Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Laboratório de Imunogenética Molecular

**O papel funcional do miR-155 no controle pós-transcricional de mRNAs
envolvidos no desenvolvimento de timócitos**

Pós-Graduando: Rafaela de Freitas Martins Felício

Orientador: Geraldo A. S. Passos Jr.

Ribeirão Preto – SP

2016

RAFAELA DE FREITAS MARTINS FELÍCIO

**O PAPEL FUNCIONAL DO MIR-155 NO CONTROLE PÓS-TRANSCRICIONAL DE
MRNAS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE TIMÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia
Orientador: Prof. Dr. Geraldo A. S.
Passos Jr.

Ribeirão Preto – SP

2016

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Felício, Rafaela Freitas

O papel funcional do miR-155 no controle pós-transcricional de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos/ Rafaela de Freitas Martins Felício; Orientador Geraldo A. S. Passos Jr. - Ribeirão Preto, 2016.

83f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2016

1. Desenvolvimento de timócito 2. miR-155 3. eletrotransfecção 4. Anti-miR-155

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela de Freitas Martins Felício

O papel funcional do miR-155 no controle pós-transcricional de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Imunologia

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Rafael Felício e Ruth Felício.

*Se cheguei ao fim de mais um ciclo,
foi por causa do apoio de vocês que
nunca mediram esforços para
realizar meus sonhos.*

À minha irmã Sthefany Felício.

*Meu amor incondicional por você
me inspira a me tornar uma pessoa
cada dia melhor e continuar
buscando meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior. Por todo ensinamento, compreensão, paciência, comprometimento e profissionalismo admirável durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo, Fiocruz Rio de Janeiro, em especial a Dra. Daniella Mendes da Cruz que nos auxiliou na elaboração desse projeto.

Ao Departamento de Genética, onde está situado o Laboratório de Imunogenética Molecular.

Agradeço aos colegas de Laboratório de Imunogenética Molecular pelas discussões produtivas. Em especial agradeço a Dra Amanda Freire pelo auxílio nas análises bioinformática.

À amiga Dra Ernna Hérída pela co-orientação, dedicação para que fosse desenvolvido esse projeto e pelos ensinamentos nas diversas conversas que tivemos durante esse período.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela minha formação e à secretária Ana, por toda ajuda e paciência.

À CAPES pelo auxílio da bolsa durante o mestrado e à FAPESP (projeto 13/17481-1) pelo apoio financeiro.

Às amigas de longa data Eduarda Pavan, Isabela Lopes, Izadora Wercelens e Karine Souza que mesmo a distância se fizeram presentes nos momentos difíceis.

Aos amigos de pós-graduação do programa de Imunologia Básica e Aplicada. Naira Anchieta e Pedro Alexandre pelas discussões durante nossas disciplinas. À Amanda Goulart, Josiane Carvalho e Ítala Silva que sempre se dispuseram em ajudar no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

Em especial agradeço aos amigos Leandro Ávila e Luna de Lacerda, pelo companheirismo, paciência e por sempre disponibilizar tempo nos momentos de angústia ou nos momentos de comemoração. Vocês se tornaram irmãos e ao lado de vocês minha evolução pessoal se tornou mais fácil.

Às amigas que conheci nessa cidade, Camila Okubo, Jhennyfer Rodrigues e Carolina Fernandes, pelos momentos de distração e pela ótima convivência em nossa casa que proporcionou um ambiente de paz. Em especial agradeço a Pamela Viani e a Maraiza Gomes por se fazerem presentes em todos os momentos sem medir esforços para me ajudar no desenvolvimento desse trabalho ou na vida particular.

Por fim agradeço aos familiares, amigos que se fizeram presentes com carinho e apoio e a todos os profissionais que auxiliaram para que fosse desenvolvido este trabalho.

RESUMO

Felício, Rafaela Freitas. **O papel funcional do miR-155 no controle pós-transcricional de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos.** 2016, 83f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O timo é um órgão linfóide primário, responsável pela indução da tolerância imunológica central. Histologicamente esse órgão é formado por um estroma composto por células tímicas epiteliais (TECs) além de outros tipos celulares. Dentre as TECs encontramos as células tímicas epiteliais corticais (cTECs) e as células tímicas epiteliais medulares (mTECs), as quais são responsáveis pela seleção positiva e seleção negativa dos timócitos em desenvolvimento, respectivamente. Durante seu desenvolvimento intra-tímico, os timócitos modulam a expressão de genes de marcadores de diferenciação, os chamados clusters de diferenciação (CDs) além de outros genes. Neste projeto nós nos interessamos por este aspecto, ou seja, o controle da expressão gênica durante a diferenciação dos timócitos. Como os microRNAs (miRNAs) são elementos essenciais de controle fino da expressão gênica, atuando ao nível pós-transcricional de RNAs mensageiros (mRNAs) de células eucarióticas, nosso interesse foi o de estudar este tipo de controle em timócitos. Dentre as centenas de miRNAs já descritos no camundongo, o miRNA 155 (miR-155) é o mais expresso no timo e no baço sendo que seu papel foi já demonstrado em células T maduras periféricas, mas ainda não se estudou seu possível papel em timócitos em desenvolvimento. A partir das evidências do papel do miR-155 nas células T maduras, nós elaboramos a hipótese de que esse miRNA também atua no desenvolvimento de timócitos. Para testar essa hipótese, nós utilizamos a estratégia de silenciamento do miR-155 por meio de eletroporação (eletrotransfecção) do antagonista Anti-miR-155 diretamente no timo de camundongos BALB/c. Os timócitos de camundongos controle e silenciados foram então separados por citometria de fluxo e amostras de RNA dessas células foram então analisadas por meio de qRT-PCR para nos certificarmos da eficiência do silenciamento do miR-155 e por hibridizações com microarrays de mRNAs para a análise do transcriptoma. Observamos que o silenciamento do miR-155 provoca a modulação de um grande conjunto de mRNAs, os quais foram analisados com auxílio do banco de dados do “Immunological Genome Project” (ImmGen) quanto aos seus aspectos funcionais focando no desenvolvimento de timócitos. Os mRNAs modulados e envolvidos neste processo, foram ainda reanalisados quanto sua capacidade de interagir por hibridização com o miR-155 (hibridização miRNA-mRNA) por meio da ferramenta computacional RNA-Hybrid. Por meio destas estratégias, conseguimos repertoriar um conjunto de mRNAs que codificam proteínas importantes para o desenvolvimento de timócitos e que são potencialmente controlados por miR-155.

Palavras chave: Desenvolvimento de timócito, miR-155, eletrotransfecção e Anti-miR-155

ABSTRACT

Felício, Rafaela Freitas. **The functional role of miR-155 in post-transcriptional control of mRNAs involved in thymocyte development.** 2016, 83f. Thesis. School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2016

The thymus is a primary lymphoid organ responsible for the induction of central immune tolerance. Histologically this organ is formed by a thymic stroma composed of thymic epithelial cells (TECs) and other cell types. The TEC cells are subdivided into cortical thymic epithelial cells (cTECs) and medullary thymic epithelial cells (mTECs), which are responsible for positive selection and negative selection of developing thymocytes, respectively. During its intra-thymic development, thymocytes modulate the gene expression of differentiation markers, so-called clusters of differentiation (CD) and other genes. In this project we are interested in the control of gene expression during the differentiation of thymocytes. As microRNAs (miRNAs) are essential elements of fine control of gene expression, acting at the post-transcriptional level of messenger RNAs (mRNAs) of eukaryotic cells, our interest was to study this type of control in thymocytes. Among the hundreds of miRNAs been described in mice, miRNA 155 (miR-155) is strongly expressed in the thymus and spleen and its role was already demonstrated in peripheral mature T cells, but has not yet been studied during the thymocyte development. Taking into account the evidence for the role of miR-155 in mature T cells, we raise the hypothesis that this miRNA is also active in developing thymocytes. To test this, we use the miR-155 silencing strategy by using electroporation (electrotransfection) of anti-miR-155 antagonist directly into the thymus of BALB/c mice. The thymocytes of control or silenced mice were then separated by flow cytometry and RNA samples from these cells were initially analyzed by qRT-PCR to make sure of miR-155 silencing efficiency and then by hybridization with microarrays for mRNA transcriptome analysis. We note that miR-155 silencing cause modulation of a large set of mRNAs, which were analyzed through "Immunological Genome Project" (ImmGen) database focusing on developing thymocytes. The modulated mRNAs that were involved in this process were also retested for their ability to interact with miR-155 (miRNA-mRNA hybridization) by means of RNA-Hybrid computational tool. Through these strategies we were able to found a set of mRNAs encoding proteins important for the development of thymocytes that are potentially controlled by miR-155.

Keywords: Development thymocyte, miR-155, electro-transfection and Anti-miR-155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e função do timo e estágios de desenvolvimento dos timócitos..	18
Figura 2. Biogênese e diferentes funções dos microRNAs.	22
Figura 3. Ilustração do processo de eletroporação no timo <i>in vivo</i>	30
Figura 4. Eletroforese microfluídica das amostras de RNA total isoladas de timócitos..	39
Figura 5. Avaliação dos níveis transcricionais de miR-155 em timócitos separados do timo após 24 horas de eletrotransfecção com anti-miR-155..	40
Figura 6. Agrupamento hierárquico gerado a partir dos dados de expressão de mRNAs de maneira global.....	41
Figura 7. Heatmap que compara o perfil de expressão de mRNAs em timócitos do grupo controle e o silenciado.....	42
Figura 8. Representação dos processos biológicos nos quais os mRNAs diferencialmente expressos estão envolvidos (percentual).	43
Figura 9. Gráfico ilustrativo dos mRNAs diferencialmente expressos que estão envolvidos no processo do sistema imune e da resposta imune.....	44
Figura 10. Estágios de desenvolvimento dos timócitos que os mRNAs envolvidos nesse processo são mais expressos.....	50
Figura 11. Representação dos processos biológicos que os 200 mRNAs mais induzidos e os 200 mRNAs mais reprimidos estão envolvidos (percentual). ...	52
Figura 12. Frequência de timócitos segundo seus fenótipos.....	64
Figura 13. Ilustração em gráfico de barras da frequência de timócitos CD44 ⁺ CD25 ⁻ (DN1), CD44 ⁺ CD25 ⁺ (DN2), CD44 ⁻ CD25 ⁺ (DN3), CD3 ^{low} CD4 ⁺ CD8 ⁺ (DP), CD3 ^{hi} CD4 ⁺ (SP CD4 ⁺) e CD3 ^{hi} CD8 ⁺ (SP CD8 ⁺) dos grupos controle e tratado com anti-miR-155.	65
Figura 14. Confirmação dos dados de microarray por PCR quantitativa em tempo real para o mRNA Adam 8.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: mRNAs induzidos e suas respectivas funções no desenvolvimento de timócitos	45
Tabela 2: mRNAs reprimidos e suas respectivas funções no desenvolvimento de timócitos	45
Tabela 3: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de localização e seus valores de expressão.....	53
Tabela 4: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de locomoção e seus valores de expressão.....	53
Tabela 5: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de adesão celular e seus valores de expressão.....	53
Tabela 6: mRNAs que estão envolvidos no processo de componente celular e biogênese, e seus valores de expressão	54
Tabela 7: mRNAs que estão envolvidos no processo de regulação biológica e seus valores de expressão	54
Tabela 8: mRNAs que estão envolvidos no processo de desenvolvimento celular e seus valores de expressão.....	54
Tabela 9: mRNAs que estão envolvidos no processo celular e seus valores de expressão.....	55
Tabela 10: mRNAs que estão envolvidos no processo do sistema imune e seus valores de expressão	57
Tabela 11: mRNAs que estão envolvidos no processo biológico de reprodução e seus valores de expressão.....	57
Tabela 12: mRNAs que estão envolvidos no processo metabólico	58
Tabela 13: mRNAs que estão envolvidos no processo biológico de respostas a estímulos e seus valores de expressão	59
Tabela 14: Interação entre as sequências miR-155/mRNAs e seus respectivos valores de energia livre (mfe)	61

