produção de interferon gamma (IFN-g) (DAI *et al.*, 2008). Os autores demonstraram que a diminuição da produção do IFN-g, após indução por LPS, era causada

pela ação do miR-223 quando induzido pelo tratamento de camundongos com estrógeno. Eles concluíram que o estrógeno atuava diretamente na regulação do miR-223, que por sua vez modula a produção dessa citocina. Outro importante estudo demonstrou que a expressão do miR-146 era ativada após a adição de ligantes de receptores do tipo Toll (TLR) (TAGANOV *et al.*, 2006). Esse por sua vez, iria modular a expressão das proteínas IRAK-1 e TRAF-6, que são componentes fundamentais da cascata de resposta imune ativada por ligantes de TLR. Dessa forma o miR-146 seria um ponto de equilíbrio na modulação da expressão dessas proteínas. A figura 1 demonstra que ocorre o aumento da expressão do miR-146 após a adição de diversos ligantes de TLR.

Figura 1. Modulação da expressão gênica do miRNA146 em células THP-1, após a adição de diferentes moléculas ligantes de diferentes TLRs. Reproduzido de (TAGANOV *et al.*, 2006).

1.4 MicroRNAs e a Esclerose Múltipla

Nos últimos anos, vários trabalhos têm estudado a expressão de miRNAs em pacientes com EM em tecidos como células componentes do sangue periférico, cérebro e CSF. Na maioria destes estudos foi encontrada alteração na expressão de miRNAs em pacientes com EM quando comparados com controles saudáveis, portanto uma implicação para os miRNAs nessa doença parece ser evidente. No entanto, observa-se pouca sobreposição entre os diferentes estudos, provavelmente devido à diferença na tecnologia de detecção dos miRNAs, a complexidade do

tecido a ser estudado, e o tamanho relativamente pequeno do grupo amostral em todos os estudos (Tabela 1). Poucos trabalhos foram capazes de estabelecer uma função concreta para alguns miRNAs relacionadas com EM. No exemplo mais concreto, Du e colaboradores descobriram que o miR-326 foi regulado especificamente em pacientes com esclerose múltipla em surto e mais proeminente em células T CD4⁺ em comparação com células T CD8⁺ (DU *et al.*, 2009). Foi então demonstrado que a expressão do miR-326 em células T CD4⁺ promove a diferenciação Th-17 nessas células através da regulação do gene Ets-1, um regulador negativo conhecido de células Th17 (DU *et al.*, 2009). No mesmo trabalho foi demonstrado que camundongos que receberam um inibidor de miR-326 apresentaram uma diminuição de sintomas e em lesões associadas a EAE. Outro estudo também descreveu uma ligação entre inflamação associada a resposta do tipo Th-17 com a regulação do miRNA. Nesse estudo foi observado uma regulação negativa do miR-23b em várias doenças autoimunes ou nos seus modelos animais, incluindo a EAE, relacionado à expressão elevada da citocina IL-17 (ZHU *et al.*, 2012). Outro estudo que analisou o perfil de expressão de miRNA em lesões cerebrais demonstrou a expressão diferencial de miR-155, miR-326 e miR-34a. Usando ensaios de luciferase, os pesquisadores descobriram que gene CD47 era alvejado pelo miR-155. Os autores propõem que a superexpressão desses três miRNAs em cérebro de pacientes com EM promovem a baixa expressão de CD47 em células residentes do cérebro, culminando na fagocitose de mielina por macrófagos (JUNKER *et al.*, 2009). Outro importante estudo em relação ao miR-155 demonstrou que o mesmo tem papel fundamental na EAE uma vez que camundongos deficientes para esse miRNA não desenvolviam os sintomas relacionados a EAE (MURUGAIYAN *et al.*, 2011). Recentemente foi determinado utilizando sequenciamento de RNA em larga escala o perfil de expressão de miRNAs no modelo EAE em ratos (BERGMAN *et al.*, 2013). Nesse trabalho foi determinada a expressão diferencial dos miRNAs entre cepas resistentes e susceptíveis a EAE, onde foi observada variação significativa do miR-181A regulando os genes Cxcr3, Prkcd e STAT1. Esse estudo é muito importante uma vez

que diversos trabalhos utilizam esse modelo para testes de drogas para EM e também devido a esse ser o modelo mais utilizado em estudos de associação genética com a EM.

Tabela 1. Publicações na área de miRNAs e Esclerose Múltipla.

Amostra	Número de Pacientes	Principais resultados	Alvo Validado	Referencia
PBMC	43 EMRR, 40 Controles	miR-326	Ets-1	(DU <i>et al.</i> , 2009)
PBMC	20 EMRR, 19 Controles	miR-145	ND	(KELLER <i>et al.</i> , 2009)
PBMC	18 EMPP, 17 EMSP, 24 EMRR e 37 Controles	miR-17 e miR-20a	ND	(LINDBERG <i>et al.</i> , 2010)
PBMC	9 EMSP, 4 EMRR e 8 Controles	miR-18b e miR-599 miR-96	ND	(OTAEGUI <i>et al.</i> , 2009)
Sangue total	59 EMRR e 37 Controles	miR-17, miR-20a	ND	(COX <i>et al.</i> , 2010)
CD4+T	5 EMPP, 12 EMRR, 5 EMSP e 16 Controles	miR-128, miR-27b, miR-340	IL-4, BMI	(GUERAU-DE-ARELLANO <i>et al.</i> , 2012)
CD4+T	16 EMRR, 6 EMSP, 7 EMPP e 19 Controles	miR-21, miR-146a, miR-146b	ND	(FENOGLIO <i>et al.</i> , 2011)
Plasma	4 EMRR, 4 Controles	miR-614, miR-572, miR-1979, miR-648, miR-422a, miR-1826, miR-22	ND	(SIEGEL <i>et al.</i> , 2012)
PBMC	10 EMRR, 10 Controles	miR-155	ND	(PARABOSCHI <i>et al.</i> , 2011)
EAE - Macrófago e microglia	Grupos de 5 Camundongos	miR-124	C/EBP- α	(PONOMAREV <i>et al.</i> , 2011)
EAE - CD4+ T	Grupos de 8 Camundongos	miR-155	ND	(MURUGAIYAN <i>et al.</i> , 2011)
EAE - Linfonodos Inguinais - CD4+, CD8+, CD45+	Grupos de 8 Ratos	miR-181a, miR-21, miR-125b, miR-223, miR-132, miR-31, miR-203, miR-16-2-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-7-1-3p	Cxcr3, Prkcd, Stat1	(BERGMAN <i>et al.</i> , 2013)
Sangue total	25 CIS, 25 EMRR, 50 Controles	miR-29, hsa-miR-16-5p	ND	(KELLER <i>et al.</i> , 2013)
PBMC	2 CIS e 4 EMRR,	miR-29a, let-7d, miR-744, miR-93, miR-326	ND	(HECKER <i>et al.</i> , 2013)
Plasma, PBMC, CD4+, CD8, NK	20 EMRR e 21 Controles	miR-454, miR-145, miR-92, let7	ND	(SONDERGAARD <i>et al.</i> , 2013)
Plasma	10 EMRR, 9 EMSP, 9 Controles			(GANDHI <i>et al.</i> , 2013)

Outros estudos tem demonstrado a associação de miRNAs como biomarcadores para EM. Já foi determinada uma assinatura de miRNAs que diferencia os pacientes tratados com diferentes tipos de drogas (OTTOBONI *et al.*, 2012) e também os diferentes subtipos de EM (GANDHI *et al.*, 2013), onde foi determinado no plasma de pacientes a expressão diferencial do miR-454 entre pacientes com EMRR em relação a pacientes com EMSP, e do miR-145 que diferenciou indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR em relação a pacientes com EMSP.

Todos esses estudos mostram como os miRNAs estão envolvidos no sistema imunológico e desregulados na EM. Desse modo, o estudo dos mesmos pode auxiliar o melhor entendimento desta doenças.

2 JUSTIFICATIVA

Sabendo-se que o conjunto das células mononucleares é composto por diversas subpopulações de linfócitos, que participam de processos específicos da resposta imune, fica claro a importância de estudos que analisem a expressão específica dos miRNAs em cada subpopulação. Isso facilitaria, em teoria, a identificação da subpopulação que estaria contribuindo de forma mais efetiva para a evolução da doença, quando associada à expressão dos miRNAs.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a modulação da expressão gênica de miRNAs em diferentes subpopulações de linfócitos T isolados de pacientes com EMRR.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 em linfócitos de pacientes com Esclerose Múltipla em estágio de surto.
- Determinar a assinatura de expressão gênica de subpopulações, naive, de memória central, memória efetora RA e regulatórias de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes com Esclerose Múltipla em estágio de remissão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

O presente trabalho foi aprovado pelo CEP do HCFMRP-USP (Processo nº 14/2010) (anexo1). Pacientes e doadores saudáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da doação.

4.1.1 Controles saudáveis

Um total de 23 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram obtidas de doadores de sangue de repetição do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, sob consentimento informado.

4.1.2 Pacientes portadores de EMRR em estágio de surto

Foram coletados 15 pacientes com diagnóstico de EM, selecionados no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. A seleção dos pacientes foi realizada pela Dra. Doralina Guimarães Brum de acordo com os seguintes critérios: Ter o diagnóstico de surto de EMRR confirmado com o exame clínico e de ressonância magnética e não ter iniciado o tratamento para esse surto. A tabela 2 resume os dados demográficos dos pacientes com EMRR em estágio de remissão e os indivíduos controles saudáveis coletados pareados para esse grupo.

Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes

Amostra	Total	Gênero		Idade (anos)	Tempo do diagnóstico	EDSS
		Feminino	Masculino	Média	Média	Média
Ctrl	15	10	5	33	N/A	N/A
EMRR	15	10	5	33.3	5	4.00

Ctrl: Controles Saudáveis, EMRR: Esclerose Múltipla Relapso Remitente. N/A Não Avaliado

4.1.3 Pacientes portadores de EMRR em estágio de remissão

Foram coletados 8 pacientes com diagnóstico de EMRR, selecionados no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob consentimento informado. A seleção dos pacientes foi realizada pela Dra. Doralina Guimarães Brum de acordo com os seguintes critérios: Ter o diagnóstico de EM confirmado com o exame clínico estar em fase de remissão sem tratamento a mais de seis meses. A tabela 3 resume os dados demográficos dos pacientes com EMRR em estágio de remissão e os indivíduos controles saudáveis coletados pareados para esse grupo.

Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes

Amostra	Total	Gênero		Idade (anos)	Tempo do diagnóstico (anos)	EDSS
		Feminino	Masculino	Média	Média	Média
Ctrl	5	4	1	40.2	N/A	N/A
EMRR	5	3	2	39.4	2.6	1.65

Ctrl: Controles Saudáveis, EMRR: Esclerose Múltipla Relapso Remitente. N/A Não Avaliado

4.2 Coleta dos indivíduos da população Sueca

4.2.1 Controles saudáveis

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a declaração de Helsinki e aprovados pelo comitê de ética de Estocolmo, Suécia.

Um total de 15 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram obtidas de doadores de sangue de repetição do Karolinska Universitetssjukhuset Transfusionsmedicin (Departamento de medicina transfusional do Hospital universitário Karolinska) sob consentimento informado.

4.2.2 Pacientes portadores de EM

Foram coletados 30 pacientes com diagnóstico de EM, selecionados no ambulatório de Neurologia do Karolinska Universitetssjukhuset, sob consentimento informado. A seleção dos pacientes foi realizada pelo Dr. Thomas Olsson, de acordo com os seguintes critérios: Ter o diagnóstico de EM confirmado com o exame clínico. A tabela 4 resume os dados demográficos dos pacientes e indivíduos saudáveis coletados na Suécia.

Tabela 4. Dados demográficos dos pacientes coletados na Suécia.

Amostra	Total	Gênero		Idade (anos) Média	Tempo do diagnóstico Média	EDSS Média
		Feminino	Masculino			
Ctrl	16	11	5	40.65	N/A	N/A
EMRR	15	12	3	38.53	5	1.67
EMSP	16	10	6	50.81	12,5	5.94

Ctrl: Controles Saudáveis, EMRR: Esclerose Múltipla Relapso Remitente, EMSP: Esclerose Múltipla Secundária Progressiva, N/A Não Avaliado

4.3 Obtenção das populações de células sanguíneas

4.3.1 PBMC e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

As amostras de sangue periférico foram processadas e posteriormente as células mononucleares periféricas (PBMC) foram separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (GE Helthcare). Para a separação, o sangue coletado foi diluído em uma solução de PBS contendo 10% do anticoagulante ACD na proporção de uma parte de sangue para três de diluente e então foi adicionado 13 ml de Ficoll para cada 35 ml de sangue diluído. A mistura foi então centrifugada a 2000 RPM por 30 min. a temperatura ambiente. Após a centrifugação as células mononucleares foram isoladas a partir da aspiração do anel de células presente na interfase soro/Ficoll. As células aspiradas foram então lavadas duas vezes com PBS. Nesse ponto da separação 1×10^6 PBMC foi separado para extração de RNA. Em seguida, o restante das células foi submetido a uma nova etapa de separação para a obtenção das células CD4⁺ e CD8⁺, que exigiu o uso de esferas imunomagnéticas. Para a separação das células CD4⁺, bem como das células CD8⁺, foram usados os kits Dynabeads FlowComp™ Human CD4 e Dynabeads FlowComp™ Human CD8 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante.

Após esse protocolo, uma alíquota das células isoladas foi checada para a determinação da pureza das mesmas. Para isso 1×10^5 células era marcada com 1 μ L dos anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 por 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente essas células foram lavadas com PBS e adquiridas no citômetro BD CALIBUR (Becton-Dickinson) para fenotipagem, que seguiu as seguintes etapas: 1) primeiramente foi delineada uma *gate* na população de linfócitos a partir de seu tamanho e granulosidade específica. Então, foi feita nova *gate* onde foram selecionadas as células

CD3⁺/CD4⁺ ou CD8⁺. A partir dessa *gate*, foi gerado um gráfico do tipo dot plot contendo os marcadores CD3⁺/CD4⁺ ou CD3⁺/CD8⁺. A análise desse gráfico possibilita a determinação da pureza dessas células pela quantificação das porcentagens de cada *gate*. Ao fim de cada separação 1x10⁶ linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ eram separados para extração de RNA.

4.3.2 Extração e processamento do RNA total

Após a separação das células foi realizada a extração de RNA de cada subpopulação utilizando o reagente Trizol seguindo o protocolo indicado pelo fabricante (Invitrogen).

4.3.3 Análise da expressão dos miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-155

A análise de expressão dos miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-155 foi realizada utilizando o método de PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Como controles endógenos, foram utilizadas as sondas TaqMan RNU48 e RNU6B. Esse conjunto de sondas foi usado para analisar a expressão de miRNA nas células mononucleares (PBMC) e os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de controles normais e de pacientes diagnosticados com Esclerose Múltipla (EM) em surto. Para esse protocolo, primeiramente o RNA total de cada tipo celular foi retrotranscrito para cDNA com o uso de primers específicos para cada miRNA estudado. Essa reação foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Após essa etapa foi realizado o PCR em tempo real quando foram utilizadas sondas específicas para cada miRNA analisado. A reação de PCR em tempo real foi realizada em um aparelho ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados de expressão de cada miRNA estudado foram normalizados para o nível de expressão média dos dois controles endógenos (RNU48 e

RNU6B). Os níveis de expressão relativa miRNA foram, então, calculados pelo método de *threshold cycle* (Ct) comparativo ($2^{-\Delta C_t}$).