LISTA DE ABREVIATURA

Aire: *Autoimmune regulator*

APC: Allophycocyanin

APECED: Poliendocrinopatia-Candidiase- Ectodérmica Autoimune

CCL: *Cysteine-Cysteine Chemokine Ligand*

CCR: *Cysteine-Cysteine Chemokine Receptor*

CD: *Cluster Differentiation*

cDNA: DNA complementar

cTEC: células epiteliais corticais tímicas

CXCR: *Cysteine-X-Cysteine Chemokine Receptor*

Cy3: Cianina 3

Cy7: Cianina 7

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DN: Duplo Negativo

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP: Duplo Positivo

DTT: Ditionitreitol

FDR: *False Discovery Ratio*

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GO: *Gene Ontology*

IL: Interleucina

IMMGEN: *Immunological Genome Project Database*

Ly-51: *Enpep Glutamyl Aminopeptidase*

MFE: *Minimum Free Energy*

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

mRNA: RNA mensageiro

miRNA: microRNA

ms: Milisegundos

mTEC: Células Epiteliais Medulares Tímicas

NKT_44+NK1_1+_Th: Precursor NKT CD44+ NK1.1+ Timo Invariante

NKT_44+NK1_1-_Th: Precursor NKT CD44+ NK1.1- Timo Invariante

NKT_44-NK1_1-_Th: Precursor NKT CD44- NK1.1- Timo Invariante

pb: Pares de Base

PE: R-Phycoerythrin

PerCP: Proteína Clorofila Peridina

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PGE: *Promiscuous Gene Expression* (Expressão Gênica Promíscua)

preT_DN3-4_Th: Transição DN3 para DN4

preT_DN3B_Th: Duplo Negativo 3b

preT_DN3A_Th: Duplo Negativo 3a

preT_DN2-3_Th: Transição DN2 para DN3

preT_DN2B_Th: Duplo Negativo 2b

preT_DN2A_Th: Duplo Negativo 2a

preT_DN2_Th: Duplo Negativo 2

preT_ETP-2A_Th: Transição de precursor de células T para DN2a

preT_ETP_Th: Precursor de Células T

PTA: *Peripheral Tissue Antigen* (Antígeno de Tecido Próprio)

qRT-PCR: *Real-Time Quantative Reverse Transcription PCR*

RISC: *RNA-Induced Silencing Complex*

RNA: Ácido Ribonucleico

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal

snoRNA: *Small Nucleolar RNA*

SP: Simples Positivo

TCR: Receptor de Células T

T_8SP24-_Th: Simples Positiva Cd8⁺, Madura

T_8SP24int_Th: Simples Positiva Cd8⁺, Semimadura

T_8SP69+_Th: Simples Positiva Cd8⁺, Intermediária

T_4int8+_Th: Seleção Positiva, Intermediária

T_4SP24-_Th: Simples Positiva Cd4⁺, Madura

T_4SP24int_Th: Simples Positiva Cd4⁺, Semimadura

T_4SP69+_Th: Simples Positiva Cd4⁺, Intermediária

T_4+8int: Seleção Positiva, Intermediário

T_DP69+_Th: Duplo Positivo, Início da Seleção Positiva

T_DPsm_Th: Duplo Positivo, Pequeno Repouso

T_DPbl_Th: Duplo Positivo, Pequeno Repouso

T_DP_Th: Todas as Células Duplo Positivas

T_ISP_Th: Simples Positiva Imadura

T_DN4_Th: Duplo Negativo 4

TECs: Células Epiteliais Tímicas

Tgd_vg3+24alo_e17_Th: Timo Fetal, Precursor DEC, DN Maduro

Tgd_vg2+24alo_Th: Vg2+ Tímico Maduro

Tgd_vg1+vd6+24alo_Th: Vg1.1+ vd6.3+ Tímico Maduro

Tgd_vg1+vd6-24alo_Th: Vg1.1+ vd6.3- Tímico Maduro

Tgd_vg5+24ahi_Th: Vg5+ Tímico Maduro

Tgd_vg3+24ahi_e17_Th: Timo Fetal, Precursor de DEC, DN Imaturo

Tgd_vg2+24ahi_e17_Th: Vg2+ Tímico Fetal, DN Imaturo

Tgd_vg2+24ahi_Th: Vg2+ Tímico Imaturo

Tgd_vg1+vd6+24ahi_Th: Vg1.1+ vd6.3+ Tímico Imaturo

Tgd_vg1+vd6-24ahi_Th: Vg1.1+ vd6.3- Timo Imaturo

Tgd_Th: TCR Gama-Delta Tímico, todos DN

Th: *T helper*

Treg: T reguladora

TSAs: *Tissue Specific Antigens* (Antígenos Tecido Específico)

UTR: *Untranslated Region*

V: Volts

WT: *Wild Type*

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Hipótese	28
3. Objetivo	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivo Específico	29
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Linhagem de camundongo Balb/c	30
4.2 Processo de eletroporação no timo in vivo	30
4.3 Fenotipagem dos timócitos	31
4.4 Extração de RNA total e análise da sua integridade	32
4.5 Reação de transcrição reversa do miR-155	32
4.6 Reação de polimerização em cadeia quantitativa e em tempo real (qRT-PCR) para detecção do miR-155	33
4.7 Reação de polimerização em cadeia quantitativa e em tempo real (qRT-PCR) para detecção de mRNA Adam 8 (validação dos dados de microarray).	33
4.8 Análise estatística dos resultados de qRT-PCR	34
4.9 Hibridizações com oligo microarrays	34
4.9.1 mRNA microarray	34
4.9.2 Análise de dados de microarrays	36
4.10 Enriquecimento funcional dos mRNAs diferencialmente expressos	37
4.11 Determinação da interação entre o miR-155 e mRNAs, através da energia livre mínima de hibridização	38
5. Fluxograma do Trabalho	39
6. Resultados	40
6.1 Avaliação da expressão do miR-155	40
6.2 Efeito do silenciamento de miR-155 na regulação pós-transcricional em timócitos	41
6.3 Análise do enriquecimento funcional	43
6.4 Identificação de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos	45

6.5 Enriquecimento funcional dos mRNAs mais modulados sob o silenciamento do miR-155.....	52
6.6 Validação <i>in silico</i> da interação entre o miR-155 e os mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos	62
6.7 Efeito biológico no desenvolvimento de timócitos sob o silenciamento do miR-155.....	64
7. Discussão	68
8. Conclusão.....	75

1. INTRODUÇÃO

O timo é uma pequena glândula bilobada caracterizada como um órgão linfóide primário. Está situado no tórax no mediastino superior em frente à traqueia e atrás do osso esterno. Esse órgão é constituído de células mesenquimais, endoteliais, células dendríticas e células epiteliais tímicas (TECs) (Gordan & Manley 2011). As TECs são as responsáveis pela organização do estroma do órgão, que por sua vez é histologicamente dividido em córtex e medula (Fausto et al. 2004). A principal função desse órgão é induzir a tolerância imunológica central, sendo que as TECs medeiam a deleção de células T em desenvolvimento no interior do timo (timócitos), já que o repertório de células T ativadas devem ser tolerantes aos antígenos próprios (Banchereau & Steinman 1998).

Dentre as TECs encontram-se as células tímicas epiteliais corticais (cTECs), envolvidas na seleção positiva e as células tímicas epiteliais medulares (mTECs), envolvidas na seleção negativa dos timócitos em desenvolvimento (Starr et al. 2003).

Durante a indução de tolerância central, os timócitos passam por diferentes estágios de desenvolvimento caracterizados pela expressão de proteínas de superfície celular chamadas de “clusters de diferenciação” (CDs). Durante o desenvolvimento, surgem nesta sequência os timócitos duplo-negativos (DN), DN1 ($CD44^+CD117^+CD25^-$), DN2 ($CD44^+CD117^+CD25^+$), DN3 ($CD44^-CD117^-CD25^+$), os duplo-positivos (DP) ($CD4^+CD8^+CD3^{lo}TCR$) e os simples-positivos (SP) ($CD4^+CD8^-TCRCD3^{hi}$ ou $CD4^-CD8^+TCRCD3^{hi}$) (Puthier et al. 2010) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura e função do timo e estágios de desenvolvimento dos timócitos. O timo é dividido em córtex que é composto pelas células cTECs e a medula que é composta pelas mTECs e células dendríticas (DCs). As células precursoras dos linfócitos T migram para o córtex do timo através da junção cortico-medular. No córtex, os timócitos se diferenciam em Duplo Negativos 1 (DN1), passando sequencialmente para o estágio DN2 e estágio DN3. Ainda nesse local, as células passam pela seleção positiva e expressam os marcadores CD4 e CD8 se tornando timócitos Duplo Positivos (DP). Essas células migram para medula, onde passam pela seleção negativa e se tornam células Simples Positivas ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^+CD8^+$). CEC = célula epitelial cortical; MEC = célula epitelial medular (Extraído e modificado de (Blackburn & Manley 2004).

O desenvolvimento dos timócitos durante a tolerância central é controlado por diferentes fatores de transcrição expressos em cada fase. Na transição da fase de DN para DP ocorre a expressão de *Glioblastoma (Gli) 2 e 3*, *T cell factor 1 (Tcf1)*, *Bone morphogenetic protein (Bmp) 2, 4 e 7*, *Shh*, *Notch1*, *Smarca4*, *Dtx*, *pSmad2*, *Alk4*, *ActR11*, *Inhba*, *Tgfb1*, *Bmpr1a* e *Bmpr2* (Staal et al. 2001; Hager-Theodorides et al. 2005; Rowbotham et al. 2009; Puthier et al. 2010; Jurberg et al. 2015). Na fase DP as células expressam *Ets2*, *RorgamaT*, *Gdf 7 e 11* (Puthier et al. 2010; Jurberg et al. 2015). A transição das células DP para a fase SP é controlado pela expressão de *Gata3*, *Erg1*, *c-Myb*, *ThPOK* para diferenciação de célula $TCD4^+$ e *Runx3* para diferenciação de célula $TCD8^+$ (Lesourne et al. 2009).

Além desses fatores de transcrição que estão envolvidos no desenvolvimento, há também aqueles que estão envolvidos em outros processos importantes como proliferação de timócitos incluindo *Il7r* (González-García et al. 2012), via de

apoptose como Bax e Bak1 (Hutcheson et al. 2005), sobrevivência como Jak3 (Eynon et al. 1999), sinapse como Cd6 e Cd5 (Puthier et al. 2010), seleção positiva como o Tox e Themis (Lesourne et al. 2009; Puthier et al. 2010) e seleção negativa como Adam8 (Gossens et al. 2010).

Para ocorrer a indução de tolerância central, as células progenitoras de timócitos entram no timo através da vascularização da junção cortico medular (CMJ) que expressa P-selectina responsável pelo rolamento e integrina responsável pela adesão, que interagem com CCR9 e CCR7 expressos no progenitor de timócito (Zlotoff et al. 2010). Nesse estágio o timócito migra para o córtex tímico e é definido como DN1. Ainda no córtex o timócito passa ser caracterizado como DN2 e começa a expressar CXCR4, fazendo com que essa célula permaneça nesse local e passa ser caracterizado como DN3. Neste estágio DN3, ocorre o término do rearranjo da cadeia beta ou cadeia delta do receptor TCR, há uma sinalização pré-TCR controlada pela cTEC que produz CXCR4, Notch-1 e IL-7 que são importantes para diferenciação e proliferação dessa célula, além disso, expressa CCR9 que coordena a mudança para o próximo estágio de Duplo positivo (Hu et al. 2015).

Os timócitos duplo positivos (DP) são caracterizados pelo término do rearranjo da cadeia alfa ou da cadeia gama dos receptores de célula T (TCR). Portanto os timócitos podem se diferenciar em TCR α/β ou TCR γ/δ (Ladi et al. 2006). Nesse estágio, os timócitos sofrem seleção positiva que consiste no reconhecimento de antígenos próprios, apresentados pelas cTECs via MHC (Klein et al. 2009). Somente as células que expressam TCR que interagem com o complexo MHC próprio (MHC de classe II ou classe I) sobrevivem e se tornam simples positivas ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$) (Singer et al. 2008).

Os timócitos sobreviventes da seleção positiva expressam CD69, CCR4 e CCR7, o que medeia a migração dessas células para a medula do timo, onde é produzido CCL19, CCL21 (ligantes de CCR7), CCL17 e CCL22 (ligante de CCR4) (Ladi et al. 2006).

Na medula do timo ocorre a seleção negativa que leva a eliminação de clones que reconhecem antígenos próprios ou a diferenciação de células $CD4^+$ em T reguladoras (Treg) naturais (Reinhardt et al. 2014). A seleção negativa é coordenada pelo fenômeno conhecido como expressão gênica promíscua (pGE), que consiste na expressão de antígenos de tecidos periféricos (PTAs) pelas mTECs maduras

(Derbinski et al. 2001; Magalhães et al. 2006; Cheng et al. 2007; Macedo et al. 2009; Gascoigne et al. 2016).

A pGE é parcialmente regulada pelo modulador da transcrição *Autoimmune regulator* (Aire) (Giraud et al. 2012; Bruserud et al. 2016). A proteína codificada por esse gene, atua na liberação da RNA polimerase II (RNA Pol II) posicionada nas regiões promotoras de genes de PTAs ao longo da cromatina, promovendo a transcrição dos mesmos nas células mTECs maduras que possuem o fenótipo MHC-II⁺ e moléculas co-estimulatórias CD80⁺ (Giraud et al. 2012). As mTECs processam os peptídeos de PTAs e os apresentam via MHC-II para os timócitos que expressam TCR específicos. Quando a interação MHC-TCR ocorre com alta avides, os timócitos são deletados (Giraud et al. 2012; Bruserud et al. 2016).

A mutação no gene Aire leva a distrofia poliendocrinopatia-candidiase-ectodérmica autoimune (APECED) em humanos, o que comprova que a presença deste gene é necessária para efetiva eliminação dos clones de timócitos autorreativos, através da expressão de PTAs (Kyewski & Derbinski 2004; Kyewski & Klein 2006; Mathis & Benoist 2007; Tykocinski et al. 2008). Desta forma, Aire tem-se mostrado essencial para manutenção da autotolerância imunológica e prevenção da autoimunidade agressiva.

Alguns antígenos próprios são expressos em mTECs de maneira independente de Aire, sugerindo que fatores adicionais também estão envolvidos no controle da pGE (Derbinski et al. 2005). Estudos recentes demonstram que mecanismos epigenéticos e modificações pós-transcricionais, como o resultado da atuação de miRNAs, regulam a pGE (Org et al. 2008; Ucar et al. 2013).

Os microRNAs (miRNA) são pequenas moléculas endógenas de RNAs com aproximadamente 22 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas. Os miRNAs atuam no controle pós-transcricional, através do pareamento complementar entre a sequência final 5' do miRNA maduro, conhecida como região *seed* e a sequência 3' não traduzida (3' UTR) do RNA mensageiro (mRNA) do gene alvo. O resultado desta interação é o bloqueio da tradução ou degradação do mRNA (Petersen et al. 2006; Krill et al. 2013). Além disso, o miRNA pode se ligar na região 5' do mRNA causando ativação ou repressão da tradução e pode também se ligar a região ORF do mensageiro que reprime a tradução do mRNA alvo (Schwarzenbach et al. 2014). Desta forma o miRNA têm efeito em diferentes processos celulares como

proliferação, diferenciação, migração e estão ainda relacionados com algumas doenças (Vigorito et al. 2013).

O primeiro miRNA descrito foi o lin-4 em 1993, a expressão dele foi vista em *C.elegans* codificando pequenos RNAs que não expressam proteína e que se ligavam na região 3'UTR do transcrito de lin-14 (Lee et al. 1993). Esta ligação levou ao bloqueio das seqüências do lin-14 e diminuição da expressão da proteína (Lee et al., 1993). No ano 2000 outro miRNA descrito foi let-7 também expresso em *C.elegans*, ele é importante no desenvolvimento do estágio larval para o estágio adulto, através da sua interação com transcritos o que leva a redução da expressão de proteínas que são importantes para controlar esses estágios, como lin 14, lin 41 e lin24, podendo correlacionar o let-7 com a mesma função do lin-4 (Reinhart et al., 2000). Logo em seguida no ano de 2001, os pequenos RNAs foram classificados devido à função regulatória da tradução que eles possuem e foram nomeados de miRNA (Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Lee & Ambros., 2001). Ainda neste ano, a via de biogênese do miRNA foi bem definida, mostrando a importância da DICER (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001).

A partir disso os estudos com miRNAs estão sempre avançando, o que leva melhor entendimento da sua ação, a descoberta de diferentes miRNAs que estão envolvidos em diversas aplicações como biomarcadores, correlação com doenças, principalmente câncer e também é utilizado como forma de tratamento (Calin et al., 2002; Takamizawa et al., 2004; He et al., 2005; Saito et al., 2006; Lytle et al., 2007; Shen et al., 2008; Kota et al., 2009; Eiring et al., 2010; Medina et al., 2010)

Com relação à biogênese do miRNA endógeno, que é transcrito pela RNA pol II e denominado pri-miRNA é inicialmente processado no núcleo pela enzima RNase III DROSHA e pelo co-fator DGCR8, originando o pre-miRNA. Este possui dupla fita e migra para o citoplasma, onde é processado por outra RNase III conhecida como DICER, que leva a formação do miRNA duplex, ele sofre alteração pela helicase resultando na formação de fitas simples de miRNA, sendo considerado um miRNA maduro. Este, interage com as proteínas argonautas que são incorporadas no complexo de indução de silenciamento por RNA (RISC) na qual se ligam por complementariedade a região 3' não traduzida do mRNA alvo. Esse mecanismo de complementariedade pode levar a degradação do mRNA quando anelamento for perfeito e suficiente, ou pode levar a inibição da tradução quando o anelamento não

for perfeito e suficiente o que gera a formação de alças causando a degradação do mRNA (Bartel 2004; Zuklys et al.,2012) (figura 2).

Figura 2. Biogênese e diferentes funções dos microRNAs. O miRNA é transcrito pela RNA pol II, originando o miRNA primário (Primary miRNA), ele é inicialmente processado no núcleo pela enzima RNase III DROSHA (Drosha complex), originando o miRNA precursor (Precursor miRNA). Este possui dupla fita e migra para o citoplasma, onde é processado por outra RNase III conhecida como DICER o que leva a formação do miRNA duplex. Uma fita madura do miRNA entra no complexo RISC que possui as proteínas argonautas, sendo considerado um miRNA maduro. No citoplasma o miRNA se liga à 3'UTR do mRNA alvo causando principalmente repressão da tradução e desestabilização do mRNA (mRNA destabilization for translation), alguns miRNAs se ligam a região ORF e atuam reprimindo a tradução (translation repression) ou a região 5' causando a repressão ou a ativação da tradução (translation repression/activation). Além disso, o miRNA pode migrar para o espaço extracelular dentro de exossomos, corpos apoptóticos e auxiliar na comunicação célula-célula (Cell-cell communication) ou ainda na ligação de RNA com proteínas como AGO e HDL. No núcleo se liga às regiões promotoras, regulando a expressão de genes (transcriptional activation/repression). Abreviaturas: 3'-UTR, Região 3 não traduzida (3 prime untranslated region); 5'-UTR, Região 5' não traduzida (5 prime untranslated region); AGO, Argonauta(Argonaute); HDL, Lipoproteínas de alta densidade (high-density lipoprotein); miRNAs, microRNAs; ORF, open reading frame; RISC, Complexo de silenciamento induzido de RNA (RNA-induced silencing complex); RNase III, ribonuclease III (Krol et al. 2010; Schwarzenbach et al. 2014).