4.3.4 Análise da expressão do gene BCL-2

A análise da expressão gênica do gene BCL-2 foi realizada utilizando o método de PCR em tempo real com uso de sonda TaqMan (Applied Biosystems) para esse gene. Como controle endógeno foi utilizada sonda TaqMan para o gene HPRT. Esse conjunto de sondas foi usado para analisar as células mononucleares (PBMC) e os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de controles normais e de pacientes diagnosticados com Esclerose Múltipla (EM) em surto. Para esse protocolo, primeiramente o RNA total de cada tipo celular foi retrotranscrito para cDNA com o uso de primers randômicos. Essa reação foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Após essa etapa foi realizado o PCR em tempo real quando foram utilizadas sondas específicas para cada gene analisado. A reação de PCR em tempo real foi realizada em um aparelho ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O dado de expressão do gene estudado foi normalizado para o nível de expressão média do controle endógeno (HPRT). O nível de expressão relativa do gene foi, então, calculado pelo método de *threshold cycle* (Ct) comparativo ($2^{-\Delta C_t}$).

4.3.5 Fenotipagem das subpopulações de linfócitos

A fenotipagem das subpopulações de linfócitos T foi baseada no protocolo desenvolvido por Lanzaveccia e colaboradores em 1999 (SALLUSTO *et al.*, 1999). Para isso dez mililitros de sangue periférico foram coletados de cada paciente e controle saudável para a fenotipagem das populações de linfócitos. Em seguida, uma alíquota de 100µL de sangue

foi marcada especificamente para cada tipo celular com os seguintes anticorpos: células $CD4^+$ com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CCR7, anti-CD45RA e, células $CD8^+$ com os anticorpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CCR7 e anti-CD45RA (Becton-Dickinson San Diego, CA, USA). Após a marcação por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz, as amostras foram incubadas com solução de lise (Becton-Dickinson) por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com 1 ml de PBS e posteriormente adquiridas no citômetro BD CALIBUR (Becton-Dickinson) para fenotipagem, que seguiu as seguintes etapas: 1) primeiramente foi delineada uma *gate* na população de linfócitos a partir de seu tamanho e granulosidade específica. Então, foi feita nova *gate* onde foram selecionadas as células $CD3^+/CD4^+$ ou $CD8^+$. A partir dessa *gate*, foi gerado um gráfico do tipo dot plot contendo os marcadores CCR7 e CD45RA. Diante do gráfico, foi possível quantificar as subpopulações de linfócitos T Naive [$CD3^+CD4^+(CD8^+)$, $CD45RA^+CCR7^+$], de Memória Central [$CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^-CCR7^+$], de Memória Efetora [$CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^+CCR7^-$], de Memória Efetora diferenciada [$CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^+CCR7^+$].

4.3.6 Obtenção das subpopulações de Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$

Para obtenção de células suficientes para os experimentos de avaliação de expressão gênica por microarranjos de miRNAs, a separação das subpopulações foi realizada a partir da coleta de bolsas de sangue de doadores de repetição, como descrito no item 1.1.1. As bolsas contendo sangue foram fracionadas por centrifugação (25 minutos a 2500RPM a temperatura de 10°C) para obtenção do *buffy coat*, que foi transferido imediatamente para uma nova bolsa, mantendo as células estéreis e prontas para a separação das subpopulações. O processo de separação foi iniciado com o protocolo descrito no item 1.3.1 para a separação dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Em seguida as subpopulações de $CD4^+$ e $CD8^+$ foram separadas por

citometria de fluxo como descrito a seguir: **1)** alíquotas de 1×10^7 de linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$ com pureza de no mínimo 95% foram incubadas na proporção de $5 \mu\text{L}$ de anticorpo para cada 1×10^6 células com os seguintes anticorpos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CCR7, anti-CD45RA. Já para as subpopulações de linfócitos T $CD8^+$, foram usados os anticorpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CCR7 e anti-CD45RA (Becton-Dickinson). **2)** A estratégia de *sorting* foi baseada em marcações quádruplas para separação de cada grupo de subpopulações. Para o *sorting* das células naive, memória central, memória efetora, e terminalmente diferenciada foi utilizada as combinações: CD3, CD4 (ou CD8), CCR7 e CD45RA. Já para o *sorting* dos linfócitos T $CD4^+$ regulatórios (Treg) foi utilizada a combinação: CD3, CD4, CD45RA e CD25. **3)** Após a etapa de marcação, as células foram lavadas com 2 ml de PBS, centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e posteriormente ressuspensas na proporção de 1 ml de PBS 1x para cada 1×10^7 células. Essas células então foram processadas no Citômetro de Fluxo BD ARIA 2 (Becton-Dickinson). As seguintes subpopulações linfocitárias foram analisadas: $CD3^+$ (linfócitos T totais), $CD3^+CD4^+$ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), $CD3^+CD8^+$ (linfócitos T citotóxicos), $CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^+CCR7^+$ (linfócitos T naive), $CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^-CCR7^+$ (linfócitos T de memória central), $CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^-CCR7^-$ (linfócitos T de memória efetora), $CD3^+CD4^+(CD8^+)$ $CD45RA^+CCR7^-$ (linfócitos T de memória efetores diferenciados), $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD25^+$ (células T reguladoras). A metodologia de separação descrita acima é ilustrada a seguir. **4)** Após a separação, as células foram lavadas uma vez com PBS, centrifugadas por 10 minutos a temperatura ambiente a 300g. Após a centrifugação as células foram ressuspensas no reagente Trizol para extração de RNA.

Gráfico 1. Na imagem A podemos visualizar um exemplo da gate para separação dos linfócitos T **A**. Gate em linfócitos por tamanho e granulosidade, **B**. Populações consideradas Naive $CD4^+CD45RA^-CD25^-$, e Treg $CD4^+CD45RA^-CD25^+$, **C**. Sorting dos linfócitos T $CD4^+$ utilizando os marcadores CCR7 e CD45RA podemos isolar quatro subpopulações distintas de linfócitos.

4.3.7 Extração de RNA das subpopulações isoladas por *Sorting*

A extração de RNA em todos os casos citados foi utilizada a seguinte metodologia. Ao fim dos protocolos de isolamento celular, cada conjunto de células era lavado com 1ml de PBS e posteriormente centrifugado por 10 min a uma velocidade de 300g a temperatura de 4°C. Após essa centrifugação o pellet resultante era ressuspensionado em 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e prontamente armazenado a -70°C. No momento da extração foram seguidos todos os passos sugeridos pelo fabricante para obtenção de RNA de pequenas quantidades de células. Desse modo duas alterações ao protocolo original foram incluídas. A primeira foi a adição de 10ug de Glicogênio (Ambion, Austin, TX, USA), que auxilia na precipitação de pequenas quantidades de RNA. Também foi aumentado o tempo de precipitação para 18 horas em temperatura da -20°C.

4.3.8 Análise da qualidade do RNA extraído

Os RNAs foram quantificados no aparelho Nanodrop (Thermo, Santa Clara, CA, USA). A qualidade do RNA extraído foi analisada no Bioanalyzer 2100 (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA) da seguinte forma: 1) os RNAs extraídos foram quantificados e diluídos para a concentração de 5ng/μL. Após a diluição, a amostra foi desnaturada por incubação a 70°C por 2 minutos e imediatamente colocado no gelo. 2) as amostras foram aplicadas no chip *kit Eukaryote RNA Total Pico (Agilent)*, seguindo as instruções do fabricante para preparação do chip. 3) Em seguida, o chip foi colocado no aparelho Bioanalyzer 2100 para iniciar a análise. 4) Após a corrida, foram gerados os valores de RIN (*RNA integrity number*) e o gel correspondente para cada amostra.

4.3.9 Análise quantitativa da expressão dos miRNAs utilizando a metodologia de microarranjos de miRNA

A fim de analisar a expressão gênica de miRNAs em larga-escala utilizamos a tecnologia de microarranjos de miRNA. No período correspondente a esse relatório, foi analisada a amostra de um indivíduo diagnosticado com EM em período de remissão (como explicado anteriormente). Nessa experimento foram analisadas as seguintes populações de células: PBMC, linfócitos T *helper* ou auxiliares (CD3⁺CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), linfócitos T naive [CD3⁺CD4⁺ ou (CD8⁺) CD45RA⁺CCR7⁺], linfócitos T de memória central [CD3⁺CD4⁺ ou (CD8⁺) CD45RA⁻CCR7⁺], linfócitos T de memória efetora [CD3⁺CD4⁺ ou (CD8⁺) CD45RA⁻CCR7⁻], linfócitos T de memória efetores diferenciados [CD3⁺CD4⁺ ou (CD8⁺) CD45RA⁺CCR7⁻], células T reguladoras [CD3⁺CD4⁺ CD25⁺].

Um total de 42 microarranjos foi analisado correspondente as 7 subpopulações analisadas para três pacientes com EMRR em estágio de remissão e três controles saudáveis.

Para o experimento de microarranjos de miRNA foram utilizadas lâminas Agilent do tipo *Human miRNA Microarray Kit (V3)* (Núm. Cat. G4470C). Cada lâmina permite a análise da expressão de 866 miRNAs humano simultaneamente. A preparação das amostras para esse experimento seguiu o seguinte protocolo: 1) primeiramente, 100μg de RNA total de cada

alíquota foi desfosforilado utilizando a enzima CIP (*Calf Intestinal Phosphatase*); 2) desnaturação do RNA por incubação a 100°C seguido de incubação no gelo; 3) ligação de uma cauda fluorescente nas moléculas de RNA. Para isso a amostra foi incubada em uma solução contendo a enzima T4 RNA ligase e o composto fluorescente Cianina 3pCp; 4) cada amostra de RNA foi incubada com uma solução de bloqueio, que tem a função de impedir a ligação inespecífica do RNA na lâmina de vidro utilizada posteriormente; 5) a amostra foi aplicada na lâmina de vidro que contém as sequências complementares aos miRNAs utilizados; 6) a lâmina foi incubada em um forno de hibridação na temperatura de 55°C por 20 horas. Ao final dessa hibridação a lâmina foi lavada e em seguida escaneada no aparelho *High-Resolution Microarray Scanner* (Agilent). Esse escaneamento gera arquivos com informações relacionados à intensidade de fluorescência gerada por cada miRNA expresso nas amostras aplicadas.

4.3.10 Análise bioinformática dos experimentos de microarranjos de miRNA

As análises de bioinformáticas utilizadas foram baseadas no software R. Esse software possibilita o uso de diversas ferramentas de análise de microarranjos de maneira gratuita. Nessa análise utilizamos uma ferramenta chamada AgiMicroRNA (LOPEZ-ROMERO, 2011) presente no banco de dados Bioconductor (GENTLEMAN *et al.*, 2004).

4.3.11 Avaliação da expressão dos miRNAs pela técnica de PCR em tempo real

A análise de expressão dos miRNAs selecionados a partir dos experimentos de microarranjos de miRNA foi realizada utilizando o método de PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Para esse protocolo, primeiramente o RNA total de cada tipo celular foi retrotranscrito para cDNA com o uso de primers específicos para cada miRNA estudados. Essa reação foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit (Applied Biosystems). Após essa etapa foi realizado o PCR em tempo real quando foram utilizadas sondas específicas para cada miRNA analisado. Sendo eles: miR-15a, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-24, miR-155, miR-221, miR-222, miR-720 e miR-1281, miR-125b, miR-630, miR-31, miR-134b, miR-451, miR-1225-5p, miR-Let7-f1, miR-1305, miR-550a, miR-93. A reação de PCR em tempo real foi realizada em um aparelho ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados de expressão de cada miRNA estudado foram normalizados para o nível de expressão média dos dois controles endógenos (RNU44 e RNU48). Os níveis de expressão relativa miRNA foram, então, calculados pelo método de *threshold cycle* (Ct) comparativo ($2^{-\Delta Ct}$).

4.3.12 Análise bioinformática dos genes alvos dos miRNAs validados

A fim de melhor conhecer os genes alvos de cada miRNA diferencialmente expresso, utilizamos um banco de dados específico para a seleção de alvos preditos chamado Mirwalk. Esse banco de dados centraliza os resultados de outras ferramentas de predição de alvo como TARGETSCAN (Versão 5.1), DIANA-microT (Versão 3.0), miRDB (04/2009), PICTAR (03/2007), RNA22 (05/2008), PITA (08/2008), Miranda (08/2010), RNAhybrid (Versão 2.1). Em nossa busca utilizamos a função de busca de alvo para cada miRNA analisado. O resultado gerado em cada busca mostrava os genes alvo de cada miRNA e a predição do mesmo para todos os bancos de dados cadastrados. Com esses dados em mãos aplicamos um filtro onde só eram selecionados genes cujos miRNAs eram preditos por pelo menos cinco bancos de dados. Essa lista de genes era então novamente filtrada e só foram selecionados genes que eram alvejados por pelo menos 5 miRNAs.

Outro banco de dados utilizado foi o TARBASE (VERGOULIS *et al.*, 2012), esse banco de dados centraliza o conhecimento de alvos validados de miRNAs. Em nossa seleção primeiramente fizemos o download do banco de dados completo e em seguida selecionamos

os miRNAs de interesse e os genes já validados para cada um deles. Posteriormente foram selecionados apenas genes que foram validados experimentalmente. Nesse banco de dados esse tipo de validação é a mais rara e dessa maneira apenas 695 genes foram selecionados para as análises posteriores.

O terceiro passo foi a confecção da lista final de genes alvo. Essa lista incluiu portanto os genes alvo preditos no banco MIRWALK somados aos genes validados selecionados no banco TARBASE. Essa lista foi então submetida a análise no software METACORE, onde foram realizadas buscas por mapas canônicos, vias genicas, biomarcadores e funções moleculares dos genes selecionados.

Os gráficos *Circos Plot* foram gerados a partir das tabelas de associação entre os miRNAs e seus alvos preditos e validados. A confecção do mesmo foi realizada com a utilização do software Circos (KRZYWINSKI *et al.*, 2009) disponível no website <http://www.circos.ca>.

4.4 Experimentos em Ratos

A EAE foi induzida em uma linhagem de Ratos chamada DA, que foi obtida do *Zentralinstitut für Versuchstierzucht* (Hanover, Germany), Os animais foram mantidos no biotério do *Karolinska University Hospital* (Stockholm, Sweden), em condições livre de patógenos e com clima controlado.

4.4.1 Indução da encefalomielite auto-imune experimental (EAE) em ratos

A EAE foi induzida com utilização da proteína Mielina de Oligodendrócito (MOG) recombinante produzida em *E.coli* como descrito (AMOR *et al.*, 1994) Ratas fêmeas com idades pareadas foram anestesiadas com Isoflurano (Forene; Abbott Laboratories, Chicago, IL) e injetadas por via sub cutânea na base da cauda com um inóculo contendo 25µg de MOG

recombinante diluído em PBS em uma emulsão 1:1 com adjuvante incompleto de Fround (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Todos experimentos envolvendo animais incluídos nesse estudo foram realizados de acordo com um termo de ética aprovado pelo Stockholms norra djurförsöksetiska nämnd (comitê de ética animal do norte de Estocolmo).