Um dos miRNAs que estão envolvidos em diversos processos biológicos é o miR-155, ele foi inicialmente correlacionado com linfoma de linhagens de células B (Clurman & Hayward., 1989).

Um linfoma de célula B foi demonstrado inicialmente em aves e caracterizado pela proliferação anormal de linfoblastos que pode ser encontrado na Bursa de Frabícius, nódulos de tumor macroscópico na Bursa e metástase da Bursa para outros órgãos. Em todos esses estágios do linfoma, foi observado a ativação do locus c-myc, em combinação com locus bic (Tam et al., 1997)

Bic é um gene que não codifica proteína encontrado no núcleo, contém aproximadamente 138 nucleotídeos e possui uma estrutura de stem-loop. Portanto o Bic é um pri-miRNA que origina um pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos que sofre a maturação e gera o miR-155 (Tam W., 2001; Kluiver et al., 2005).

O miR-155 e o Bic foi relacionado com linfoma de Hodgkin, onde foi observado aumento da expressão deles em células e tecidos afetados (Van den Berg et al., 2003; Kluiver et al., 2005).

Esse miRNA é expresso em diferentes órgãos, sendo expresso em maior quantidade no baço e no timo (Mashima R., 2015), o que nos leva a pensar a importância dele na imunidade.

A função do miR-155 foi inicialmente caracterizada em células B, sendo observado alterações em diversos mecanismos correlacionados com essas células. Em camundongo deficientes de miR-155 foi observado a diminuição no centro germinativo e de produção de anticorpos (Rodriguez et al., 2007), aumento na ativação e proliferação dessas células (Thai et al., 2013), acumulação de células préB que causou defeito no desenvolvimento de células B e posteriormente linfoma agudo (Costinean et al., 2006).

No macrófago e nas células dendríticas o miR-155, aumenta a expressão de citocinas inflamatórias. Além disso, regula a função de apresentação de antígeno da célula dendrítica (Mashima R., 2015).

Nas células T, foi observado que sua ativação leva o aumento da expressão de miR-155. Em camundongos deficientes de miR-155, as células TCD4⁺ em cultura se diferenciam em células do tipo Th2, sobre estimulação in vitro essa célula produz maior quantidade de INF- γ do que IL-4. A quantidade de células T reg foi diminuída

na ausência do miR-155, o que demonstra que miR-155 é necessário para a sobrevivência desta célula (Lind & Ohashi., 2013).

Dessa forma, o miR-155 está envolvido em diversos mecanismos de ação da resposta imune celular.

Um dos mecanismos de ação da imunidade celular é atuar contra patógenos e as células principais envolvidas nesse mecanismo são as células TCD4⁺ que possuem perfil pró-inflamatório, elas se diferenciam principalmente em células T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17) e T regulatória (Treg) dependendo do estímulo que elas recebem (Zhou et al. 2009; DuPage & Bluestone 2016).

Estudos mostraram que o miR-155 está relacionado com a resposta eficiente contra diversos patógenos, através da diminuição de IFN γ que é produzido principalmente quando as células Th1 estão ativadas, como visto no caso de infecção de camundongos deficientes de miR-155 quando infectados com *Salmonella typhimurium* e *Helicobacter pylori* (Rodriguez et al., 2007; Oertli et al., 2011).

Além disso, o miR-155 está envolvido na indução de diferenciação de células TCD4⁺, como foi observado em camundongos sem expressão do miR-155, diminui a quantidade de células Th1, no modelo de encefalite experimental autoimune, resultando no melhor prognóstico da doença (Murugaiyan et al., 2011) e diminuição de células Th17 no modelo de hipersensibilidade (O'Connel et al., 2010).

O miR-155 também está envolvido em doenças inflamatórias como no caso da asma. Camundongos deficientes deste miRNA possuem um perfil de produção de citocinas de IL-4, maior do que a produção de IFN γ e IL12 (Rodriguez et al., 2007). Esse perfil é característica de células Th2 que pioram os sintomas da asma, portanto a ausência de miR-155 aumenta a diferenciação de células TCD4⁺ em células Th2, através da diminuição da expressão do fator de transcrição PU.1 que diminuía a diferenciação em células Th2 (Mashima R., 2015).

Em doenças autoimunes também há relação com o miR-155, como no caso da artrite reumatóide induzida por colágenos. Neste caso, camundongos que não expressam miR-155 não apresentam sintomas da doença, quando comparado com camundongos selvagens e isso aconteceu porque nesses camundongos há diminuição significativa de células Th17 e de IFN γ que é essencial para o

desenvolvimento da artrite (Kurowska-Stolarska et al., 2011). Outra doença autoimune também relacionada com o miR-155 é a dermatite atópica, ela é caracterizada principalmente pelo aumento de CTLA-4 que é produzida por células Treg e aumento do miR-155 (Auriemma et al., 2013; Sonkoly et al., 2010).

O mecanismo da resposta imune celular, além desses citados, é bem definido também contra tumores e vírus, nestas respostas as células principalmente envolvidas são as células T citotóxicas 8 (TCD8⁺) (Abbas et al. 2012).

A resposta imune contra tumores é comprometida em camundongos que não expressam miR-155 devido diminuir a quantidade de células TCD8⁺ (Lind & Ohashi 2014). Esta observação foi feita a partir de um estudo em que foi realizado a transferência adotiva de células Tcd8⁺ que não expressavam miR-155 e células T *wild-type* (WT), foram transplantados para o camundongo que sofreu o estímulo para desenvolver o câncer. O camundongo que recebeu a célula WT conseguiu responder contra o tumor, enquanto que o camundongo que recebeu a célula que não expressava miR-155 não conseguiu responder ao tumor o que causou crescimento da célula tumoral (Dudda et al. 2013).

Quanto a resposta imune contra vírus, estudos mostraram que camundongos que não expressam miR-155, quando infectados com vírus da coriomeningite linfocitária, influenza ou gammaherpes vírus 68, tinham proliferação reduzida de células TCD8⁺ (Dudda et al. 2013; Tsai et al. 2013; Lind & Ohashi 2014). Quando analisado a eliminação desses vírus, foi visto que a resposta contra baixas doses do vírus da coriomeningite linfocitária foi eficiente, porém foi observado diminuição da proliferação e sobrevivência dessas células (Gracias et al. 2013). Já para o vírus influenza e gammaherpes vírus, foi observado o aumento do título viral (Lind & Ohashi 2014).

Portanto, em células T efectoras, está bem definido a ação do miR-155 durante a diferenciação e as repostas dessas células.

Estudos demonstraram que em camundongos com deficiência de miRNA no timo apresentaram involução tímica prematura, diminuição no número de células T liberadas do timo, desregulação do desenvolvimento de timócito e autoimunidade (Olga et al., 2013; Khan et al., 2014). Em ambos os estudos foi causado o dano na via de processamento do miRNA, o que leva o defeito na expressão de todos os miRNAs dependente dessas vias. Porém na literatura ainda é carente os estudos

que demonstram um único miRNA expresso por timócitos que estão envolvidos no desenvolvimento dessas células.

A partir dessas evidências, nós elaboramos a hipótese apresentada abaixo sobre a possível participação do miR-155 em timócitos.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

O miR-155 atua no controle pós-transcricional de mRNAs que codificam proteínas envolvidas com o desenvolvimento de timócitos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

3.1.1) Avaliar o efeito do silenciamento do miR-155 sobre a expressão de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1) Silenciar o miR-155 utilizando a eletrotransfecção de siRNA anti-miR 155 *in vivo* no timo de camundongos Balb/c

3.2.2) Separar os timócitos por citometria de fluxo.

3.2.3) Extrair RNAs de timócitos controle e silenciados.

3.2.4) Avaliar o silenciamento do miR-155 por qRT-PCR

3.2.5) Avaliar o perfil de expressão de um conjunto grande de mRNAs sob o efeito do silenciamento do miR-155 *in vivo* no timo utilizando a tecnologia dos microarrays.

3.2.6) Utilizar bancos de dados públicos e ferramentas de bioinformática dedicados para avaliarmos as funções e/ou processos biológicos nos quais se enquadram os mRNAs modulados.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Linhagem de camundongos BALB/c

As fêmeas de camundongo BALB/c com 5-6 semanas de idade pesando aproximadamente 20 gramas foram adquiridas no Biotério Central do campus USP de Ribeirão Preto. Os camundongos foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos em mini-isoladores numa câmara ventilada Alesco com entrada de ar filtrado (filtro de 0,45 μ), em sala climatizada à temperatura constante de 22°C $\pm$ 2°C, ciclo de iluminação de 12 horas, água e ração *ad libitum*.

4.2 Processo de eletroporação no timo *in vivo*

O processo de eletroporação *in vivo* no timo conhecido também como eletrotransfecção, foi realizado com base no protocolo padronizado em nosso laboratório e publicado recentemente (Oliveira et al. 2013).

Fêmeas BALB/c com 5-6 semanas de idade foram anestesiadas por injeção intraperitoneal de solução de ketamina (100mg/kg de peso corporal) com xilazina (10mg/kg do peso corporal). Uma vez anestesiado o animal foi posicionado em decúbito ventral para que o processo de eletroporação fosse iniciado.

O eletrodo correspondente ao cátodo foi utilizado para estabelecer contato com a pele na pata oposta ao local da injeção. Em seguida uma agulha de 0,33mm de diâmetro foi acoplada a uma seringa de 1 ml foi conectada ao eletrodo do ânodo. A agulha foi então transpassada na pele do animal entre a primeira e a segunda costela, na região do tórax, em um ângulo de 45 graus a partir do eixo longitudinal, onde localiza-se o timo. Então, foi transfectado em um grupo de animais 5 μ l de tampão PBS 1X estéril contendo 5mM de anti-miR 155 em cada lóbulo do timo (grupo silenciado). No outro grupo, foi transfectado 5 μ l de tampão PBS 1X estéril contendo 5mM de anti-miR irrelevante (grupo controle) em cada lóbulo do timo.

Em seguida, aplicamos uma corrente elétrica de 5 pulsos de 300V (duração de 20ms de cada pulso, ou seja, 5 x 20 ms de 300V), utilizando um eletroporador (BTX SQUARE ELECTROPORATOR, HARVAD APPARATUS, USA) (Figura 3).

Os animais foram mortos em câmara de CO₂ para posterior remoção cirúrgica

do timo 24 horas após as eletrotranfecções. Este trabalho foi realizado dentro do projeto de eletroporação do timo do Laboratório de Imunogenética Molecular com aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (No. 117/2008).

Figura 3. Ilustração do processo de eletroporação no timo *in vivo* (Oliveira, 2013).

4.3 Fenotipagem dos timócitos

Os timos de ambos os grupos controle e silenciado foram removidos 24 horas após as eletroporações, logo em seguida eles foram macerados em placa de Petri contendo 3ml de meio RPMI 1640.

Os timócitos foram separados com auxílio de uma peneira de náilon com porosidade de 10 μ m (Sefar Inc. Depew, NY, USA). Posteriormente foram marcados com anticorpo anti-CD45-PerCP, anti-UEA e Ly-51 para separar os timócitos totais. Além disso, marcamos essas células com anti-CD4-APC, anti-CD8-Cy7, anti-CD3-FITC, anti-CD25-PerCP e anti-CD44-PE para separar os estágios dos timócitos DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺), DP (CD4⁺CD8⁺CD3^{low}) e SP (CD4⁺CD8⁻CD3^{hi} ou CD4⁺CD8⁺CD3^{hi}).

Os timócitos foram analisados utilizando o citômetro de Fluxo *FACS Calibur* (BD Biosystems).

Essas células foram então utilizadas para a extração de RNA total.

4.4 Extração de RNA total e análise da sua integridade

Para a extração de RNA total, utilizamos o kit *mirVana PARIS® kit* (Ambion, Austin, TX, USA). O protocolo básico preconiza para partirmos de aproximadamente 1×10^7 células em suspensão para obtermos um rendimento na faixa de microgramas de RNA total.

O RNA total foi suspenso em água MilliQ estéril tratada com DEPC (Sigma-Aldrich) e armazenado no freezer a -80°C . A quantificação do RNA foi feita utilizando o aparelho Nanodrop ND-1000 (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA). Foram utilizadas apenas preparações livres de fenol ($A_{260}/A_{230} \sim = 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{230} \sim = 1,8 - 2,0$).

As preparações de RNA foram analisadas em um aparelho Bioanalisador Agilent modelo 2100 utilizando o RNA nano chips 6000 (Agilent). Este sistema calcula o índice de integridade com escala de 0 a 10 baseado na qualidade das preparações de RNA. Só utilizamos aquelas amostras com índice RIN ≥ 8.5 . Essas amostras de RNA serviram para os experimentos seguintes de qRT-PCR e microarray.

4.5 Reação de transcrição reversa do miR-155

A expressão do miR-155 nos timócitos foi avaliada utilizando o método qRT-PCR com sonda TaqMan (Applied Biosystems). Primeiramente o RNA total foi retrotranscrito para cDNA. Para isso preparamos um master mix para 26 reações, nele continha: 3,9 μL de dNTPs, 26 μL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 39 μL de Buffer Reverse Transcriptase 10X, 4,94 μL de RNase inhibitor e 108,6 μL de água. Para cada reação de cDNA continha 7 μL de master mix, 5 μL de RNA total 10 ng e 3 μL do primer específico de miR-155 ou do snoRNA 202 que foi utilizado como controle.

Os tubos com as reações foram colocados no termociclador *GeneAmp PCR System* 9700 onde as condições para a transcrição reversa utilizadas foram de 16°C por 10 minutos (desnaturação), 37°C por 120 minutos (anelamento *primers*), 85°C por 5 minutos (extensão).

A sequência madura do miR-155 é UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU, ela foi recuperada do banco de dados *mirbase* (<http://www.mirbase.org/>). O mima de

acesso do miR-155 utilizado foi MIMAT0000165. Como controle, utilizamos o snoRNA 202 que tem como número de acesso: AF357327 e sua sequência é GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGAACCCTTTTCCATCTGATG.

4.6 Reação de polimerização em cadeia quantitativa e em tempo real (qRT-PCR) para detecção do miR-155

Para a detecção da expressão do miR-155 foi realizada a reação de qRT-PCR utilizando a sonda específica para esse miRNA. Para isso utilizamos o aparelho *Step-One Real-time PCR* para placa de 48 poços (*Applied Biosystems*). Primeiramente, preparamos o mix para 22 reações, nele continha 22 µL da sonda do miR-155, 220 µL *TaqMan Universal PCR Master Mix* UNG e 168,74 µL de água. Em cada poço da placa de Real-Time PCR foi adicionada 1,33 µL de cDNA e 18,67 µL do mix. A placa foi centrifugada a 1000 rpm durante 2 minutos e foi levada para o aparelho que estava nas condições de 50°C por 2 minutos (Ativação de UNG), 95°C por 10 minutos (ativação da enzima) e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 60 segundos (anelamento e extensão).

4.7 Reação de polimerização em cadeia quantitativa e em tempo real (qRT-PCR) para detecção de mRNA Adam 8 (validação dos dados de microarray).

Primeiramente a reação de cDNA foi realizada com amostras de RNA total provenientes de timos das condições controle e silenciada. Para isso, preparamos um mix para 5 reações que continha 10 µL do Buffer RT10X, 4 µL de Mix dNTP 25X, 10 µL do primer específico para o miR-155, 5 µL de RNase *inhibitor*, 5 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase* e 16 µL de água. Em cada tubo onde ocorreu a reação de cDNA foi adicionado 10 µL do mix e 10 µL do RNA que estava a 10 ng de cada condição.

Cada tubo foi levado para o termociclador Gene Amp PCR System 9700 que estavam nas condições de 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos.

Para a reação de qRT-PCR utilizamos o aparelho *Step-One Real-time PCR* para placa de 48 poços (*Applied Biosystems*), preparamos o Mix para o gene

endógeno, o GAPDH e para o gene de interesse, o Adam 8. Nele continha Master Mix 70 μ L, Sonda do GAPDH ou do Adam 8 7 μ L e água 49 μ L.

A sonda do gene de validação Adam 8 (NM 001291066.2) foi pedido pelo site (<http://www.thermofisher.com>).

4.8 Análise estatística dos resultados de qRT-PCR

A quantificação relativa de expressão foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001) comparando a expressão de um RNA constitutivo com o RNA de interesse.

Para análise estatística foram utilizados os testes t student e não-pareado ANOVA por meio do software estatístico *GraphPad Prism*.

4.9 Hibridizações com oligo microarrays

4.9.1 mRNA microarray

Neste trabalho foram utilizados os *microarrays* de mRNAs *Agilent* 8 x 60k que são preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão e síntese de oligos na superfície de lâminas de vidro), no qual aproximadamente 60.000 oligos são fixados e dispostos uniformemente em lâminas de vidro da dimensão de lâminas de microscópio. Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, com extrema precisão utilizando arquivos de sequências de RNAs mensageiros (mRNAs) a partir de bancos de dados.

Para essa tecnologia do microarray foi utilizada a plataforma de *oligo-microarrays* da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Primeiramente diluímos a amostra de RNA total para deixar em uma concentração de 100ng as quais foram utilizadas como *input*. Em seguida, foram preparadas as diluições seriadas dos reagentes do kit *Agilent one-color Spike-mix*, sendo a primeira diluição de 1:20 (2 μ L do spike-mix + 38 μ L do *Dilution Buffer*), a segunda diluição de 1:25 e a terceira diluição de 1:10. Foram adicionados 2 μ L da terceira diluição a 200ng de RNA total.

Posteriormente foi preparada a reação de marcação das amostras, para cada reação foi adicionado 2 μ L de Spike, 1,5 μ L de RNA total a 200ng e 1,8 μ L de T7 *Promoter Primer*, incubar à 65°C por 10 minutos, para desnaturar o primer e o RNA.

Após esse período de incubação as amostras foram colocadas imediatamente no gelo.

Em seguida, preparamos o cDNA *Master Mix*, para isso nós utilizamos por amostra 2µl de 5X *First Strand Buffer* (aquecido a 80°C por 3 a 4 minutos), 1µl de DTT a 0,1M, 0,5µl de dNTP mix a 10mM e 1,2µl *AffinityScript RNase Block Mix*. Adicionar 4,7µl do cDNA *Master Mix* em cada amostra e homogeneizar. As amostras foram incubadas a 40°C por 2 horas.

Após esse tempo, as amostras foram colocadas em banho a 70°C por 15 minutos e depois no gelo por 5 minutos para inativação das enzimas.

Para finalizar a marcação foi preparado o *Transcription Master Mix*. Para cada reação foi adicionado 0,75µl de água livre de nuclease, 3,2µl de 5X *Transcription Buffer*, 0,6µl de DTT a 0,1M, 1µl de NTP mix, 0,21µl de T7 RNA *Polymerase Blend*, 0,24µl de *Cyanine 3-CTP*. Em cada amostra foi adicionado 16µl de *Transcription Master Mix* e posteriormente as amostras foram incubadas a 40°C por 2 horas.

O passo seguinte da marcação foi purificar o RNA amplificado e marcado utilizando o kit *IllustraMini RNA isolation* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Primeiramente adicionamos na coluna mini spin 3,5 vezes do volume da amostra de tampão RA. Em seguida, adicionamos 3,5 vezes do volume da amostra de etanol absoluto em cada amostra presente nas respectivas colunas.

As amostras nas colunas foram levadas para centrifugar a 8000g/30s, em seguida, o líquido foi descartado e a coluna foi lavada com 600µl do reagente RA3, por fim centrifugamos a 11.000 x g por 2 minuto. Em seguida trocamos o tubo coletor e foi adicionado 40µl de água mili-Q DEPC/normal, aguardamos durante 1 minuto e centrifugamos a 11.000 x g durante 1 minuto.

Posteriormente quantificamos o RNA utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-VIS espectrofotômetro (*NanoDrop Technologies*). Além disso, detectamos a incorporação de fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras expressando concentração em pmol/µl. A incorporação de Cy3 foi dada a partir do valor de incorporação dividido pela massa total do RNA. Somente as amostras com o valor maior do que 9 foram utilizadas para o passo seguinte de hibridização.