4.4.2 Obtenção dos linfonodos e subpopulações celulares dos Ratos induzidos com EAE

Os linfonodos drenantes inguinais de ratos DA foram coletados nos dias 0, 3, 7 e 25 após a imunização. Os órgãos foram coletados e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido para posterior processamento do RNA. Somente para sétimo dia após a imunização foi realizada a separação das subpopulações dos linfonodos. Para isso após a coleta os linfonodos foram incubados em meio de cultura DMEM (Life Technologies-BRL, Grand Island, NY), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% L-glutamina, 1% penicilina-streptomicina, e 1% ácido pirúvico (Life Technologies, Paisley, Scotland). Nesse meio de cultura os linfonodos foram macerados e o conteúdo obtido foi filtrado em filtro de abertura de 100µM. O conteúdo obtido foi então adicionado de 5ml de PBS e centrifugado a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente. As células obtidas foram marcadas por 20 minutos a 4°C com anticorpos CD3, CD4, CD8a (BD Biosciences, San Jose, CA) e posteriormente coletadas em um citômetro de fluxo MoFLO (Beckman Coulter). Após a coleta foram obtidas as seguintes populações: CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD3⁻ identificado como N.T (célula não T). Essas células foram posteriormente submetidas ao protocolo de extração de RNA.

4.4.3 Obtenção de linfócitos T CD4⁺ Naive de ratos

Ratas DA saudáveis com oito semanas de vida foram sacrificadas com o uso de CO₂. Dessas ratas foi obtido o Baço. Após a coleta esse órgão foi incubados em meio de cultura

DMEM (Life Technologies-BRL, Grand Island, NY), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% L-glutamina, 1% penicillina-streptomicina, e 1% ácido pyruvico (Life Technologies, Paisley, Scotland). Nesse meio de cultura os linfonodos foram macerados e o conteúdo obtido foi filtrado em filtro de cultura de abertura de 100µM. O conteúdo obtido foi então adicionado de 5ml de PBS e centrifugado a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente. As células obtidas foram marcadas por 20 minutos a 4°C com anticorpos CD3, CD4, CD8a, CD25 (BD Biosciences, San Jose, CA) e posteriormente coletadas em um citometro de fluxo MoFLO (Beckman Coulter). Após a coleta foi obtida a seguinte população: CD3⁺CD4⁺CD25⁻ determinada como Naïve.

4.4.4 Proliferação *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ de ratos

A proliferação de linfócitos T CD4⁺ Naïve obtidos de Ratos saudáveis foram cultivados 1.10⁵ células por poço em placas de cultivo de 96 poços. As células foram estimuladas com Meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% L-glutamina, 1% penicillina-streptomicina, e 1% ácido pyruvico (Life Technologies, Paisley, Scotland) puro ou suplementado com os seguintes estímulos: 0,5 µg/ml, 1µg/ml, 2.0µg/ml, 3µg/ml, 4µg/ml e 5µg/ml de anticorpo antiCD3 (BD Biosciences) todas suplementadas com 1µg/ml de anticorpo antiCD28 (BD Biosciences) por cinco dias. Dezoito horas antes da coleta das células foi adicionado em cada poço 1 mCi de timidina H³ radioativa (GE Healthcare, Bucks, UK). As células foram então coletadas utilizando o aparelho Wallac Tomtec (Perkin Elmer, Waltham, USA), posteriormente foi analisada a incorporação do isótopo radioativo utilizando o aparelho Wallac TriLux 1450 MicroBeta (Perkin Elmer). Alternativamente ao fim do experimento também foram coletadas células de cada estímulo testado para extração de RNA.

4.4.5 Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ de ratos DA

A fim de avaliar a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ Naïve obtidos de Ratos saudáveis foram cultivados em sextuplicata 1.10⁵ células por poço em placas de cultivo de 96 poços. As células foram estimuladas com Meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% L-glutamina, 1% penicillina-streptomicina, e 1% ácido pirúvico (Life Technologies, Paisley, Scotland) puro ou suplementado com os seguintes estímulos: Controle (sem citocinas), Th1 (IL-12 10ng/ml), Th2 (IL-4 50ng/ml), TREG (TGFb1 10ng/ml), Th17 (TGFb1 20ng/ml +IL-1b 20ng/ml +IL-6 20ng/ml +IL-23 50ng/ml + anti-IFNg 1ug/ml + antiIL-4 1ug/ml). Também foi avaliado a influência de citocinas individuais na diferenciação Th17 e a influência da IL-2 nesse processo. Para esse fim foram testados os seguintes estímulos: Controle (sem citocinas), Th17 (TGFb1 20ng/ml +IL-1b 20ng/ml +IL-6 20ng/ml +IL-23 50ng/ml +anti-IFNg 1ug/ml + antiIL-4 1ug/ml), IL-1b (IL-1b 20ng/ml), IL-6 (IL-6 20ng/ml), IL-23 (IL-23 20ng/ml), Th17 + IL-2 (TGFb1 20ng/ml +IL-1b 20ng/ml +IL-6 20ng/ml +IL-23 50ng/ml +anti-IFNg 1ug/ml + antiIL-4 1ug/ml + IL-2 5ng/ml), Th17 + antiIL-2 (TGFb1 20ng/ml +IL-1b 20ng/ml +IL-6 20ng/ml +IL-23 50ng/ml +anti-IFNg 1ug/ml + antiIL-4 1ug/ml + antiIL-4 2,5ug/ml). Em todos os estímulos o tempo de cultivo foi de cinco dias. Ao fim desse tempo metade da sextuplicata foi submetida a análise de citometria de fluxo e a outra metade foi coletada para extração de RNA. A extração de RNA foi realizada de acordo com os itens 5.3.7 e a qualidade e quantidade do mesmo foi atestada por análise no aparelho Nanodrop (Thermo, Santa Clara, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Os miRNAs miR-15a e miR-16-1 são menos expressos em PBMC proveniente de pacientes com EMRR em surto

A análise da expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 em PBMC de 15 pacientes com EMRR em surto sem tratamento com metilprednisona revelou expressão significativamente diminuída ($p < 0,001$ em ambos) em relação aos controles saudáveis pareados por idade e sexo (Figuras 2C e 2E). O mesmo não foi observado com o miR-155 ($p = 0,3241$) (Figura 2A).

5.1.1 Os miRNAs miR-15a, miR-16-1 e miR-155 são menos expressos em linfócitos T CD4⁺ mas não em linfócitos T CD8⁺ proveniente de pacientes com EMRR em surto

Após observação da diminuição dos miRNAs miR-15a, miR-16-1 em PBMCs, analisamos a expressão dos mesmos miRNAs, incluindo o miR-155, em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de cinco pacientes com EMRR. Interessantemente, a expressão dos três miRNAs foi significativamente diminuída em linfócitos T CD4⁺ quando comparado com amostras de indivíduos saudáveis. Esta diminuição não foi observada em linfócitos T CD8⁺ (Figuras 2B, 2D e 2F).

Figura 2. Avaliação da expressão gênica dos miRNAs em PBMC e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes de EM e pela metodologia de PCR em tempo real. **A.** miR-155 em PBMC **B.** miR-155 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ **C.** miR-15a em PBMC **D.** miR-15a em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ **E.** miR-16-1 em PBMC. **F.** miR-16-1 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os valores de significância são mostrados no gráfico. O valor da expressão relativa foi obtido utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5.1.2 O gene BCL2, alvo dos miRNAs 15a e 16-1, apresentou expressão aumentada em PBMCs e linfócitos T CD4⁺ provenientes de pacientes com EMRR em surto

Para avaliar se a diminuição dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 está relacionada com a indução da apoptose nos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com EMRR, um processo biológico importante na fisiopatologia da EM, decidimos avaliar a expressão do gene BCL2, que é conhecidamente o gene anti-apoptótico e alvo validado dos dois miRNAs. A análise da expressão do gene BCL2 em PBMCs revelou um aumento na expressão em indivíduos controles ($p < 0,05$) (Figura 3A). Curiosamente, quando o BCL2 foi analisado em linfócitos T isoladamente, observamos o aumento significativo apenas nos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com EMRR em surto ($p < 0,05$) (Figura 3B).

Figura 3. Avaliação da expressão do gene BCL2 por Real Time PCR. **A.** Expressão de BCL2 mRNA em PBMC de indivíduos saudáveis e Pacientes de EM. **B.** Expressão do gene BCL2 em células CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes com EM. O valor da expressão relativa foi obtido utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$.

5.2 Avaliação do perfil de expressão de miRNAs em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes com EMRR em estágio de remissão

Com o objetivo de ampliar a análise de miRNAs nas populações de linfócitos T, foram isoladas 9 subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com EMRR em estágio de remissão. A mudança do tipo de amostra foi em função de estudar pacientes sem foco inflamatório, com isso podemos observar uma assinatura de miRNAs associado ao fenótipo exclusivo da doença, sem interferência da inflamação associada. As subpopulações de cada tipo de linfócitos T estudadas incluem: Naive; Memória Central (MC); Memória Efetora (ME) e Memória Efetora RA (MERA), isoladas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os linfócitos T regulatórios (Tregs), por sua vez foram isolados das células CD4⁺. Tais células foram isoladas de amostras de 8 pacientes com EMRR em estágio de remissão (5 do sexo feminino e 3 do sexo masculino) com média de 39 anos. Adicionalmente, amostras de 8 doadores saudáveis (5 do sexo feminino e 3 do sexo masculino), também com média de idade de 39 anos, foram usadas como controle negativo.

Inicialmente foi quantificado as subpopulações de linfócitos T em indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR em estágio de remissão. O resultado desta análise revelou aumento significativo da subpopulação de linfócitos de memória efetora RA em EMRR nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, foi verificado uma diminuição significativa da subpopulação de memória central em linfócitos T CD8⁺ (Figura 4).

De posse desses dados, selecionamos três pacientes com EMRR em estágio de remissão e três indivíduos saudáveis para análise do perfil de expressão de miRNAs em larga escala. De cada indivíduo foram analisados os seguintes tipos celulares; linfócitos T CD4⁺ totais, linfócitos T CD8⁺ totais, linfócitos T CD4⁺ Naïve, linfócitos T CD4⁺ de Memória Central, linfócitos T CD4⁺ de Memória Efetora, linfócitos T CD8⁺ Naïve e linfócitos T CD8⁺ de Memória Central.

Figura 4. Composição das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ nos indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR em estágio de remissão. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR nessa subpopulação. Os pontos em negro denotam os indivíduos saudáveis e os pontos em cinza denotam os indivíduos com EMRR.

A análise de expressão dos miRNAs em escala genômica foi realizada na plataforma da Agilent e os dados processados usando funções de estatística R disponíveis no Bioconductor Latin America (<http://bioconductor.fmrp.usp.br/>). A figura 5 mostra o resultado preliminar de agrupamento hierárquico com distância Euclidiana dos dados de expressão de miRNAs de cada subpopulação de linfócitos T. Como pode ser observado, foram formados quatro grandes grupos de miRNAs. O primeiro deles, denominado de grupo A, apresenta miRNAs que são pouco expressos nos pacientes com EMRR e não são expressos nos indivíduos controles. No caso do grupo B, o padrão de expressão é levemente contrário ao do grupo A, onde parte dos controles apresentam expressão mais alta de alguns miRNAs em relação a maioria dos pacientes. O grupo C apresenta um padrão de expressão similar ao do grupo A, porém numa grandeza inferior. Por último o grupo D que é formado por 8 miRNAs altamente expressos em todas as subpopulações de linfócitos: miR-21; miR-720; let-7f; let-7a; miR-26b; miR-923; miR-1274b e miR-142-3p.

5.3 Análise pareada do perfil de expressão de miRNAs entre as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes com EMRR em estágio de remissão e amostras controles

Para identificar miRNAs com expressão diferencial entre cada subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, de pacientes com EMRR e indivíduos controles, os valores de *p-value* <0,05 e *fold change* > 2 foram correlacionados e visualizados em gráficos do tipo *Volcano plot*. Esse tipo de análise permite identificar os miRNAs que apresentam expressão diferencial com alto grau de significância. O resultado desta análise identificou 30 miRNAs modulados negativamente na população CD4⁺ Total de pacientes e apenas um miRNA modulado positivamente na mesma célula (Figura 5A e Tabela 5). Na população CD8 Total, apenas o miR-196a foi modulado negativamente nos pacientes em relação ao controle (figura 5B e Tabela 5).

Quando as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ foram avaliadas, a subpopulação naïve apresentou 24 miRNAs modulados positivamente nas amostras de pacientes (Figura 6A). Já nas subpopulações de memória, foi observado a modulação positiva de 10 miRNAs, sendo 4 deles na subpopulação de memória central (Figura 6B e Tabela 5) e 6 miRNAs na subpopulação de memória efetora (Figura 6C).

A análise das subpopulações naïve e de memória central em linfócitos T CD8⁺ mostrou modulação da expressão de 13 miRNAs, sendo 4 (2 miRNAs modulados positivamente e 2 negativamente) da subpopulação naïve e 9 (7 miRNAs modulados positivamente e 2 negativamente) da subpopulação de memória central (Figura 7 e Tabela 6).

Figura 5. Heatmap demonstrando a clusterização hierárquica do miRNAs e das amostras de subpopulações de linfócitos T. A. Primeiro cluster, B. Segundo cluster, C. Terceiro cluster, D. Quarto cluster.

Figura 6. Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos nas populações CD4⁺ e CD8⁺ total. Os pontos em azul representam cada miRNA diferencialmente expresso, sua intensidade de cor representa o valor de Fold change (FC), de acordo com a escala apresentada ao lado do gráfico. O retângulo rosa dentro do gráfico indica a região onde os valores de $p < 0,05$. **A.** População CD4⁺ Total. **B.** População CD8⁺ Total.

Tabela 5. miRNAs diferencialmente expressos CD4⁺ e CD8⁺ Total

miRNA	FC	p.value	Tipo celular comparado
hsa-let-7a	-4.39617	0.013112	CD4 Total
hsa-let-7b	-3.68966	0.022769	CD4 Total
hsa-let-7f	-4.34914	0.016232	CD4 Total
hsa-let-7g	-4.5134	0.018456	CD4 Total
hsa-let-7i	-4.20775	0.04024	CD4 Total
hsa-miR-155	-3.84073	0.047339	CD4 Total
hsa-miR-1225-3p	6.705067	0.011451	CD4 Total
hsa-miR-1260	-3.69947	0.032956	CD4 Total
hsa-miR-1274b	-4.21401	0.026911	CD4 Total
hsa-miR-142-5p	-4.41177	0.015485	CD4 Total
hsa-miR-146b	-4.14119	0.016594	CD4 Total
hsa-miR-19b	-4.43372	0.010482	CD4 Total
hsa-miR-20a	-3.94369	0.017222	CD4 Total
hsa-miR-21	-5.1155	0.010054	CD4 Total
hsa-miR-21-3p	-4.22297	0.042385	CD4 Total
hsa-miR-222	-3.97251	0.040025	CD4 Total
hsa-miR-24	-4.43008	0.033582	CD4 Total
hsa-miR-26a	-4.37774	0.013627	CD4 Total
hsa-miR-26b	-4.39682	0.01529	CD4 Total
hsa-miR-27a	-3.94407	0.043466	CD4 Total
hsa-miR-29a	-5.04413	0.007557	CD4 Total
hsa-miR-29b	-4.52287	0.015511	CD4 Total
hsa-miR-29c	-4.40279	0.016738	CD4 Total
hsa-miR-30b	-3.53137	0.035041	CD4 Total
hsa-miR-342-3p	-4.51728	0.011636	CD4 Total
hsa-miR-34a	-4.83205	0.030395	CD4 Total
hsa-miR-564	-4.22778	0.027629	CD4 Total
hsa-miR-720	-4.54751	0.01899	CD4 Total
hsa-miR-923	-5.09935	0.014938	CD4 Total
hsa-miR-99b	-3.71373	0.014694	CD4 Total
hsa-miR-196a	-3.922	0.006504	CD8 Total

FC. *Fold Change*, *p.value*: indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre os dois tipos celulares. Os miRNAs usados para validação estão identificados em negrito.