Anteriormente ao passo da hibridização foi preparado o 10X *Blocking Agent* adicionando 500µl de água livre de nuclease no tubo que contém o 10X *Blocking Agent* liofilizado e homogeneizamos. Em seguida as amostras passaram pelo

processo de fragmentação utilizando o *fragmentation mix* para o microarray 8X60K, para isso adicionamos 600ng de RNA marcado com Cy3, 5µl de 10X *Blocking Agent*, 24µl de água livre de nuclease e 1µl de 25X *Fragmentation Buffer*. Posteriormente as amostras foram incubadas a 60°C durante 30 minutos e em seguida colocamos imediatamente no gelo por 1 minuto.

Após a incubação para hibridização nós adicionamos 25µl do reagente 2x GEx *Hybridization Buffer* HI-RPM em cada amostra e centrifugamos por 1 minuto a 13000 rpm. Aplicamos 100µl em cada região do gasket da lâmina de microarray que foi colocada no slide Surehyb de forma alinhada com a lâmina. A lâmina e seu suporte para que ocorresse a hibridização foram colocadas no forno de a 65°C em agitação durante 17 horas.

Após a hibridização as lâminas foram lavadas no tampão 1 (*GE wash Buffer* 0,005% Triton X-102) por 1 minuto à temperatura ambiente e utilizamos o tampão 2 (*GE wash Buffer* 2 - 0,005% Triton X-102) à 37°C. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos a temperatura ambiente e por último na solução *Stabilization e Drying* por 30 segundos à temperatura ambiente.

Após a lavagem finalmente as lâminas foram lidas no *scanner* de microarrays. O programa *Features Extraction v.10.7* (Agilent) já instalado no computador do *scanner* possibilitará a extração dos dados brutos da hibridização (já transformados em valores numéricos quantitativos) que seguiram para normalização e análise bioinformática. Os dados brutos das hibridizações foram depositados no banco de dados de microarrays MIAME *Array Express* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>).

4.9.2 Análise de dados de microarrays

Com o programa *Feature Extracion* obtivemos os valores numéricos quantitativos das hibridizações com os microarrays. Além disso, este programa realiza o posicionamento automático das *grids* por reconhecimento das regiões marginais, além de exibir os parâmetros de controle de qualidade das hibridizações. A partir das tabelas de dados quantificados, foi calculado a mediana dos dados brutos e a mediana do background para seguir com as análises propriamente ditas.

Os dados brutos exibidos pelo programa *Feature Extracion* foram analisados no ambiente R (versão 2.13.1 - R *Development Core Time*, 2011). A linguagem de programação R ("*The R Project for Statistical Computing*") consiste em um ambiente

estatístico-matemático com inúmeros pacotes de funções múltiplas, amplamente utilizados em análises de dados de microarrays. Dentre os diferentes métodos para normalização, foi escolhida a metodologia *quantile* a qual é considerada mais robusta e corrige diferenças de densidade entre todas as amostras (Bolstad et al. 2003). Um gráfico tipo *boxplot* foi construído para visualização do efeito das normalizações.

Os dados normalizados foram submetidos ao agrupamento hierárquico que consiste num procedimento aglomerativo, onde os perfis de expressão semelhantes e, conseqüentemente, as respectivas amostras são agrupados (assinaturas de expressão). A distância métrica adotada foi a de Pearson não-centrada e o método de agrupamento foi *averagelinkage*.

Para análise dos mRNAs diferencialmente expressos utilizamos as funções do pacote *limma* (Smyth 2004), o qual aplica um modelo linear na análise estatística *gene-wise*. O método de Benjamini-Hochberg também foi aplicado com o objetivo de remover genes falso positivo e formar por fim grupos de genes que possuem a expressão parecidas (Benjamini & Hochberg 1995). Além disso, a expressão desses genes foram avaliados segundo *foldchange* cuja função é identificar genes com diferenças de expressão entre duas condições, considerando um dado ponto de corte (*cut-off*) ou limiar. Portanto, os genes considerados diferencialmente expressos neste trabalho possuem $p < 0,05$ com correção FDR (Benjamini-Hochberg) utilizando o fold change ≥ 1.5 .

A etapa subsequente foi a construção do heatmap que avalia o padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos.

4.10 Enriquecimento funcional dos mRNAs diferencialmente expressos

Para avaliarmos quais processos biológicos os mRNAs diferencialmente expressos estão envolvidos, nós submetemos essa lista de genes no *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>) que analisou utilizando a ferramenta PANTHER (<http://pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>). O processo biológico só foi considerado quando apresentou $p < 0,05$.

Outro tipo de enriquecimento funcional realizado nesse trabalho, foi para avaliar as funções dos mRNAs diferencialmente expressos no desenvolvimento de timócitos, através da busca na literatura utilizando o banco de dados *NCBI gene*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e também avaliar o estágio de desenvolvimento dos timócitos que esses mRNAs eram mais expressos através do banco de dados *Immunological Genome Project Database* (Immgen) (<http://www.immgen.org/databrowser/index.html>).

4.11 Determinação da interação entre o miR-155 e mRNAs, através da energia livre mínima de hibridização (mfe)

Nós utilizamos o algoritmo RNA-Hybrid (https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission) (Rehmsmeier et al. 2004), para analisarmos se o miR-155 interage diretamente com os mRNAs alvo que foram diferencialmente expressos envolvidos com o desenvolvimento dos timócitos. Este método envolve um algoritmo de programação dinâmico que calcula a hibridização mais favorável entre um dado miRNA e seu mRNA alvo, calculando a energia livre mínima baseado no estado termodinâmico o qual postula que um duplex de RNA é mais estável e mais forte termodinamicamente quando a energia livre é baixa, sendo considerada um *cut-off* de $mfe \leq 20$ (Lewis et al. 2005).

5. FLUXOGRAMA DO TRABALHO

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da expressão do miR-155

Para verificarmos a eficiência da eletroporação do anti-miR-155 e se a expressão do miR-155 foi alterada nos timócitos, nós removemos os timos após 24 horas de eletroporação do grupo controle e do silenciado. Posteriormente separamos os timócitos por citometria de fluxo e extraímos o RNA que teve sua integridade avaliada (Figura 4).

Figura 4. Eletroforese microfluídica das amostras de RNA total isoladas de timócitos. A figura mostra as frações de rRNA 28 S, rRNA 18 S das amostras e do ladder; 1) RNA timócitos transfectados com anti-miR controle negativo (RIN = 10); 2) RNA timócitos transfectados com anti-miR-155 (RIN = 9.7).

A expressão do miR-155 foi avaliada por qRT-PCR onde podemos observar que o anti-miR-155 foi capaz de diminuir a expressão do miR-155 em timócitos atingindo cerca de 53% de inibição (Figura 5). Esta amostra de RNA foi também utilizada nos experimentos de microarrays, como descritos abaixo.

Figura 5. Avaliação dos níveis transcricionais de miR-155 em timócitos separados do timo após 24 horas de eletrotransfecção com anti-miR-155. A expressão de miR-155 foi reduzida em cerca de 53% em relação ao controle (Student's teste, $p < 0,05$).

6.2 Efeito do silenciamento de miR-155 na regulação pós-transcricional em timócitos

Para avaliarmos se o silenciamento do miR-155 afeta a expressão de mRNAs expressos em timócitos, foi realizado o ensaio de *microarray* seguida da análise de expressão de mRNAs através da plataforma *Agilent* (60.000 oligos). Os dados foram processados usando funções de estatística *R* disponíveis no *Bioconductor Latin America* (<http://bioconductor.fmrp.usp.br/>).

O dendrograma ou agrupamento hierárquico foi gerado a partir da análise dos dados que agrupou os mRNAs que são expressos de maneira global de acordo com a expressão gênica. Neste gráfico podemos observar a distinção da expressão de mRNA do grupo controle e silenciado (Figura 6).

Figura 6. Agrupamento hierárquico gerado a partir dos dados de expressão de mRNAs de maneira global. Pôde-se observar dois agrupamentos entre os mRNAs do grupo controle e o grupo silenciado.

Posteriormente foi realizado a análise estatística utilizando o pacote *limma*, a correção de Benjamini-Hochberg (FDR) sendo o *cutof* $p < 0,05$ e o *fold change* ≥ 1.5 . A partir dessa análise, foram obtidos 2.954 mRNAs diferencialmente expressos sob o silenciamento do miR-155.

Esses mRNAs diferencialmente expressos foram utilizados na construção do gráfico *Heatmap* que representa o perfil da expressão dos mRNAs que foram induzidos (vermelho), reprimidos (verde) ou não modulados (preto) (Figura 7).

Figura 7. Heatmap que compara o perfil de expressão de mRNAs em timócitos do grupo controle e o silenciado. 2.954 mRNAs foram diferencialmente expressos de timócitos sob o silenciamento do miR-155. Essa análise foi realizada utilizando *Fold Change* $\geq 1,5$ e o cutoff $p < 0,05$. O perfil de expressão é indicado pelas cores sendo o vermelho indução, o verde repressão e o preto não modulação.

6.3 Análise do enriquecimento funcional

Para identificação dos processos biológicos nos quais os mRNAs diferencialmente expressos (tanto reprimidos quanto induzidos) estão envolvidos, utilizamos o programa PANTHER (<http://pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>).

A partir dessa análise, podemos verificar que os processos biológicos que esses mRNAs estão envolvidos são: processo celular (25,6%) e metabólico (20,7%), regulação biológica (9,2%), resposta para estímulo (10,9%), localização (6,2%), processo do desenvolvimento (6%), processo do sistema imune (5,5%), processo de organismo multicelular (7,1%), organização do componente celular ou biogênese

(5%), adesão biológica (1,6%), reprodução (1,2%), crescimento (0%), locomoção (0,8%) e morte celular (0%) (figura 8).

Figura 8. Representação dos processos biológicos nos quais os mRNAs diferencialmente expressos estão envolvidos (percentual).

Dentre os processos biológicos que esses mRNAs estão envolvidos destacamos o sistema imune. Em seguida identificamos quais os processos específicos do sistema imune esses mRNAs estão envolvidos, sendo os principais, resposta imune (75%), ativação de macrófago (19%) e processamento e apresentação de antígeno (6%) (Figura 9A).

Dentro do processo de resposta imune observamos que esses mRNAs estão envolvidos principalmente com imunidade mediada por célula B (38,9%), ativação de células Natural Killer (17,8%), ativação do sistema complemento (24,4%) e resposta ao Inteferon-gamma (18,9%) (Figura 9B).

Figura 9. Gráfico ilustrativo dos mRNAs diferencialmente expressos que estão envolvidos no processo do sistema imune e da resposta imune. A) Processos do sistema imune B) Processos da resposta imune (percentual).