Figura 7. Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações CD4⁺. Os pontos em azul representam cada miRNA diferencialmente expresso, sua intensidade de cor representa o valor de Fold change (FC), de acordo com a escala apresentada ao lado do gráfico. O retângulo rosa dentro do gráfico indica a região onde os valores de $p < 0,05$. **A.** Subpopulação Naive. **B.** Subpopulação Memória Central. **C.** Subpopulação Memória Efetora.

Tabela 6. miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações CD4⁺

miRNA	FC	p.value	Tipo celular comparado
hsa-let-7b-3p	5.156004	0.044169	Naive CD4
hsa-miR-125b	8.075946	0.002579	Naive CD4
hsa-miR-1275	5.470513	0.041303	Naive CD4
hsa-miR-1288	6.928005	0.010332	Naive CD4
hsa-miR-1305	6.598197	0.015279	Naive CD4
hsa-miR-130b	4.177392	0.046209	Naive CD4
hsa-miR-148a	5.520221	0.04871	Naive CD4
hsa-miR-151-5p	6.723885	0.011434	Naive CD4
hsa-miR-181b	5.010837	0.020766	Naive CD4
hsa-miR-1914-3p	5.392676	0.04385	Naive CD4
hsa-miR-192	5.656997	0.029685	Naive CD4
hsa-miR-197	4.936574	0.034337	Naive CD4
hsa-miR-22	4.728433	0.022991	Naive CD4
hsa-miR-30c	6.130251	0.027772	Naive CD4
hsa-miR-30d	5.996446	0.020373	Naive CD4
hsa-miR-320a	5.627222	0.031817	Naive CD4
hsa-miR-320c	6.00112	0.020485	Naive CD4
hsa-miR-324-3p	5.892306	0.022821	Naive CD4
hsa-miR-331-3p	5.644411	0.025344	Naive CD4
hsa-miR-451	6.219521	0.028185	Naive CD4
hsa-miR-590-5p	5.658604	0.027072	Naive CD4
hsa-miR-766	4.682894	0.018352	Naive CD4
hsa-miR-874	5.335886	0.037595	Naive CD4
hsa-miR-93	4.995767	0.044886	Naive CD4
hsa-let-7i	4.393876	0.032582	Memória Efetora CD4
hsa-miR-1225-3p	5.644083	0.031381	Memória Efetora CD4
hsa-miR-146a	4.205403	0.043356	Memória Efetora CD4
hsa-miR-21	4.241212	0.041544	Memória Efetora CD4
hsa-miR-20a	4.159434	0.033695	Memória Efetora CD4
hsa-miR-548c-3p	-6.29987	0.032573	Memória Efetora CD4
hsa-miR-151-5p	5.567577	0.034056	Memória Central CD4
hsa-miR-181a	5.056616	0.031348	Memória Central CD4
hsa-miR-181b	5.262964	0.015489	Memória Central CD4
hsa-miR-590-5p	6.316676	0.014274	Memória Central CD4

FC: Fold Change, p.value: Indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre os dois tipos celulares. Os miRNAs usados para validação estão identificados em negrito.

Figura 8. Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações CD8⁺. Os pontos em azul representam cada miRNA diferencialmente expresso, sua intensidade de cor representa o valor de Fold change (FC), de acordo com a escala apresentada ao lado do gráfico. O retângulo rosa dentro do gráfico indica a região onde os valores de $p < 0,05$. **A.** Subpopulação Naive. **B.** Subpopulação Memória Central

Tabela 7. miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações CD8⁺

miRNA	FC	p.value	Tipo celular comparado
hsa-miR-196a	-4.28379	0.003198	Naive CD8
hsa-miR-221	-5.14864	0.048435	Naive CD8
hsa-miR-363	5.808182	0.034634	Naive CD8
hsa-miR-454	-6.79829	0.007093	Naive CD8
hsa-miR-1281	5.554176	0.041593	Memória Central CD8
hsa-miR-174a	-4.81078	0.037072	Memória Central CD8
hsa-miR-181a	4.668153	0.046001	Memória Central CD8
hsa-miR-181b	5.559895	0.010859	Memória Central CD8
hsa-miR-324-3p	5.469805	0.033821	Memória Central CD8
hsa-miR-33b-3p	-5.4558	0.035196	Memória Central CD8
hsa-miR-590-5p	5.650585	0.027277	Memória Central CD8
hsa-miR-720	5.504261	0.006173	Memória Central CD8
hsa-miR-874	5.297043	0.038935	Memória Central CD8

FC: Fold Change, p.value: Indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre os dois tipos celulares. Os miRNAs usados para validação estão identificados em negrito.

Tabela 8. Lista dos miRNAs diferencialmente expressos selecionados para validação.

microRNA	ID - miRBASE	Sequencia Maduro	Chr
hsa-miR-720	MIMAT0005954	ucucgcuggggccucc	3
hsa-miR-16	MIMAT0000069	uagcagcacguaaaauuuggc	13
hsa-miR-24	MIMAT0000080	uggcucauguacgaggaaca	9
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	uagcagcacauaauugguuugug	13
hsa-miR-20a	MIMAT0000075	uaaagugcuuauagugcaggua	13
hsa-miR-21	MIMAT0000076	uagcuuacagacugauguug	17
hsa-miR-155	MIMAT0000646	uuauugcuauucgugauagggg	21
hsa-miR-1281	MIMAT0005939	ucgccuccuccucucc	22
hsa-miR-222	MIMAT0000279	agcuacaucuggcuacuggg	X
hsa-miR-221	MIMAT0000278	agcuacauugucugcuggguuu	X

Chr: Indica o cromossomo onde o miRNA é codificado.

5.4 Validação da expressão gênica dos miRNAs diferencialmente expressos nas subpopulações de linfócitos T

Um total de 20 miRNAs (identificados em negrito nas tabelas 5, 6 e 7) foram selecionados para validação da expressão diferencial pelo método de RT-qPCR usando sondas específicas. Para esta análise foi utilizada 8 amostras de pacientes com EMRR em estágio de remissão e as 8 amostras de controles saudáveis. Ao conjunto de células analisadas no experimento de microarranjos de miRNAs, foram incluídas as subpopulações de memória RA CD4⁺ e CD8⁺ e a subpopulação TREG. Os miRNAs miR-15a e miR-16-1 também foram incluídos nessa análise, uma vez que já tinham sido identificados diferencialmente expressos em linfócitos totais CD4⁺ nos pacientes com EMRR em estágio de surto.

No geral 10 miRNAs tiveram expressão diferencial significativa em pelo menos um tipo celular analisado: miR-15a, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-24, miR-155, miR-221, miR-222, miR-720 e miR-1281 (Tabela 8).

miR-15a e miR-16-1: o miR-15a apresentou expressão diferencial nas amostras de linfócitos CD4⁺ totais de pacientes em surto de EMRR (LORENZI *et al.*, 2012). A análise da deste miRNA revelou expressão diferencial significativa nas subpopulações naive e de memória efetora RA de linfócitos T CD4⁺ (figura 9A). Por outro lado, nenhuma variação de expressão significativa do miR-15a foi observada nas subpopulações CD8⁺ (figura 9B). No caso do miR-16, a expressão diferencial significante foi observada apenas na subpopulação de memória central CD8⁺ (figura 9D).

Figura 9. Avaliação da expressão do miR-15a e 16 nas subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. As subpopulações analisadas são indicadas nos gráficos. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM nessa subpopulação. As barras em negro denotam os indivíduos saudáveis, já as barras em cinza denotam os indivíduos com EMRR. **A.** miR-15a subpopulações CD4⁺, **B.** miR-15a subpopulações CD8⁺, **C.** miR-16-1 subpopulações CD4⁺, **D.** miR-16-1 subpopulações CD8⁺.

miR-20a e miR-21: o miR-20a e o miR-21 foram selecionados por sua expressão diferencial na amostra de linfócitos T CD4⁺ total e de memória efetora CD4⁺, respectivamente, com base nos dados de microarranjos. Diferentemente do observado na análise de microarranjos, a expressão diferencial do miR-20a foi positiva para as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ de memória central e efetora (Figura 10b), em quanto que para o miR-21, a expressão diferencial foi positiva para as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ de memória central e naïve.

Figura 10. Avaliação da expressão do miR-20a e miR-21 nas subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. As subpopulações analisadas são indicadas nos gráficos. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM nessa subpopulação. As barras em negro denotam os indivíduos saudáveis, já as barras em cinza denotam os indivíduos com EMRR. **A.** miR-20a subpopulações CD4⁺, **B.** miR-20a subpopulações CD8⁺, **C.** miR-21 subpopulações CD4⁺, **D.** miR-21 subpopulações CD8⁺.

miR-24 e miR-155: o miR-14 e o miR-25 também foram selecionados por sua expressão diferencial na amostra de linfócitos T CD4⁺ total, com base nos dados de microarranjos. Diferente do observado na análise de microarranjos, a expressão diferencial dos dois miRNAs foi positiva apenas para a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ de memória central (Figura 11).

Figura 11. Avaliação da expressão do miR-24 e miR-155 nas subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. As subpopulações analisadas são indicadas nos gráficos. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM nessa subpopulação. As barras em negro denotam os indivíduos saudáveis, já as barras em cinza denotam os indivíduos com EMRR. **A.** miR-24 subpopulações CD4⁺, **B.** miR-24 subpopulações CD8⁺, **C.** miR-155 subpopulações CD4⁺, **D.** miR-155 subpopulações CD8⁺.

miR-221 e miR-222: o miR-221 e o miR-222 foram selecionados por sua expressão diferencial nas células naive de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, respectivamente, com base nos dados de microarranjos. Seguindo o mesmo padrão dos miRNAs anteriores, a expressão diferencial dos dois miRNAs foi positiva apenas para a subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ de memória central (Figura 12B e 12D).

Figura 12. Avaliação da expressão do miR-221 e miR-222 nas subpopulações de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. As subpopulações analisadas são indicadas nos gráficos. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM nessa subpopulação. As barras em negro denotam os indivíduos saudáveis, já as barras em cinza denotam os indivíduos com EMRR. **A.** miR-221 subpopulações $CD4^+$, **B.** miR-221 subpopulações $CD8^+$, **C.** miR-222 subpopulações $CD4^+$, **D.** miR-222 subpopulações $CD8^+$.

miR-720 e miR-1281: o miR-720 e o miR-1281 foram selecionados por sua expressão diferencial nas células de memória central de linfócitos T CD8⁺, com base nos dados de microarranjos. Estes por sua vez foram os únicos miRNAs que validaram os dados de expressão de microarranjos (Figura 13B e 13D).

5.5 Redes gênicas possivelmente afetadas pela expressão dos miRNAs nas células de memória central CD8⁺ em pacientes com EMRR em estágio de remissão

Como demonstrado anteriormente, 9 miRNAs apresentaram expressão elevada nos linfócitos de memória central CD8⁺. Na tentativa de identificar os genes alvos desses miRNAs, foram selecionados genes alvos que estivessem em concordância com pelo menos 5 base de dados. Com esse critério foram selecionados 455 preditos. Adicionalmente, 240 genes alvos foram selecionados de uma base de dados de alvos validados experimentalmente. Com essa abordagem foi possível a selecionar 695 genes alvos. Na figura 14a podemos observar a relação dos nove miRNAs com seus genes alvos preditos e na figura 14b, indicando apenas os genes validados experimentalmente. Já na figura 14c visualizamos os genes relacionados com a apoptose e seus miRNAs relacionados.

A

B

C

Figura 14. Representação dos miRNAs e de seus genes alvos em contexto genômico. A. Todos genes preditos, B. Todos genes validados, C. Genes relacionados a apoptose preditos, com linhas de conexão em azul, e validados com linhas de conexão em vermelho.

De posse da lista de genes alvos e preditos foi usada a plataforma Metacore para identificar as classes e vias funcionais representadas por este conjunto de genes. Essa análise nos permite sugerir quais delas são afetadas pelos nove miRNAs. A análise de classes funcionais identificou 87 enzimas, 59 fatores de transcrição, 47 quinases, 34 receptores, 11 proteases e 11 fosfatases, entre outros (Figura 15).

	Protein class	Actual	n	In data set
Kinases	47	649	7.24%
Phosphatases	15	649	2.31%
Transcription factors	59	649	9.09%
Enzymes	87	649	13.41%
Receptors	34	649	5.24%
Proteases	11	649	1.69%
Ligands	7	649	1.08%
Other	396	649	61.02%

Figura 15. Screenshot das classes de proteínas obtida da plataforma Metacore.

Outra análise realizada foi a definição da localização celular e funções moleculares dos genes utilizando a ferramentas GO (Gene Ontology) presentes no Metacore (**Figura 16a e b**)

Figura 16. Análise da localização celular e função molecular dos genes alvos. As barras na cor laranja representam o valor de p da associação da lista de genes alvos.

Posteriormente foi realizada a associação dos genes alvos com doenças. Nesse tipo de análise o software Metacore correlaciona uma base de dados de genes associados com doenças, com a lista de genes alvos. Como pode ser observado na figura 17 a Esclerose Múltipla está ranqueada na sétima posição da lista.

Figura 17. Correlação entre os genes alvos e doenças utilizando a função Biomarcador do Metacore. As barras na cor laranja representam o valor de p da associação da lista de genes alvo com a doença indicada.

Outra análise realizada foi a busca de vias gênicas canônicas afetados pelos miRNAs selecionados. Nessa análise foi usado o módulo *Pathway Maps* do programa METACORE. Resumidamente, a ferramenta faz uma busca nas bases de dados de vias canônicas e as relaciona com a lista de genes inserida pelo usuário. A tabela 9 mostra um total de 20 vias canônicas mais relacionadas com os genes alvos, e quantifica o número de genes encontrados em nossa lista em relação ao número total de genes da via. O resultado dessa análise destacou três vias de apoptose como forte candidatas a serem moduladas pelos miRNAs nos pacientes com EMRR (Tabela 9). A via de indução de apoptose pela fosforilação da proteína BAD é a que contém o maior número de genes alvos entre todas as vias identificadas pelo Metacore, reforçando o papel da apoptose na fisiopatologia da EMRR. Na figura 18 estão destacados os 13 genes alvos da via identificados no nosso estudo, que são: Cytochrome c, PDK (PDPK1),

GRB2, PKA-reg (cAMP-dependent), p90Rsk, PP2C, ERK1/2, Adenylate cyclase type 1, Bcl-2, G-protein alpha-s, PI3K reg class IA, CDK1 (p34).

Tabela 9. Vias canônicas enriquecidas com alvos dos miRNAs diferencialmente expressos nos linfócitos de memória central CD8⁺.

#	Mapas de vias canonicas	pValue	FDR	Ratio
1	Apoptosis and survival BAD phosphorylation	1.17E-11	6.59E-09	13/42
2	Cell cycle Regulation of G1/S transition (part 1)	5.67E-11	1.09E-08	12/38
3	Transcription CREB pathway	5.76E-11	1.09E-08	13/47
4	Development Gastrin in cell growth and proliferation	2.03E-10	2.88E-08	14/62
5	Signal transduction AKT signaling	2.88E-10	3.26E-08	12/43
6	DNA damage ATM/ATR regulation of G1/S checkpoint	2.69E-09	2.54E-07	10/32
7	Immune response IL-15 signaling	3.72E-09	2.91E-07	13/64
8	Apoptosis and survival Apoptotic Activin A signaling	4.11E-09	2.91E-07	9/25
9	Development Ligand-independent activation of ESR1 and ESR2	7.66E-09	4.33E-07	11/45
10	Development Thrombopoietin-regulated cell processes	7.66E-09	4.33E-07	11/45
11	Development EGFR signaling pathway	1.41E-08	7.00E-07	13/71
12	Cell cycle Nucleocytoplasmic transport of CDK/Cyclins	1.48E-08	7.00E-07	7/14
13	Cell cycle Cell cycle (generic schema)	1.84E-08	7.48E-07	8/21
14	Apoptosis and survival_FAS signaling cascades	1.85E-08	7.48E-07	8/44
15	Development Thromboxane A2 pathway signaling	2.02E-08	7.60E-07	11/49
16	Development PACAP signaling in neural cells	2.28E-08	8.06E-07	10/39
17	Development IGF-1 receptor signaling	3.92E-08	1.23E-06	11/52
18	Development FGF-family signaling	3.92E-08	1.23E-06	11/52
19	Cell cycle ESR1 regulation of G1/S transition	6.54E-08	1.95E-06	9/33
20	Cytoskeleton remodeling TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	7.71E-08	2.18E-06	15/111

Lista gerada no software Metacore. P.value representa o valor estatístico da associação dos genes de nossa lista com a via indicada. FDR indica o índice de confiança para esse mesmo teste. Ratio indica a quantidade de genes de nossa lista em relação ao número total de genes dessa via. Em destaque (negrito) estão as vias ligadas com apoptose.

Interessantemente, a segunda via com maior número de genes do nosso estudo é via de controle do ciclo celular relacionada a transição da fase G1 para fase S (Figura 19), que contem os seguintes genes alvos: Cyclin D1, TGF-beta receptor type II, CDC25A, Brca1, PP2A regulatory, CDK4, p27KIP1, Cyclin D, p16INK4, SMAD2, Cyclin A, Cyclin D2.

Figura 18. Via de indução de apoptose via fosforilação de BAD. O desenho da via foi gerado automaticamente no software Metacore, nele os genes presentes na lista de genes são indicados por uma barra vermelha ao lado do símbolo do gene. O anexo 1 identifica função a cada símbolo indicado na figura.

Figura 19. Via controle de ciclo celular G1/S. O desenho da via foi gerado automaticamente no software Metacore, nele os genes presentes na lista de genes são indicados por uma barra vermelha ao lado do símbolo do gene.

5.6 Comparação da expressão dos miRNAs miR-21 e miR-24 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com EMRR e EMSP do Brasil e da Suécia

Com o objetivo de ampliar os achados no grupo de pacientes brasileiros com EM, usei uma bolsa BEPE da FAPESP para um estágio de cinco meses no laboratório da Dra. Maja Jagodic, no Instituto Karolinska, Suécia, onde tive a oportunidade de avaliar a expressão dos miRNAs miR-21 e miR-24 nos pacientes com EEMM e EESP da Suécia, além da possibilidade ímpar de validar nossos resultados numa amostra de pacientes europeus. O laboratório da Dra. Maja tem ampla experiência no estudo de marcadores genéticos associados com a EM. O estudo com os pacientes da Suécia revelou que miR-21 teve uma expressão diminuída nos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com EMRR em relação ao controle (Figura 22A), enquanto que o miR-24 apresentou expressão aumentada nos linfócitos T CD8⁺ (Figura 22B). O mesmo não foi observado nos pacientes com pacientes com EMSP (Figura 22A e B). O resultados dos miRNAs miR-21 e miR-24 são similares aos obtidos nos pacientes brasileiros (Figura 9 e 10).

Dada a importância do papel do miR-21 na fisiopatologia de outras doenças autoimunes como Diabetes (RUAN *et al.*, 2011) e Lúpus (GARCHOW *et al.*, 2011; STAGAKIS *et al.*, 2011), decidimos aprofundar os estudos sobre desse miRNA no modelo animal clássico para a Esclerose Múltipla denominado de EAE.

Figura 22. Análise da expressão gênica do miR-21 e do miR-24 em linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis ou pacientes com EMRR ou EMSP. O símbolo * sobre um tipo celular denota que ocorreu variação significativa $p < 0,05$ na comparação entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM de determinado tipo. Expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$ sendo a normalização feita a partir do RNU48 e RNU44. **A.** miR-21. **B.** miR-24

5.7 Indução do miR-21 durante o curso da EAE

A partir do sétimo dia após a indução da EAE em com MOG ocorreu um aumento da expressão do miR-21 (Figura 23A) nas células presentes no linfonodo inguinal dos ratos, que persistiu até o vigésimo quinto dia de avaliação. Diante deste resultado, decidimos analisar a expressão do miR-21 em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ das células isoladas do linfonodo. O resultado mostrou a modulação do miR-21 apenas nos linfócitos T $CD4^+$ (Figura 23B).

Figura 23. Análise da expressão gênica do miR-21 no curso da EAE. A. Em RNA proveniente de Linfonodos de ratos DA no curso da EAE. B. Em RNA proveniente de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD4^+CD8^-$ isolados de ratos DA no sétimo dia após a imunização dos ratos. Expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ sendo a normalização feita a partir do RNU6B. **A.** miR-21 analisado nos durante o curso da EAE. **B.** miR-21 analisado em subpopulações de linfócitos T no sétimo dia do curso da EAE.

5.8 Regulação *in vitro* do miR-21 em resposta a estímulos específicos durante a proliferação e diferenciação de linfócitos T $CD4^+$

5.8.1 Proliferação

Após os resultados de indução do miR-21 no modelo da EAE, decidimos monitorar sua expressão em modelos *in vitro* da resposta imune.

No modelo de proliferação cultivamos linfócitos T CD4⁺ naives, isolados de ratos saudáveis, a doses crescentes de anti-CD3 durante cinco dias. Interessantemente, observamos que a expressão do miR-21 inversamente proporcional à proliferação dos linfócitos (Figura 24A e B).

Figura 24. Análise da expressão gênica do miR-21 na proliferação. **A.** Em RNA proveniente de linfócitos CD4⁺CD25⁻ de ratos DA cultivadas por cinco dias com as concentrações de anti-CD3 indicadas no gráfico. Expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$ sendo a normalização feita a partir do RNU6B. **B.** Análise da proliferação das mesmas células utilizando o método de contagem Timidina tritiada (métodos 1.8).

5.8.2 Diferenciação

Para compreender melhor os mecanismos que regulam a expressão do miR-21 em linfócitos T CD4⁺ da EAE, testamos diferentes misturas de citocinas (métodos 1.9) capazes de ativar a diferenciação dos linfócitos seletivamente para os diferentes tipos de células T auxiliares (*T helper* Th), Th1, Th2, Th17 e Treg. O resultado dessa análise revelou a indução da expressão do miR-21 apenas nas células Th2 e Th17 (Figura 25A). O passo seguinte foi avaliar quais das citocinas presentes no meio para a diferenciação da Th17 (IL-6, IL-1beta e IL-23) era capaz de ativar o miR-21. Nessa análise foi observada indução significativa do miR-21 apenas no grupo de células cultivadas com todas as citocinas (Figura 25B).

Uma vez definidas as duas condições associadas com a regulação do miR-21, isto é, repressão durante a proliferação e indução na diferenciação de Th17, decidimos avaliar se a

IL-2, um indutor clássico da proliferação, era capaz de regular negativamente o miR-21 em condições de diferenciação da Th-17. Para esse fim, linfócitos T CD4⁺ naive foram cultivados com as citocinas indutora do padrão Th17 em três condições: 1. Na ausência de IL-2; 2. Na presença de IL-2, e 3. Na presença de inibidor de IL-2. O resultado demonstrou que mesmo durante a diferenciação, a IL-2 inibe a expressão do miR-21 (Figura 25C), sugerindo assim que a via de proliferação domina sobre a via de diferenciação, e que o miR-21 pode ter um papel importante nesses dois processos (figura 25C).

Figura 25. Análise da expressão gênica do miR-21 na diferenciação de linfócitos CD4⁺CD25⁻ de ratos DA cultivadas por cinco dias sob as condições indicadas no gráfico e descritas no item 4.4.5. Expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$ sendo a normalização feita a partir do RNU6B. A. Expressão do miR21 nos diferentes meios de diferenciação. B. Expressão do miR-21 com diferentes citocinas. C. Expressão do miR-21 e a influência da IL-2.

6 DISCUSSÃO

6.1 Associação do miRNAs miR-15a e 16-1 na modulação de vias de apoptose em em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com EMRR em surto

A diminuição da expressão do miR-15a e miR-16-1 em linfócitos T CD4⁺ em EMRR observada em nosso estudo (Figura 1D e F) pode ser explicada pela redução da expressão de fatores de transcrição que regulam sua expressão. Essa hipótese é apoiada pelos achados que apontam o gene TP53 como um dos fatores de regulação a expressão dos miR-15a/16-1 (FABBRI *et al.*, 2011), e também pela observação de que o gene TP53 tem sua expressão diminuída em pacientes em surto de EMRR (BOMPRESZI *et al.*, 2003; FOSSEY *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2010).

A maioria dos tratamentos disponíveis para EM atua modificando a resposta imune do paciente. Esse fato aumenta a importância dos resultados apresentados no presente estudo, uma vez que a coleta de todos os pacientes foram realizadas antes do tratamento dos pacientes em surto, permitindo assim correlacionar a expressão dos miRNAs com um mecanismo celular envolvido nesta doença. Como regra, o papel dos miRNAs na modulação de processos biológicos é determinado em conjunto com os genes alvos. Seguindo esse raciocínio, decidimos avaliar a expressão do gene BCL2 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos mesmos pacientes por dois motivos: 1) o BCL2 codifica uma proteína que inibe a apoptose (KROEMER, 1997), mecanismo genético importante na fisiopatologia da EM, e 2) que é um dos alvos dos miR-15a/16-1 validados experimentalmente (CIMMINO *et al.*, 2005). Os resultados dessa análise mostraram a diminuição da expressão de BCL2 em PBMCs dos pacientes com EMRR (Figura 2A), corroborando com os resultados de microarranjos de RNAm neste mesmo grupo de células (SATOH *et al.*, 2006; ACHIRON *et al.*, 2007). A

grande questão é saber quais das células componentes do PBMC, contribuem efetivamente para a diminuição do BCL2. Por outro lado, outros estudos relataram a expressão aumentada do gene BCL2 em linfócitos T CD4⁺ isolados de PBMC de pacientes com EM (SHARIEF, MATTHEWS e NOORI, 2003; ANGERSTEIN *et al.*, 2012), corroborando assim com nossos resultados (Figura 3B).

Já é sabido que na EMRR, ocorrer a diminuição da apoptose em linfócitos T CD4⁺ específicos para proteínas da mielina. Essa redução possibilita a ativação periférica do linfócitos e posterior migração para as células do SNC, causando danos à mielina, oligodendrócitos e neurônios (ZIPP, 2000; WAICZIES *et al.*, 2002). A ativação de genes relacionados com a inibição da apoptose no sangue periférico de pacientes com EM é um indicativo de foco inflamatório no CNS, que pode ser confirmada por ressonância magnética. Portanto, a análise de marcadores genéticos de apoptose em EMRR pode ser útil no monitoramento da evolução da doença.

6.2 Pacientes com EMRR em remissão apresentam diminuição do número de linfócitos T CD8⁺ de memória central

A quantificação das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo em amostras de pacientes com EMRR em remissão revelou um aumento significativo das células de memória efetora RA em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como a diminuição das células de memória central na população de linfócitos T CD8⁺. O balanço existente entre o número de células naive e as de memória nos pacientes com EMRR já é conhecido (SALLUSTO *et al.*, 1999), mas os resultados divergem entre os estudos. Por exemplo, foi demonstrado o aumento das células de memória central e a diminuição das de memória efetora em linfócitos T CD8⁺ (LIU *et al.*, 2007). O inverso foi observado por Haegle e colaboradores (2007) (HAEGELE

et al., 2007). O desenvolvimento do fármaco Fingolimod, conhecido comercialmente com Gilenya, permitiu o estudo do controle dessas células nos pacientes com EM. Essa molécula, um análogo competitivo do ligante do receptor S1P1, impede a saída dos linfócitos T de memória central CCR7 positivos, dos linfonodos para a circulação periférica (BRINKMANN *et al.*, 2010; CHUN e HARTUNG, 2010). Esse mecanismo fez com que o uso dessa droga se tornasse importante no tratamento de pacientes com EMRR, uma vez que a circulação dessa célula está relacionada com o número de surtos inflamatórios.

Foi descrito por Mehling e colaboradores (2008) que pacientes com EM tratados com Fingolimod apresentaram redução significativa da quantidade de células de memória central circulantes (MEHLING *et al.*, 2008). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que células que expressam marcadores Th17, como as CCR4 e CCR6, que estão presentes no grupo de linfócitos T CD4⁺ de memória central, são reduzidas após o tratamento com Fingolimod (MEHLING *et al.*, 2010). Os benéficos dessa droga reforçam o papel dessas células na fisiopatologia da EM. Portanto, o melhor entendimento dos mecanismos moleculares que controlam a proliferação e a morte dessas células é necessário para a compreensão das causas da EM.

6.3 Expressão elevada de miRNAs em linfócitos T CD8⁺ de memória central em pacientes com EMRR em remissão

Para saber se os miRNAs tem algum papel na modulação das vias gênicas que controlam a proliferação e a morte dos linfócitos T envolvidos na evolução da EM, decidimos analisar o perfil global de expressão de miRNAs nas subpopulações de linfócitos. Dos 64 miRNAs diferencialmente expressos entre as subpopulações de linfócitos T de pacientes com EMRR (tabelas 5, 6 e 7), confirmamos que 9 deles tinham aumento de expressão significativa nos linfócitos T CD8⁺ de memória central (miRNAs-16, miRNAs-20a, miRNAs-21, miRNAs-

24, miRNAs-155, miRNAs-221, miRNAs-222, miRNAs-720 e miRNAs-1281). Essa assinatura de miRNAs nas células CD8⁺ de memória central é inédita e pode ser um caminho para o entendimento do controle da sobrevivência dessas células, uma vez que alguns desses miRNAs já foram associados com esse processo e são novidades em relação a EMRR, como os miR-221, miR-222, miR-24, miR-720 e miR-1281.

O miR-221 e miR-222 já foram descritos como oncomiRs, pois encontram-se hiperexpressos em diversos tipos de tumores como o câncer de próstata (GALARDI *et al.*, 2007; YAMAN AGAOGLU *et al.*, 2011), mama (LAMBERTINI *et al.*, 2012) em tumores dependentes de andrógenos (ZHENG, YINGHAO e LI, 2012). Nos tumores gástricos sua expressão está associada com a progressão tumoral e com mau prognóstico (LIU *et al.*, 2012). Recentemente esses miRNAs foram associados pela primeira vez com a Artrite Reumatoide (PANDIS *et al.*, 2012). Portanto, o presente estudo é o segundo a ser associado com doença autoimune.

O miR-24 também é outro bem conhecido, que tem como principal função o controle da proliferação celular, pois regulam a expressão dos genes E2F2 e MYC (LAL *et al.*, 2009). Esse miRNA também já foi associado ao processo de apoptose em células Hela (CHENG *et al.*, 2005) e linfócitos T CD8⁺ ativados, regulando principalmente o gene H2AX (BRUNNER *et al.*, 2012). Outro estudo revelou que o miR-24 regula a expressão do gene BCL-2 (SRIVASTAVA *et al.*, 2011), mostrando mais uma vez a relevância dessa assinatura de miRNAs no controle da apoptose.