6.4 Identificação de mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos

Para identificarmos quais mRNAs diferencialmente expressos estavam envolvidos no desenvolvimento de timócitos, realizamos uma busca na literatura. Dentre os mRNAs já descritos envolvidos nesse processo identificamos que 16 deles foram modulados (11 induzidos e 5 reprimidos) sob o silenciamento do miR-155.

Os mRNAs que foram induzidos sob o silenciamento do miR-155 estão envolvidos em diferentes processos de desenvolvimento dos timócitos. Podemos observar que esses processos foram principalmente indução da proliferação, sobrevivência dos timócitos e diminuição da divisão celular (Il1b, Jak3 e Ccng2), alteração na seleção positiva e negativa (Themis e Adam8), aumento de células duplo negativa e expressão dos marcadores de células duplo positivas (Cdk2a, Cd4

e Cd97), indução da sinapse imunológica (Cd6) e comprometimento da diferenciação das células TCD4+ para o subtipo Th17 (Irf4) (Tabela 1).

Tabela 1 mRNAs induzidos e suas respectivas funções no desenvolvimento de timócitos

Símbolos dos mRNAs	Função
Hnf1a	Seleção negativa
Themis	Seleção positiva
Cdk2a	Aumento de células Duplo Negativa
Il1b	Proliferação de timócitos
Jak3	Sobrevivência de timócitos
Adam8	Seleção negativa
Cd4	Marcador de células Duplo Positivas
Cd97	Marcador de células Duplo Positivas
Irf4	Comprometimento do subtipo Th17
CCng2	Diminui a divisão celular
Cd6	Sinapse imunológica

Já os mRNAs reprimidos sob o silenciamento do miR-155 estão envolvidos no rearranjo do receptor da célula T (TCR) (Ppp1r1c), seleção negativa (Xcl1), via dependente de Cálcio (Camk2a) e apoptose de timócitos (Bak1 e Ptcra) (Tabela 2).

Tabela 2 mRNAs reprimidos e suas respectivas funções no desenvolvimento de timócitos

Símbolos dos mRNAs	Função
Ppp1r1c	Rearranjo do TCR
Xcl1	Seleção negativa
Camk2a	Via dependente de Cálcio
Bak1	Apoptose de timócitos
Ptcra	Apoptose de timócitos

Posteriormente avaliamos a expressão desses mRNAs induzidos (figura 7A) e dos genes reprimidos (figura 7B) nos subtipos celulares que estão envolvidos na fase de desenvolvimento de timócitos utilizando o banco de dados *Immunological Genome Project Database (Immgen)*. (Figura 10).

A) mRNAs induzidos

A) Continuação mRNAs induzidos

A) Continuação mRNAs induzidos

B) mRNAs reprimidos

B) Continuação mRNAs reprimidos

Figura 10. Estágios de desenvolvimento dos timócitos que os mRNAs envolvidos nesse processo são mais expressos. A) mRNAs que sob o silenciamento de miR-155 tiveram a expressão induzida. B) mRNAs que sob o silenciamento de miR-155 tiveram a expressão reprimida. Os estágios de desenvolvimento representados nos eixos y dos gráficos são: NKT_44+NK1_1+_Th (Precursor NKT CD44+ NK1.1+ timo invariante), NKT_44+NK1_1-_Th (Precursor NKT CD44+ NK1.1- timo invariante), NKT_44-NK1_1-_Th (Precursor NKT CD44- NK1.1- timo invariante), T_8SP24-_Th (simples positiva Cd8+, madura), T_8SP24int_Th (simples positiva Cd8+, semimadura), T_8SP69+_Th (simples positiva Cd8+, intermediária), T_4int8+_Th (Seleção positiva, intermediária), T_4SP24-_Th (Simples positiva Cd4+, madura), T_4SP24int_Th (Simples positiva Cd4+, semimadura), T_4SP69+_Th (Simples positiva Cd4+, intermediária), T_4+8int (Seleção positiva, intermediário), T_DP69+_Th (Duplo positivo, início da seleção positiva), T_DPsm_Th (Duplo positivo, pequeno repouso), T_DPbl_Th (Duplo positivo, pequeno repouso), T_DP_Th (Todas as células duplo positivas), T_ISP_Th (Simples positiva imadura), T_DN4_Th (Duplo negativo 4), preT_DN3-4_Th (Transição DN3 para DN4), preT_DN3B_Th (Duplo negativo 3b), preT_DN3A_Th (Duplo negativo 3a), preT_DN2-3_Th (Transição DN2 para DN3), preT_DN2B_Th (Duplo negativo 2b), preT_DN2A_Th (Duplo negativo 2a), preT_DN2_Th (Duplo negativo 2), preT_ETP-2A_Th (Transição de precursor de células T para DN2a), preT_ETP_Th (Precursor de células T), Tgd_vg3+24alo_e17_Th (Timo fetal, precursor DEC, DN maduro), Tgd_vg2+24alo_Th (Vg2+ tímico maduro), Tgd_vg1+vd6+24alo_Th (Vg1.1+ vd6.3+ tímico maduro), Tgd_vg1+vd6-24alo_Th (Vg1.1+ vd6.3- tímico maduro), Tgd_vg5+24ahi_Th (Vg5+ tímico imaturo), Tgd_vg3+24ahi_e17_Th (Timo fetal, precursor de DEC, DN imaturo), Tgd_vg2+24ahi_e17_Th (Vg2+ tímico fetal, DN imaturo), Tgd_vg2+24ahi_Th (Vg2+ tímico imaturo), Tgd_vg1+vd6+24ahi_Th (Vg1.1+ vd6.3+ tímico imaturo), Tgd_vg1+vd6-24ahi_Th (Vg1.1+ vd6.3- tímico imaturo), Tgd_Th (TCR gama-delta tímico, todos DN). O eixo X representa o nível de expressão de cada gene.

Em relação a expressão dos mRNAs vimos que o mRNA referente ao gene *Camk2a* é mais expresso nas células Pré-T, o *Hnf1a* é mais expresso nos timócitos pré-T no momento da diferenciação de DN2 para DN3, *Ptcr* é mais expresso nos timócitos DN3, enquanto que o *Themis* é mais expressos nos timócitos DP da mesma forma que o gene *Cdkn2a*, *Cd4*, *Ccng2* e *Cd6*, os genes *Il1b*, *Jak3*, *Adam8*, *Ppp1r1c* e *Xcl1* são mais expressos nos timócitos T $\gamma\delta$, *Cd97* é expresso em células NKT, O *Irf4* são mais expressos no estágio SP $Cd4^{+}24^{int}$ e o gene *Bak1* é expresso nos timócitos $Cd4^{+}8^{int}$.

Dessa forma, podemos observar que os mRNAs que foram modulados e estão envolvidos com o desenvolvimento de timócitos são expressos em praticamente todos os estágios de desenvolvimento dessas células. O que demonstra que a diminuição do miR-155 afeta de maneira geral os mRNAs que estão envolvidos nesse processo.

6.5 Enriquecimento funcional dos mRNAs mais modulados sob o silenciamento do miR-155

Para identificarmos os processos biológicos mais afetados sob o silenciamento do miR-155, realizamos o enriquecimento funcional dos 200 mRNAs que tiveram sua expressão mais reprimida e dos 200 mRNAs que tiveram sua expressão mais induzida.

A partir dessa análise podemos observar que os mRNAs mais modulados estão presentes em diferentes processos. Esses processos envolvem adesão biológica (2%), componente celular de organização ou biogênese (3,3%), processo celular (25,1%), processos de desenvolvimento (3,9%), localização (7,6%), processo metabólico (20,6%), reprodução (0,9%), regulação biológica (8,4%), processos do sistema imune (8,6%), locomoção (2,4%), processos de organismo multicelular (5,2%) e resposta a estímulos (11,9%) (Figura 11).

Figura 11. Representação dos processos biológicos que os 200 mRNAs mais induzidos e os 200 mRNAs mais reprimidos estão envolvidos (percentual).

Em seguida avaliamos quais os mRNAs que foram expressos em cada processo biológico e seus respectivos valores de expressão, considerando que os valores negativos os genes tiveram sua expressão reprimida e os valores positivos, os genes tiveram sua expressão induzida (Tabelas 3 a 14).

Tabela 3: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de localização e seus valores de expressão

Localização	
Slc1a6	-0.617917953715982
Myo1h	-0.607910554871923
Bpifa3	-0.620462667188897
Nrbp2	-0.623667996245736
Stx2	-0.600194144171304
Slc22a6	-0.616081810247072
Xcl1	-0.616336090229847
Dscr3	-0.611561593199312
Cxcl16	-0.600263342770185
Slc23a2	-0.59867903664013
Rhobtb3	-0.624734904893113
Vps35	-0.625077953930147
Arl6	-0.616507568550901
Pmpcb	-0.622688691665164
Chmp2b	-0.59629927511758
Spag5	-0.618655791838904
Ccl4	1.90838233015423
Saa3	1.59346148134864
Tnfaip2	1.6161385856841
Fcer1g	1.57907527966262
Hck	1.68288581399966
Clec4n	1.56728696081299
Pf4	2.37542116519112
Clec4d	2.89140327021766
Acta1	1.44319027174692
Clec4e	2.33930416371204
Lcn2	3.31238041604557
Hba-a1	4.8342287537331
Cxcl2	2.02928501394688
Ppbp	1.43905776011052
Serinc2	2.02099415652851
Ccl9	1.70731968542493
Myh4	1.57708433688674
Cd300lf	2.05121945416388
Ccl8	1.37144591380344
Ccl6	2.47216810855147
Hbb-b2	4.52849904145845
Hbb-b1	2.69580555215474
ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Ccl3	1.81022414358659

Tabela 4: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de locomoção e seus valores de expressão

Locomoção	
Xcl1	-0.616336090229847
Cxcl16	-0.600263342770185
Ccl4	1.90838233015423
Saa3	1.59346148134864
Fcer1g	1.57907527966262
Hck	1.68288581399966
Pf4	2.37542116519112
Cxcl2	2.02928501394688
Ppbp	1.43905776011052
Ccl9	1.70731968542493
Ccl8	1.37144591380344
Ccl6	2.47216810855147
Ccl3	1.81022414358659

Tabela 3: mRNAs que estão envolvidos com o processo biológico de adesão celular e seus valores de expressão

Adesão celular	
Pkp3	-0.612668770360093
Colec12	-0.626305203479484
Icam5	-0.608865921827798
Itgb3	-0.603040592802772
Tgfb1	2.16869334581326
Arg1	1.95819888261523
Clec4n	1.56728696081299
Clec4d	2.89140327021766
Clec4e	2.33930416371204
Tlr2	1.36285335677529
Stab1	1.51208001388896