Em relação ao miR-720, sua expressão foi associada com alguns tipos de neoplasias, como a síndrome mielodisplásica (BORZE *et al.*, 2011) e o câncer colorretal (DELLA VITTORIA SCARPATI *et al.*, 2012; RAGUSA *et al.*, 2012). Esse miRNA também está expresso na placenta (ENQUOBAHRIE *et al.*, 2011) e no soro de mulheres grávidas (GU *et al.*, 2012). Recentemente um estudo analisando linhagem de células de carcinoma esofágico

associou o controle de expressão deste miRNA pelo fator de transcrição SnoN (*Ski-related novel gene*), bem como determinou o gene TP63 como seu primeiro alvo (SHINOZUKA *et al.*, 2013). Neste contexto, podemos associar a expressão deste miRNA ao controle de proliferação via o gene TP63 (CHIKH *et al.*, 2011). Portanto, o nosso estudo é o primeiro a associar o miR-720 com a EMRR.

Outro miRNA pouco estudado é o miR-1281. Sua baixa expressão já foi associada com mau prognóstico de câncer de bexiga (PIGNOT *et al.*, 2013). Sua expressão também foi verificada em neutrófilos após 5 horas de cultivo na presença de GMCSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating fator) (WARD *et al.*, 2011). Assim, novamente nosso estudo é o primeiro a associar o miR-1281 com a EMRR.

Devemos ressaltar também que outros miRNAs presentes em nossa assinatura já foram associados com a EMRR, como por exemplo a expressão do miR-155 em sangue periférico e em linfócitos T (FENOGLIO *et al.*, 2011; PARABOSCHI *et al.*, 2011; WASCHBISCH *et al.*, 2011). Este por sua vez é fundamental para o desenvolvimento da EM em modelo animal (MURUGAIYAN *et al.*, 2011). Dois outros miRNAs, miR-21 e miR-20a, já foram associados com a EMRR (COX *et al.*, 2010; FENOGLIO *et al.*, 2011; BERGMAN *et al.*, 2013; KELLER *et al.*, 2013). Portanto nossos resultados são relevantes, pois acrescentam novos miRNAs que podem atuar no desenvolvimento da EMRR.

6.4 Regulação da apoptose por miRNAs em linfócitos T CD8⁺ de memória central

A tabela 9 descreve três vias de indução da apoptose que podem ser reguladas por miRNAs em linfócitos T CD8⁺: Via da Activina A (NISHIHARA, OKAHASHI e UEDA, 1993), Via de fosforilação de BAD (YANG *et al.*, 1995; DATTA *et al.*, 2002) e a Via de ativação do receptor de morte FAS (TRAUTH *et al.*, 1989). Consideramos esta associação

muito interessante, uma vez que a apoptose é o principal processo que controlam a sobrevivência dos linfócitos T, desde a seleção Tímica (NEWTON, HARRIS e STRASSER, 2000) até a etapa de retração da resposta imune (MIYAWAKI *et al.*, 1992; DHEIN *et al.*, 1995). A apoptose tem sido amplamente estudada como um mecanismo importante na fisiopatologia da EMRR. Os primeiros estudos demonstram a indução de doença autoimune com mutações no gene LPR (MATSUZAWA *et al.*, 1990), que posteriormente foram associadas à via FAS/FASL (WATANABE-FUKUNAGA *et al.*, 1992). A partir dessas correlações, um grupo de pesquisa alemão liderado pela Dra. Frauke Zipp realizou diversas descobertas sobre o papel desse mecanismo na EM. Eles determinaram a relação dos níveis de FASL e de seu inibidor com a regulação da apoptose em pacientes com EM (ZIPP *et al.*, 1998a; ZIPP *et al.*, 1998b). Posteriormente foi demonstrado o papel dos genes TRAIL e BCL-X (WENDLING *et al.*, 2000; WAICZIES *et al.*, 2002; WANDINGER *et al.*, 2003) com a inibição da apoptose em linfócitos T na EMRR. Outros estudos, por sua vez, demonstraram que as drogas utilizadas no tratamento da EM agiam regulando a apoptose em linfócitos T isolados de pacientes com EMRR. No caso do Acetato de Glatimer, foi verificado que a droga induzia a apoptose em linfócitos T CD4⁺ a partir da modulação de genes pró- e anti-apoptóticos, BAX e BCL-2, respectivamente, nos linfócitos T CD4⁺ (RIEKS *et al.*, 2003).

De maneira geral podemos sugerir que a diminuição do número de células memória central CD8⁺ observada em nosso estudo pode estar relacionada com a indução da apoptose, uma vez que vários genes desta via são alvos preditos e/ou validados pelos miRNAs identificados no presente estudo (Figuras 14C, 18, 20 e 21). Alguns dados suportam essa hipótese. Por exemplo, já foi determinado que a via de fosforilação de BAD está relacionada com a apoptose de linfócitos T na ausência de IL-7 (LI *et al.*, 2004). Por outro lado, essa mesma citocina tem grande importância na sobrevivência de linfócitos T efetores e de memória, ativando os genes BCL-2, BCL-XL e MCL-1, que são supressores de apoptose (CHETOUI *et*

al., 2010). Outro ponto a ser destacado é a importância da IL-7 em doenças autoimunes. Em Diabetes (PENARANDA *et al.*, 2012), o bloqueio da IL-7 inibe a ação de linfócitos T de memória. Na EM a IL-7 foi associada com a ação de células Th17 encéfalo-patogênicas (LIU *et al.*, 2010). Além disso, já foi descrito na EM um polimorfismo no receptor da IL-7 que potencializa sua ação, aumentando a sobrevivência das células de memória em amostras de pacientes com EM (ZHANG *et al.*, 2005; FANG *et al.*, 2011; LUNDSTROM *et al.*, 2013). Com base nessas observações, sugerimos que as vias ativadas pela IL-7 estejam relacionadas com o controle da apoptose nos linfócitos T CD8⁺ de memória central.

6.5 Expressão aumentada do miR-21 em linfócitos CD4⁺ em modelo animal de EM

A expressão elevada do miR-21 já foi demonstrada em lesões cerebrais (LESCHER *et al.*, 2012) e linfonodos (BERGMAN *et al.*, 2013) de modelo de EAE. No nosso trabalho, demonstramos pela primeira vez que a expressão do miR-21 observada em linfonodos era restrita aos linfócitos T CD4⁺. Sugerindo que o miR-21 possa ter um papel importante no curso da EAE, onde os linfócitos T CD4⁺ são as células mais ativas nesse processo inflamatório. Os experimentos realizados em busca dos processos indutores do miR-21 em linfócitos mostraram inicialmente a repressão desse miRNA durante a proliferação (figura 24). Nesse caso é provável que a citocina IL-2 possa participar da inibição do miR-21. Essa conclusão tem como base a observação de que o fator de transcrição STAT5 quando fosforilado liga-se à região promotora do miR-21 inibindo sua expressão (ILIOPOULOS *et al.*, 2011). Também já é conhecido que a IL-2 promove a ativação e a fosforilação da STAT5 (JOHNSTON *et al.*, 1995; LOCKYER, TRAN e NELSON, 2007), que por sua vez é induzida durante a proliferação de linfócitos T CD4⁺ (CANTRELL, COLLINS e CRUMPTON, 1988).

Desse modo sugerimos que a inibição da expressão do miR-21 é indiretamente promovida pela IL-2.

Como observado na figura 25A, e diferente do processo de proliferação, o miR-21 é induzido durante a diferenciação nas condições de cultivo para Th2 e Th17. No caso da Th17 a indução do miR-21 era de certa forma esperada, uma vez que já foi demonstrado que o fator de transcrição STAT3 induz a expressão do miR-21 (LOFFLER *et al.*, 2007; VAN DER FITS *et al.*, 2011), bem como é necessário para a diferenciação em Th17 (MATHUR *et al.*, 2007). Além disso as citocinas usadas no cultivo para diferenciação em Th17 (IL-6, IL-23, IL-1beta e TGF-beta) são capazes de induzir a expressão do STAT3 (IVANOV, ZHOU e LITTMAN, 2007). Desse modo demonstramos uma nova situação onde o miR-21 é ativado pelo STAT3.

Diante dessas observação, uma das questões levantadas durante o estudo foi se o miR-21 é de fato necessário na diferenciação da Th17. Os resultados apresentados na figura 24C indicam apenas que a indução do miR-21 é dependente de STAT3, uma vez que a adição IL-2 em condições de diferenciação em Th17 inibiu a expressão do miR-21. Essa inibição é deve ser mediada pelo STAT5, que é ativado pela IL-2 e compete diretamente com o STAT3 no promotor do miR-21 (ILIOPOULOS *et al.*, 2011). Assim, para responder essa questão, é necessária a realização de experimentos de diferenciação em linfócitos de animais knock-out para o miR-21.

A análise em conjunto de todos os experimentos realizados em modelo animal EAE, sugere que a expressão elevada do miR-21 nos linfonodos desses animais pode ser restrita aos linfócitos T CD4⁺ Th17, visto que alguns estudos relatam a presença marcante das citocinas indutoras de Th17, como IL-6 e IL-21, nas células dos linfonodos analisados (THESEN HEDREUL *et al.*, 2009). Além disso diversos outros estudos tem associado os linfócitos Th17 com a EAE (ARANAMI e YAMAMURA, 2008; JIN *et al.*, 2009; ALMOLDA *et al.*, 2011; ROTHHAMMER *et al.*, 2011).

Semelhante ao realizado com o miR-155 (MURUGAIYAN *et al.*, 2011), seria importante estudar os mecanismos genéticos envolvidos na EM, em modelo animal deficiente para o miR-21. Esse estudo está sendo realizado no Karolinska Institutet em colaboração a Dra. Maja Jagodic. Os resultados iniciais indicam que o miR-21 é necessário para o desenvolvimento da EM.

7 CONCLUSÕES

A seguir estão as principais conclusões do presente estudo:

- Verificamos a modulação negativa do miR15a e do miR16-1 em PBMCS e em linfócitos T CD4⁺ totais de pacientes com EMRR em estágio de surto. Ao mesmo tempo, determinamos o aumento da expressão do gene BCL-2 nas mesmas células;
 - Portanto, a análise de marcadores genéticos de apoptose em EMRR pode ser útil no monitoramento da evolução da doença.
- Observamos a expressão elevada dos miRNAs miR-15a, 16, 20a, 21, 24, 155, 221, 222, 720 e 1281 em linfócitos T CD8⁺ de memória central em pacientes com EMRR no estágio de remissão;
 - De maneira geral podemos sugerir que a diminuição do número de células memória central CD8⁺ observada em nosso estudo pode estar relacionada com a indução da apoptose, uma vez que vários genes desta via são alvos preditos e/ou validados pelos miRNAs identificados no presente estudo
- Foi verificada a indução da expressão do miR-21 no curso da EAE em ratos e a expressão do mesmo em linfócitos T CD4⁺ diferenciados no padrão de resposta Th17.
 - A análise em conjunto de todos os experimentos realizados em modelo animal EAE, e *in vitro* sugere que a expressão elevada do miR-21 observada nos linfonodos desses animais pode ser restrita aos linfócitos T CD4⁺ Th17,

Em resumo, o conjunto desses resultados demonstra a relevância dos miRNAs na fisiopatologia da EMRR, principalmente no controle da apoptose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIRON, A. *et al.*. Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1107, p. 155-67, 2007.

ALLAVENA, R. *et al.*. CNS elevation of vascular and not mucosal addressin cell adhesion molecules in patients with multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 176, n. 2, p. 556-62, 2010.

ALMOLDA, B. *et al.*. Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27473, 2011.

AMBROS, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 823-6, 2001.

AMBROS, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 673-6, 2003.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-5, 2004.

AMOR, S. *et al.*. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. **J Immunol**, v. 153, n. 10, p. 4349-56, 1994.

ANGERSTEIN, C. *et al.*. Integration of MicroRNA Databases to Study MicroRNAs Associated with Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**, 2012.

ANTEL, J. *et al.*. Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity? **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 5, p. 627-38, 2012.

ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). **Allergol Int**, v. 57, n. 2, p. 115-20, 2008.

BAHBOUHI, B. *et al.*. Peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1049-63, 2009.

BARREIRA, A. A. B. D. M. V. **Imunologia Clínica das Doenças Neurológicas**. São Paulo: Atheneu, 2008. 317-343

BECKMANN, N. *et al.* . In vivo visualization of macrophage infiltration and activity in inflammation using magnetic resonance imaging. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, n. 3, p. 272-98, 2009.

BERGMAN, P. *et al.* . Next-generation sequencing identifies microRNAs that associate with pathogenic autoimmune neuroinflammation in rats. **J Immunol**, v. 190, n. 8, p. 4066-75, 2013.

BOMPRESZI, R. *et al.* . Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 17, p. 2191-9, 2003.

BORZE, I. *et al.* . miRNA expression profiles in myelodysplastic syndromes reveal Epstein-Barr virus miR-BART13 dysregulation. **Leuk Lymphoma**, v. 52, n. 8, p. 1567-73, 2011.

BRINKMANN, V. *et al.* . Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 11, p. 883-97, 2010.

BRUCHOVA, H. *et al.* . Erythropoiesis in polycythemia vera is hyper-proliferative and has accelerated maturation. **Blood Cells Mol Dis**, v. 43, n. 1, p. 81-7, 2009.

BRUNNER, S. *et al.* . Upregulation of miR-24 is associated with a decreased DNA damage response upon etoposide treatment in highly differentiated CD8(+) T cells sensitizing them to apoptotic cell death. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 579-87, 2012.

CANTRELL, D. A.; COLLINS, M. K.; CRUMPTON, M. J. Autocrine regulation of T-lymphocyte proliferation: differential induction of IL-2 and IL-2 receptor. **Immunology**, v. 65, n. 3, p. 343-9, 1988.

CHENG, A. M. *et al.* . Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 4, p. 1290-7, 2005.

CHETOUI, N. *et al.* . Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 418-26, 2010.

CHIKH, A. *et al.* . iASPP/p63 autoregulatory feedback loop is required for the homeostasis of stratified epithelia. **EMBO J**, v. 30, n. 20, p. 4261-73, 2011.

CHUN, J.; HARTUNG, H. P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. **Clin Neuropharmacol**, v. 33, n. 2, p. 91-101, 2010.

CIMMINO, A. *et al.* . miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13944-9, 2005.

COTTRELL, D. A. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. **Brain**, v. 122 (Pt 4), p. 625-39, 1999.

COX, M. B. *et al.* . MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12132, 2010.

CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 10, p. 704-14, 2009.

DAI, R. *et al.* . Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4591-7, 2008.

DATTA, S. R. *et al.* . Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. **Dev Cell**, v. 3, n. 5, p. 631-43, 2002.

DELLA VITTORIA SCARPATI, G. *et al.* . A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 83, n. 4, p. 1113-9, 2012.

DHEIN, J. *et al.* . Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 438-41, 1995.

DU, C. *et al.* . MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 12, p. 1252-9, 2009.

EBERS, G. C. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. **Brain**, v. 123 Pt 3, p. 641-9, 2000.

ENQUOBAHRIE, D. A. *et al.* . Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, n. 2, p. 178 e12-21, 2011.

FABBRI, M. *et al.* . Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **JAMA**, v. 305, n. 1, p. 59-67, 2011.

FANG, L. *et al.* . Interleukin-7 receptor alpha gene polymorphism influences multiple sclerosis risk in Asians. **Neurology**, v. 76, n. 24, p. 2125-7, 2011.

FENOGLIO, C. *et al.* . Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4⁺ cell activation in patients with multiple sclerosis. **Neurosci Lett**, v. 504, n. 1, p. 9-12, 2011.

FOSSEY, S. C. *et al.* . Identification of molecular biomarkers for multiple sclerosis. **J Mol Diagn**, v. 9, n. 2, p. 197-204, 2007.

GALARDI, S. *et al.* . miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. **J Biol Chem**, v. 282, n. 32, p. 23716-24, 2007.

GANDHI, R. *et al.* . Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 73, n. 6, p. 729-40, 2013.

GARCHOW, B. G. *et al.* . Silencing of microRNA-21 in vivo ameliorates autoimmune splenomegaly in lupus mice. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 10, p. 605-15, 2011.

GARCIA, D. M. *et al.* . Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 18, n. 10, p. 1139-46, 2011.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* . Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biol**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GILABERT-ESTELLES, J. *et al.* . Role of microRNAs in gynecological pathology. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 15, p. 2406-13, 2012.

GU, H. *et al.* . Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects. **J Neurochem**, v. 122, n. 3, p. 641-9, 2012.

GU, S. *et al.* . Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 2, p. 144-50, 2009.

GUERAU-DE-ARELLANO, M. *et al.* . miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: from microarray to deep sequencing. **J Neuroimmunol**, v. 248, n. 1-2, p. 32-9, 2012.

GUO, J. *et al.* . Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 4, p. 652-7, 2009.

HAEGELE, K. F. *et al.* . Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. **J Neuroimmunol**, v. 183, n. 1-2, p. 168-74, 2007.

HE, S. *et al.* . Aurora kinase A induces miR-17-92 cluster through regulation of E2F1 transcription factor. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 12, p. 2069-76, 2010.

HECKER, M. *et al.* . MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 16087-110, 2013.

HOUZET, L. *et al.* . MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. **Retrovirology**, v. 5, p. 118, 2008.

ILIOPOULOS, D. *et al.* . The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 6, p. 1754-63, 2011.

INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS, C. *et al.* . Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 214-9, 2011.

IVANOV, II; ZHOU, L.; LITTMAN, D. R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. **Semin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 409-17, 2007.

JIN, W. *et al.* . Regulation of Th17 cell differentiation and EAE induction by MAP3K NIK. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6603-10, 2009.

JOHNSTON, J. A. *et al.* . Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 19, p. 8705-9, 1995.

JUNKER, A. *et al.* . MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. **Brain**, v. 132, n. Pt 12, p. 3342-52, 2009.

KALMAN, B.; LUBLIN, F. D. The genetics of multiple sclerosis. A review. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 8, p. 358-70, 1999.

KASPER, L. H.; SHOEMAKER, J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. **Neurology**, v. 74 Suppl 1, p. S2-8,

KELLER, A. *et al.* . Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7440, 2009.

KELLER, A. *et al.* . Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. **Mult Scler**, 2013.

KREMENCHUTZKY, M. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. **Brain**, v. 129, n. Pt 3, p. 584-94, 2006.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med**, v. 3, n. 6, p. 614-20, 1997.

KRZYWINSKI, M. *et al.* . Circos: an information aesthetic for comparative genomics. **Genome Res**, v. 19, n. 9, p. 1639-45, 2009.

LAGES, E. *et al.* . MicroRNAs: molecular features and role in cancer. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 17, p. 2508-40, 2012.

LAL, A. *et al.* . miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. **Mol Cell**, v. 35, n. 5, p. 610-25, 2009.

LAMBERTINI, E. *et al.* . Correlation between Slug transcription factor and miR-221 in MDA-MB-231 breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 12, p. 445, 2012.

LANA-PEIXOTO, M. A. *et al.* . The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 2, p. 102-7, 2012.

LESCHER, J. *et al.* . MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions. **J Neuroimmunol**, v. 246, n. 1-2, p. 27-33, 2012.

LI, W. Q. *et al.* . Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. **J Biol Chem**, v. 279, n. 28, p. 29160-6, 2004.

LINDBERG, R. L. *et al.* . Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 888-98, 2010.

LIU, G. Z. *et al.* . Increased CD8⁺ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 13, n. 2, p. 149-55, 2007.

LIU, K. *et al.* . Increased Expression of MicroRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance. **J Int Med Res**, v. 40, n. 2, p. 467-74, 2012.

LIU, X.; FORTIN, K.; MOURELATOS, Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. **Brain Pathol**, v. 18, n. 1, p. 113-21, 2008.

LIU, X. *et al.* . Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. **Nat Med**, v. 16, n. 2, p. 191-7, 2010.

LOCKYER, H. M.; TRAN, E.; NELSON, B. H. STAT5 is essential for Akt/p70S6 kinase activity during IL-2-induced lymphocyte proliferation. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5301-8, 2007.

LOFFLER, D. *et al.* . Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1330-3, 2007.

LOPEZ-ROMERO, P. Pre-processing and differential expression analysis of Agilent microRNA arrays using the AgiMicroRna Bioconductor library. **BMC Genomics**, v. 12, p. 64, 2011.

LORENZI, J. C. *et al.* . miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4⁺ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. **Int J Neurosci**, v. 122, n. 8, p. 466-71, 2012.

LUNDSTROM, W. *et al.* . Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 19, p. E1761-70, 2013.

MACKAY, I. R.; ANDERSON, W. H. What's in a name? Experimental encephalomyelitis: 'Allergic' or 'autoimmune'. **J Neuroimmunol**, v. Epub ahead of print, 2010.

MAJOROS, W. H.; OHLER, U. Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. **BMC Genomics**, v. 8, p. 152, 2007.

MATHUR, A. N. *et al.* . Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 4901-7, 2007.

- MATSUZAWA, A. *et al.* . A new allele of the *lpr* locus, *lpr^{cg}*, that complements the *gld* gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. **J Exp Med**, v. 171, n. 2, p. 519-31, 1990.
- MEHLING, M. *et al.* . FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 71, n. 16, p. 1261-7, 2008.
- MEHLING, M. *et al.* . Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. **Neurology**, v. 75, n. 5, p. 403-10, 2010.
- MIYAWAKI, T. *et al.* . Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 149, n. 11, p. 3753-8, 1992.
- MONTALBAN, X. *et al.* . MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. **Neurology**, v. 74, n. 5, p. 427-34, 2010.
- MULJO, S. A. *et al.* . Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. **J Exp Med**, v. 202, n. 2, p. 261-9, 2005.
- MURUGAIYAN, G. *et al.* . Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2213-21, 2011.
- NEWTON, K.; HARRIS, A. W.; STRASSER, A. FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. **EMBO J**, v. 19, n. 5, p. 931-41, 2000.
- NISHIHARA, T.; OKAHASHI, N.; UEDA, N. Activin A induces apoptotic cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 197, n. 2, p. 985-91, 1993.
- NYLANDER, A.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1180-8, 2012.
- O'CARROLL, D. *et al.* . A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. **Genes Dev**, v. 21, n. 16, p. 1999-2004, 2007.
- OTAEGUI, D. *et al.* . Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6309, 2009.
- OTTOBONI, L. *et al.* . An RNA profile identifies two subsets of multiple sclerosis patients differing in disease activity. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 153, p. 153ra131, 2012.

PANDIS, I. *et al.* . Identification of microRNA-221/222 and microRNA-323-3p association with rheumatoid arthritis via predictions using the human tumour necrosis factor transgenic mouse model. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 10, p. 1716-23, 2012.

PARABOSCHI, E. M. *et al.* . Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 12, p. 8695-712, 2011.

PENARANDA, C. *et al.* . IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 31, p. 12668-73, 2012.

PETTE, M. *et al.* . Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. **Neurology**, v. 40, n. 11, p. 1770-6, 1990.

PIGNOT, G. *et al.* . microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. **Int J Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2479-91, 2013.

PONOMAREV, E. D. *et al.* . MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. **Nat Med**, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2011.

RAGUSA, M. *et al.* . Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors. **J Mol Med (Berl)**, v. 90, n. 12, p. 1421-38, 2012.

RIEKS, M. *et al.* . Induction of apoptosis of CD4+ T cells by immunomodulatory therapy of multiple sclerosis with glatiramer acetate. **Eur Neurol**, v. 50, n. 4, p. 200-6, 2003.

ROSENFELD, N. *et al.* . MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 4, p. 462-9, 2008.

ROTHHAMMER, V. *et al.* . Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. **J Exp Med**, v. 208, n. 12, p. 2465-76, 2011.

RUAN, Q. *et al.* . The microRNA-21-PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic beta cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 29, p. 12030-5, 2011.

SALLUSTO, F. *et al.* . Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-12, 1999.

SATOH, J. *et al.* . T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. **J Neuroimmunol**, v. 174, n. 1-2, p. 108-18, 2006.

SCALFARI, A. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. **Brain**, v. 133, n. Pt 7, p. 1914-29, 2010.

SHARIEF, M. K.; MATTHEWS, H.; NOORI, M. A. Expression ratios of the Bcl-2 family proteins and disease activity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 134, n. 1-2, p. 158-65, 2003.

SHIN, S. *et al.* . MicroRNAs are significantly influenced by p53 and radiation in HCT116 human colon carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 34, n. 6, p. 1645-52, 2009.

SHINOZUKA, E. *et al.* . SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 1, p. 101-6, 2013.

SIEGEL, S. R. *et al.* . Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 5, p. 6219-25, 2012.

SONDERGAARD, H. B. *et al.* . Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. **Mult Scler**, 2013.

SRIVASTAVA, N. *et al.* . miR-24-2 controls H2AFX expression regardless of gene copy number alteration and induces apoptosis by targeting antiapoptotic gene BCL-2: a potential for therapeutic intervention. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 2, p. R39, 2011.

STAGAKIS, E. *et al.* . Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 8, p. 1496-506, 2011.

TAGANOV, K. D. *et al.* . NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 33, p. 12481-6, 2006.

THESSSEN HEDREUL, M. *et al.* . Characterization of Multiple Sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 210, n. 1-2, p. 30-9, 2009.

THOMPSON, A. J. *et al.* . Major differences in the dynamics of primary and secondary progressive multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 29, n. 1, p. 53-62, 1991.

THORNTON, P. *et al.* . Platelet interleukin-1alpha drives cerebrovascular inflammation. **Blood**, v. 115, n. 17, p. 3632-9, 2010.

TRAUTH, B. C. *et al.* . Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. **Science**, v. 245, n. 4915, p. 301-5, 1989.

VAN DER FITS, L. *et al.* . MicroRNA-21 expression in CD4+ T cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sezary syndrome. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 3, p. 762-8, 2011.

VENKEN, K. *et al.* . Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 6411-20, 2008.

VERGOULIS, T. *et al.* . TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D222-9, 2012.

WAICZIES, S. *et al.* . Elevated Bcl-X(L) levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 126, n. 1-2, p. 213-20, 2002.

WANDINGER, K. P. *et al.* . TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. **Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2036-43, 2003.

WARD, J. R. *et al.* . Regulation of neutrophil senescence by microRNAs. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15810, 2011.

WASCHBISCH, A. *et al.* . Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24604, 2011.

WATANABE-FUKUNAGA, R. *et al.* . Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 314-7, 1992.

WEINER, H. L. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? **Ann Neurol**, v. 65, n. 3, p. 239-48, 2009.

WEINSHENKER, B. G. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. **Brain**, v. 112 (Pt 1), p. 133-46, 1989.

WEINSHENKER, B. G. *et al.* . The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. **Brain**, v. 114 (Pt 2), p. 1045-56, 1991.

WENDLING, U. *et al.* . Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 7, p. 637-44, 2000.

WU, H. *et al.* . miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, p. e1020, 2007.

XU, S. *et al.* . The RNase III enzyme Dicer is essential for germinal center B-cell formation. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 767-76, 2012.

YAMAN AGAOGLU, F. *et al.* . Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. **Tumour Biol**, v. 32, n. 3, p. 583-8, 2011.

YANG, E. *et al.* . Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 285-91, 1995.

ZHANG, Z. *et al.* . Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. **Genes Immun**, v. 6, n. 2, p. 145-52, 2005.

ZHENG, C.; YINGHAO, S.; LI, J. MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. **Med Oncol**, v. 29, n. 2, p. 815-22, 2012.

ZHOU, Q. *et al.* . miR-142-3p is involved in CD25+ CD4 T cell proliferation by targeting the expression of glycoprotein A repetitions predominant. **J Immunol**, v. 190, n. 12, p. 6579-88, 2013.

ZHU, S. *et al.* . The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha. **Nat Med**, v. 18, n. 7, p. 1077-86, 2012.

ZIPPI, F. Apoptosis in multiple sclerosis. **Cell Tissue Res**, v. 301, n. 1, p. 163-71, 2000.

ZIPPI, F. *et al.* . Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. **J Neuroimmunol**, v. 86, n. 2, p. 151-4, 1998a.

ZIPPI, F. *et al.* . Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 43, n. 1, p. 116-20, 1998b.

ANEXOS

ANEXO 1

Ribeirão Preto, 12 de maio de 2010

Ofício nº 1464/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ASSINATURA DE EXPRESSÃO DE miRNAs DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T EM INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 307ª Reunião Ordinária realizada em 10/05/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 14/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

JULIO CESAR CETRULO LORENZI

PROF. DR. WILSON ARAÚJO DA SILVA JUNIOR

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP

ARTIGO PUBLICADO

International Journal of Neuroscience, Early Online, 1–6, 2012
 Copyright © 2012 Informa Healthcare USA, Inc.
 ISSN: 0020-7454 print / 1543-5245 online
 DOI: 10.3109/00207454.2012.678444

informa
healthcare

miR-15a and 16-1 Are Downregulated in CD4⁺ T Cells of Multiple Sclerosis Relapsing Patients

Julio Cesar Cetrulo Lorenzi,^{1,2} Doralina G. Brum,³ Dalila L. Zanette,^{1,2} Alessandra de Paula Alves Souza,^{2,4} Fernanda Gonçalves Barbuzano,² Antonio Carlos dos Santos,⁵ Amilton Antunes Barreira,³ and Wilson Araujo Silva, Jr.^{1,2}

¹Genetics Department, São Paulo University Medical school of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy (INCTC), Ribeirão Preto, Brazil

³Neurosciences Department, São Paulo University Medical School of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

⁴Immunology Department, São Paulo University Medical School of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

⁵Internal Medicine Department, São Paulo University Medical School of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

ABSTRACT

The pathology of relapsing–remitting multiple sclerosis (RR-MS) is largely attributed to activated autoreactive effector T lymphocytes. The influence of microRNAs on the immune response has been shown to occur in different pathways of lymphocyte differentiation and function. Here, the expression of the miRNAs miR-15a/16-1 in PBMC, CD4⁺, and CD8⁺ from RR-MS patients has been investigated. BCL2, a known miR-15a/16-1 target, has also been analyzed. The results have shown that miR-15a/16-1 is downregulated in CD4⁺ T cells, whereas BCL2 is highly expressed in RR-MS patients only. Our data suggest that miR-15a/16-1 can also modulate the BCL2 gene expression in CD4⁺ T cells from RR-MS patients, thereby affecting apoptosis processes.

KEYWORDS: apoptosis, BCL-2, lymphocytes, miRNAs

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating inflammatory disease of the central nervous system (CNS). The relapsing–remitting (RR) course is the most frequent clinical presentation of MS. Relapses are related to inflammatory lesions that can be detected by magnetic resonance imaging (MRI) [1]. The pathology of MS is largely attributed to activated autoreactive T-cell effectors, mainly CD4⁺, that migrate to the CNS through the blood–brain barrier. The inflammation caused by T lymphocytes is especially persistent in MS. This can be due to the increased proliferative capacity of autoreactive cells [2]; the enhanced expression of apoptosis

inhibitor (IAP) family members IAP, IAP-2, and X-IAP [3]; and the higher expression of anti-apoptotic molecules, such as BCL-2 [4, 5]. The BCL-2 gene has important functions in cell survival and death, since it controls the integrity of mitochondrial membranes and the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria [6, 7]. In this way, the inflammatory T cells present in MS become more resistant to apoptotic stimuli, thereby leading to persistent tissue inflammation.

The differential gene expression data regarding MS show that immune-related genes such as CXCR5, IL2RA, IL7R, IL7, IL12RB1, and IL22RA2 are related to MS [8–10]. The concepts involving gene expression regulation have evolved after the introduction of a new class of RNA, the microRNAs (miRNAs) [11], which are small RNAs that negatively regulate gene expression by degradation of mRNA targets or by interruption of translation. The influence of miRNA on the immune response has been demonstrated in many processes, such as lymphocyte differentiation [12] and T regulatory cell function [13]. The miRNA-15a and 16-1 cluster controls apoptosis by targeting BCL2, as observed by the

Received 9 November 2011.

These authors contributed equally to this work.

We thank Anemari Ramos Dinarte dos Santos for the technical support. This work has been supported by FAPESP (2010/00310-1, 1998/14247-6), CNPQ, CAPES, and FUNDHERP.

Address correspondence to Wilson Araujo da Silva Jr., Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Rua Catão Roxo, 2501, Monte Alegre, CEP 14051-140, Ribeirão Preto, Brasil. E-mail: wilsonjr@usp.br

2 J. C. C. Lorenzi *et al.*

inverse correlation between the expression of this miRNA cluster and the expression of pro-apoptotic BCL2 [14].

Considering that MS is an autoimmune disease and bearing in mind the importance of these miRNAs in immunologic processes, we have sought to investigate miRNA regulation in T CD4⁺ lymphocytes of MS relapsing patients.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Fifteen patients aged between 19 and 40 years, with defined RR-MS according to the McDonald criteria [15], were recruited for this work. Blood samples were collected right after the diagnosis of the relapse and before the onset of corticosteroid treatment. The Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) was used to assess neurological compromise [16]. As controls, blood samples were collected from 15 healthy age-matched subjects. The supplementary Table S1 (available online) shows clinical information about specific patients. This study was carried out with the approval of the Medical Ethics Committee of the HC-FMRP-USP, and an informed consent was obtained from all the participants.

Cell Purification

PBMCs were isolated from all the participating MS patients and healthy controls by Ficoll density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were isolated from five samples of each group (patients and controls) by positive selection using magnetic beads (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany). The purity of the obtained cell subsets was checked by flow cytometry and was found to be >95%.

RNA Extraction and Real-Time PCR

Total RNA was extracted from PBMC and from CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) reagent, according to the manufacturer's instructions. The RNA quantity and quality were verified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% agarose gel electrophoresis.

TaqMan assays were employed for the quantitative analysis of the miRNA expression of mature miRNAs (hsa-miR-16 [assay ID 000391] and hsa-miR-15a [assay ID 000389], as well as of the endogenous controls, RNU6B [assay ID 001093] and RNU48 [assay ID 001006]). These assays were also utilized for gene

expression analysis (BCL-2 [assay ID HS00369327_m1] and endogenous control HPRT [assay ID HS01003267_m1]) analysis. Reverse transcription was performed with 5.0 ng (miRNA) or 250 ng (gene expression) total RNA, using specific stem-loop primers for each miRNA and random primers for gene expression. To this end, the High-Capacity cDNA archive kit was used by following the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was diluted and employed in 15 μ L real-time PCR reactions using TaqMan Master Mix. All the reactions were performed in duplicates in a 7500 Sequence Detection System, and data were analyzed with the aid of the ABI-7500 SDS software. All the real-time PCR reactions were always conducted by including all the patients and controls in the same experiment. The total RNA input was normalized on the basis of the geometric mean of the Ct values for RNU6B and RNU48 for miRNA and of the Ct value of HPRT for gene expression. All the reagents were purchased from Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA. The expression values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method described by Wu *et al.* [17]. The fold change expression value was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data from healthy donors were used as calibrators.

Statistical Analysis

All the statistical analyses were accomplished by using the Graphpad Prism software (GraphPad Software, San Diego, USA). The gene expression among different patient groups was compared by means of *t*-student test followed by Mann-Whitney *U* test. *P*-Values lower than 0.05 were considered significant. To assess the correlation between miRNA and BCL2 expression, the Pearson correlation was applied, and linear regression analysis was used for comparison of the fold change values of each patient for miRNAs and the BCL2 gene. Both analyses examine each pair of measurements (one from the miRNA and the other from BCL2) to determine whether the two variables tend to move together or in the opposite direction; i.e., whether the larger values of the miRNA (high expression) are associated with the lower values of BCL2 expression.

RESULTS

miR-15a/16-1 Is Downregulated in PBMC Cells From RR-MS Patients.

There was significantly lower miR-15a ($p < .001$) and miR-16-1 ($p < .001$) expression in nontreated, recently diagnosed RR-MS patients as compared to healthy donors (Figures 1(a) and (c)).

FIGURE 1. miRNA expression analyses by real-time PCR. (A) miR-16-1 expression from PBMC, (B) miR-16-1 expression from CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, (C) miR-15a expression from peripheral blood mononuclear cells, (D) miR-15a expression from CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Analyses from relapsing MS patients and healthy donors. The relative expression was calculated using the 2^{-ΔCt} method.

Lower Expression of miR-15a/16-1 Is Found Exclusively in the Case of the CD4⁺ T Subset of RR-MS Patients

In order to investigate which subtypes of T cells effectively contribute to the reduction of miR-15a/16-1 expression detected in the PBMC of RR-MS patients, the expression of these miRNAs in the CD4⁺ and CD8⁺ T cells of PBMC subsets from five patients was further analyzed. There was lower miR-15a/16-1 expression in CD4⁺ T lymphocytes from RR-MS patients only, as compared to the healthy donors (Figures 1(b) and (d)). There was no significant difference between RR-MS patients and healthy donors in terms of CD8⁺ T cells (Figures 1(b) and (d)).

BCL2 Is Highly Expressed in the T CD4⁺ Cells From RR-MS Patients

Because BCL2 is an experimentally validated target of miR-15a and miR-16-1 [14,18], and since these miRNAs are downregulated in RR-MS patients, the relationship between BCL2 gene expression and miR-15a/16-1 expression was investigated. Lower BCL2 expression was verified in PBMC ($p = .004$) from MS patients as compared to healthy donors, but analysis of T-cell

subsets revealed that BCL2 gene expression was higher only in the CD4⁺ T cell subset from MS patients ($p = .047$) (Figures 2(a) and (b)). These results are in accordance with the concept of inverse regulation between the miR-15a/16-1 cluster and its validated target, BCL2. Therefore, the next step was to find out whether the BCL2 mRNA expression was inversely correlated with the miR-15a/16-1 levels in the CD4⁺ and CD8⁺ T subsets. A statistically significant inverse correlation (Figure 3) was observed between BCL2 mRNA and miR-16-1 ($P = .0087$, $R = -0.9403$) and miR-15a ($P = .0052$, $R = -0.9577$) in the CD4⁺ subset. These data corroborate two recent reports showing high BCL2 expression in the CD4⁺ T cells from MS patients. [5, 19]. As for the CD8⁺ subset, this correlation was not significant.

DISCUSSION

In the present study, the expression profiles of miR-15a/16-1 in PBMC and in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from RR-MS patients have been presented. Interestingly, it has been found that miR-15a/16-1 are downregulated in PBMC and CD4⁺, but not in CD8⁺ T lymphocytes during MS relapse. The lower expression

4 J. C. C. Lorenzi *et al.*

FIGURE 2. Evaluation of BCL2 mRNA expression by real-time PCR. (A) BCL2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and MS relapsing patients. (B) BCL2 mRNA expression from CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes from healthy donors and MS relapsing patients. The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta C_t}$ method.

of these miRNAs in PBMC and CD4⁺ T lymphocytes could be related to the reduced expression of transcription factors that promote their expression. Fabbri et al. have recently demonstrated that TP53 directly binds to the regulatory sites of the miR-15a/16-1 gene [20]. Moreover, other studies have reported that relapse MS patients have lower TP53 expression than healthy controls [21–23]. A similar type of regulation could also explain the status of miR-15a/16-1 expression in the MS relapsing patients.

The majority of treatments available for MS patients act by modifying the individual's immune response, which highlights the importance of the results shown here, since they have been obtained from untreated RR-MS patients. The selection of these patients has enabled us to hypothesize that there is a correlation between miRNA expression and the cellular mechanism involved on the onset of this disease.

The BCL2 gene has been selected among the miRNA targets because it encodes an apoptosis-inhibitory protein [24] and is a validated target of the miR-15a/16-1

FIGURE 3. Scatter plot based on the Pearson correlation between miRNA and BCL2 expression levels. (A) Inverse correlation between miR-16-1 and BCL2 expression in T CD4⁺ lymphocytes from MS patients. (B) Inverse correlation of the miR-15a correlation with BCL2 expression in T CD4⁺ lymphocytes from MS patients. The correlation between the BCL2 mRNA and miR-16-1/miR-15a levels was determined by Pearson analysis and linear regression. The x axis denotes the fold change (MS vs. healthy subjects) for each of the miRNAs, and the y axis corresponds to the BCL2 gene. R: regression value; P: P value. Black line represents the regression line.

cluster [14]. Our results have revealed decreased BCL2 gene expression in PBMC from MS patients in relapse, in agreement with previous reports using microarray analysis [25]. Moreover, Satoh et al. have described that the BCL2 gene expression is only reduced in the non-T lymphocytes present in PBMC [26], suggesting that the diminished BCL2 expression in PBMC found in our study could be related to the non-T lymphocyte population. On the other hand, BCL2 overexpression in CD4⁺ T lymphocytes isolated from PBMC of MS relapsing patients has also been reported in other studies [4, 5, 27]. Our selected RR-MS patients had lower miR-15a/16-1 cluster expression in CD4⁺ T lymphocytes accompanied by higher BCL2 expression in the same cells. Interestingly, the inverse correlation between BCL2 and miR-15a/16-1 expression is highly significant. Together, the present findings suggest that the lower apoptosis rates found in the CD4⁺ T lymphocytes from RRMS patients

could be related to the higher BCL2 expression, which could be a result of the lower miR-15a/16-1 cluster expression. In contrast, studies with MS remission patients have revealed lower levels of inflammation [28], high apoptosis rate in lymphocytes [29], and lower BCL2 expression as compared to relapsing patients [25, 30]. So, it should be expected that MS remission patients could have higher miR-15a/16-1 cluster levels as compared to relapsing patients. The present findings also point to the fact that the lower apoptosis rates detected in the CD4⁺ T lymphocytes from RRMS patients could bear relation with the higher BCL2 expression, which could be a result of the lower miR-15a/16-1 cluster expression.

CONCLUSION

Here, it has been demonstrated that the strong inverse correlation between the downregulation of the miR-15a/16-1 cluster and the overexpression of the BCL2 gene in the CD4⁺ T-cell subset from MS relapsing patients suggest the potential importance of the miRNA 15a/16-1 cluster expression in the physiopathology of MS.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. Barkhof F. MRI in multiple sclerosis: correlation with expanded disability status scale (EDSS). *Mult Scler*. 1999;5(4):283-6.
2. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol*. 1998;160(3):1532-8.
3. Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins. *J Neuroimmunol*. 2002;122(1-2):159-66.
4. Sharief MK, Matthews H, Noori MA. Expression ratios of the Bcl-2 family proteins and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;134(1-2):158-65.
5. Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, Cao W, Qiu J, Guo Z, Bi E, Zang L, Lu C, Zhang JZ, Pei G. Critical regulation of CD4⁺ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol*. 2007;8(8):817-24.
6. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
7. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217-45.
8. International Multiple Sclerosis Genetics C, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-223.
9. Elizabeth PB, Russell B, Laure KC, Emma HW, Roxana del R, Sean AD, Dimitry NK, Naresha S, Cory T. Genetics of experimental allergic encephalomyelitis supports the role of T helper

- cells in multiple sclerosis pathogenesis. *Annals of Neurology*. 2011;70:886-97.
10. Patsopoulos N, t.S.C.o.S.E.L-b. the Bayer Pharma Ms Genetics Working Group, A.C.G.I.M.S.G.C. a Ccr1-Antagonist, P. de Bakker. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Annals of neurology*. 2011;70(6):897-1809.
 11. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107(7):823-6.
 12. Cobb B, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, Smale S, Sakaguchi S, Livesey F, Fisher A, Merken-schlager M. A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med*. 2006;203(11):2519-27.
 13. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen G, Zhang G, Feng Z. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4⁺CD25⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*. 2009;10(2):180-5.
 14. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(39):13944-9.
 15. Yazici H, Zipprich J, Peng T, Akisik EZ, Tigli H, Isin M, Akisik EE, Terry MB, Senie RT, Li L, Peng M, Liu Z, Dalay N, Santella RM. Investigation of the miR16-1 (C > T) + 7 Substitution in Seven Different Types of Cancer from Three Ethnic Groups. *J Oncol*. 2009;2009:827532.
 16. Waiczies S, Weber A, Lunemann JD, Aktas O, Zschenderlein R, Zipp F. Elevated Bcl-X(L) levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2002;126(1-2):213-20.
 17. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1020.
 18. Yue JG, Tigyi. Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. *Mamm Genome*. 2010;21(1-2):88-94.
 19. Haegert DG, Hackenbroch JD, Duszczyszyn D, Fitz-Gerald L, Zastepa E, Mason H, Lapierre Y, Antel J, Bar-Or A. Reduced thymic output and peripheral naive CD4 T-cell alterations in primary progressive multiple sclerosis (PPMS). *J Neuroimmunol*. 2011;233(1-2):233-9.
 20. Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, Spizzo R, Nicoloso MS, Rossi S, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*. 2011;305(1):59-67.
 21. Fossey SC, Vnencak-Jones CL, Olsen NJ, Sriram S, Garrison G, Deng X, PS Crooke, 3rd, Aune TM. Identification of molecular biomarkers for multiple sclerosis. *J Mol Diagn*. 2007;9(2):197-204.
 22. Deng X, Ljunggren-Rose A, Maas K, Sriram S. Defective ATM-p53-mediated apoptotic pathway in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2005;58(4):577-84.
 23. Bompreszi R, Ringner M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkhouloun A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JM. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12(17):2191-9.
 24. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3(6):614-20.
 25. Achiron A, Feldman A, Mandel M, Gurevich M. Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1107:155-67.

6 J. C. C. Lorenzi *et al.*

26. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2005;18(3):537–50.
27. Zetti UK, Kuhlmann T, Bruck W. Bcl-2 expressing T lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24(3):202–8.
28. Okuda Y, Apatoff B, Posnett D. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006;171(1–2):163–233.
29. Rinta S, Kuusisto H, Raunio M, Paalavuo R, Levula M, Lehtimäki T, Elovaara I. Apoptosis-related molecules in blood in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2008;205(1–2):135–176.
30. Arthur A, Armati P, Bye C, Southern MSGC, Heard R, Stewart G, Pollard J, Booth D. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC Med Genet.* 2008;9(17).