Tabela 5: mRNAs que estão envolvidos no processo de regulação biológica e seus valores de expressão

Regulação biológica	
Chrb1	-0.602145182425023
Pja2	-0.592812849928279
Olfr1341	-0.608730854474876
Stx2	-0.600194144171304
Pdk1	-0.60499736908071
Xcl1	-0.616336090229847
Stat4	-0.62098586941284
Fkbp2	-0.611433432598004
Cxcl16	-0.600263342770185
Ube2c	-0.626642713508595
Serpina1c	-0.62115043448232
Csk	-0.610294013155883
Chga	-0.60544866089109
Txn1	-0.60677973423711
Olfr1316	-0.611558766609415
Spag5	-0.618655791838904
Fxyd6	-0.626927991762374
Ccl4	1.90838233015423
Olfr433	1.57935489081925
Fcer1g	1.57907527966262
Hck	1.68288581399966
Adora3	1.47779690302803
Olfr1342	1.52363072412567
Pf4	2.37542116519112
Tas2r124	1.74685828995007
Drd1a	1.38330133038076
Olfr1183	1.69626249346313
Olfr490	1.4400024143225
Ptafr	1.5435041877591
Ltb4r1	2.40260665990365
Hk3	1.77369897600083
G0s2	1.71898454970266
Cxcl2	2.02928501394688
Pbbp	1.43905776011052
Ccl9	1.70731968542493
Ier3	1.79575916572456
Ccl8	1.37144591380344
Ccl6	2.47216810855147
Il1b	2.32004758877326
Olfr1340	1.43652952064384
Blnk	1.55984009444834
ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Ccl3	1.81022414358659
Olfr1089	1.52249275012036

Tabela 4: mRNAs que estão envolvidos no processo de componente celular e biogênese, e seus valores de expressão

Componente celular e Biogênese	
Figl1	-0.628736520752737
Colec12	-0.626305203479484
Stx2	-0.600194144171304
Mtfr1	-0.624389992117532
Hyou1	-0.600231594455399
Cxcl16	-0.600263342770185
Ube2c	-0.626642713508595
Csk	-0.610294013155883
Topbp1	-0.618585764432433
Krt9	-0.616961612982965
Spag5	-0.618655791838904
Tgfb1	2.16869334581326
Fcer1g	1.57907527966262
Acta1	1.44319027174692
Plek	1.36343784500921
Myh4	1.57708433688674
ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Krt74	1.47121504318378

Tabela 6: mRNAs que estão envolvidos no processo de desenvolvimento celular e seus valores de expressão

Processo de desenvolvimento	
Tnf	1.9393645138103
Fcer1g	1.57907527966262
Hck	1.68288581399966
Cd33	1.55701732713641
Cebpd	1.74793227619287
G0s2	1.71898454970266
Myh4	1.57708433688674
Pbx4	1.64233740369041
Ier3	1.79575916572456
Cebpe	2.17028418066933
Adam8	2.26609630328867
Obox1	1.79723899241991
B3gnt2	-0.620194768988158
Colec12	-0.626305203479484
Ube2d1	-0.591884229610563
Myo1h	-0.607910554871923
Lbx1	-0.623450956047048
Stat4	-0.62098586941284
Otud1	-0.604138193228323
Notum	-0.605469036470481
Csk	-0.610294013155883

Tabela 7: mRNAs que estão envolvidos no processo celular e seus valores de expressão

Processo celular			
Cam1	-0.604437388622543	Zfp239	-0.61936400768319
Cetn1	-0.61554110543915	Txn1	-0.60677973423711
Rgmb	-0.598606565028234	Ftsj1	-0.593591204729123
Slc1a6	-0.617917953715982	Icam5	-0.608865921827798
Figl1	-0.628736520752737	Rap1gap	-0.604841231524086
Pkp3	-0.612668770360093	Itgb3	-0.603040592802772
Skor1	-0.599011083890684	Zfp772	-0.59044156344013
B3gnt2	-0.620194768988158	Olfr1316	-0.611558766609415
Colec12	-0.626305203479484	Kif20a	-0.59124767761357
Zfp235	-0.603663587364906	Krt9	-0.616961612982965
Chrn1	-0.602145182425023	Arl6	-0.616507568550901
Tk1	-0.602301504114642	Pmpcb	-0.622688691665164
Nedd4l	-0.626395064773765	Snrpa	-0.601989989258083
Myo1h	-0.607910554871923	Nuf2	-0.626466402135588
Ttc34	-0.602027383609533	Gm711	-0.593563636270605
Zfp202	-0.593677228603713	Spag5	-0.618655791838904
Pja2	-0.592812849928279	Fxyd6	-0.626927991762374
Tceal7	-0.595422426719631	Klre1	-0.607110980761478
Olfr1341	-0.608730854474876	Ccl4	1.90838233015423
Mlh3	-0.607650982570083	Clec7a	1.94561461151648
Stx2	-0.600194144171304	Gm5150	1.51858493884898
Pdk1	-0.60499736908071	Tnf	1.9393645138103
Git1	-0.614008272553855	Olfr433	1.57935489081925
Mtfr1	-0.624389992117532	Il1r2	2.00586498275374
Slc22a6	-0.616081810247072	Gm14548	1.94042186358144
Rcn2	-0.610072478852208	C3	1.46464556095234
Xcl1	-0.616336090229847	Saa3	1.59346148134864
Plch2	-0.62204334702253	Gp49a	1.65776492186288
Faf1	-0.590725810882018	Tgfb1	2.16869334581326
Stat4	-0.62098586941284	Tnfaip2	1.6161385856841
Cks1b	-0.629762331167177	Fcer1g	1.57907527966262
Otud1	-0.604138193228323	Cds1	1.72739663742104
Camk2a	-0.619633228713915	Lilrb4	1.71310994505467
Dscr3	-0.611561593199312	Arg1	1.95819888261523
Fkbp2	-0.611433432598004	Tsga10	1.48392345121424
Adss	-0.608413618320808	Hck	1.68288581399966
Papss1	-0.622402113279398	Olfr1342	1.52363072412567
Cxcl16	-0.600263342770185	Clec4n	1.56728696081299
Ube2c	-0.626642713508595	Cd33	1.55701732713641
Rhobtb3	-0.624734904893113	Pf4	2.37542116519112
Vps35	-0.625077953930147	S100a9	3.38467511012287
Sv2c	-0.630516256955433	Clec4d	2.89140327021766
Sp1	-0.60570475999226	Drd1a	1.38330133038076
Kif11	-0.62423293428596	Bgn	1.35134857427113
Appl1	-0.601049716659992	Sirpb1b	1.82731236927413
Crcp	-0.59710864336154	Olfr1183	1.69626249346313
Csk	-0.610294013155883	Sirpb1a	1.61196283530831
S100a2	-0.611279151701422	Acta1	1.44319027174692
Nme7	-0.606073407183894		
S100a8	3.76411710016141		
Ugt1a6b	1.74432140173902		

Continuação da Tabela 9: mRNAs que estão envolvidos no processo celular e seus valores de expressão

Processo celular	
Cyp2d22	2.19312169002904
Plek	1.36343784500921
Clec4e	2.33930416371204
Irg1	2.79332083815615
Ltb4r1	2.40260665990365
Hk3	1.77369897600083
Sirpa	1.64221775492418
Lcn2	3.31238041604557
G0s2	1.71898454970266
Cxcl2	2.02928501394688
Ppbp	1.43905776011052
Serinc2	2.02099415652851
Ccl9	1.70731968542493
Ccnb3	2.0756872059889
Pgm5	1.85208191859468
Myh4	1.57708433688674
Tlr2	1.36285335677529
Ier3	1.79575916572456
Ccl8	1.37144591380344
Ccl6	2.47216810855147
Sifn4	1.67702563788345
Stab1	1.51208001388896
Il1b	2.32004758877326
Emilin2	2.2707237861742
Chst3	1.45882981946147
Alox5ap	1.89260729333074
Olf1r1340	1.43652952064384
Kif2b	1.64679793877747
Blnk	1.55984009444834
ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Ccl3	1.81022414358659
Lrg1	2.31481901365899
Pygl	2.23240753503142
Mapk13	1.94234445981159
Krt74	1.47121504318378

Tabela 8: mRNAs que estão envolvidos no processo do sistema imune e seus valores de expressão

Sistema Imune	
Bpifa3	-0.620462667188897
Xcl1	-0.616336090229847
Stat4	-0.62098586941284
Cxcl16	-0.600263342770185
Defb25	-0.600434029977732
Csk	-0.610294013155883
S100a2	-0.611279151701422
Klre1	-0.607110980761478
Ccl4	1.90838233015423
Clec7a	1.94561461151648
Tnf	1.9393645138103
C3	1.46464556095234
Fpr2	2.0297759753119
Fcer1g	1.57907527966262
Ctsg	1.37882070257595
Hck	1.68288581399966
Adora3	1.47779690302803
Clec4n	1.56728696081299
Cd33	1.55701732713641
Pf4	2.37542116519112
Vpreb1	1.39048743495297
Ptgs1	1.90090159222101
Cebpd	1.74793227619287
Fpr2	2.0297759753119
Clec4d	2.89140327021766
Vpreb3	4.64879588031467
Alox5	2.73306814765331
S100a8	3.76411710016141
Pla2g7	1.47762195430755
Mpo	1.63580712023792
Clec4e	2.33930416371204
Cxcl2	2.02928501394688
Ppbp	1.43905776011052
Ccl9	1.70731968542493
Ccl8	1.37144591380344
Ccl6	2.47216810855147
Slfn4	1.67702563788345
Cebpe	2.17028418066933
Slc11a1	1.45584728930623
Blnk	1.55984009444834
ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Ccl3	1.81022414358659
Fcgr3	1.37456830226435
Fpr1	1.81090283486964
Mapk13	1.94234445981159

Tabela 9: mRNAs que estão envolvidos no processo biológico de reprodução e seus valores de expressão

Reprodução	
B3gnt2	-0.620194768988158
Klhdc9	-0.628751376615316
Ccnb3	2.0756872059889
Adam8	2.26609630328867
Obox1	1.79723899241991

Tabela 10: mRNAs que estão envolvidos no processo metabólico

	Processo metabólico		
Nfatc4	-0.61027890861957	Gm711	-0.593563636270605
Rgmb	-0.598606565028234	Trim71	-0.61715952056698
Slc1a6	-0.617917953715982	Ccl4	1.90838233015423
Figl1	-0.628736520752737	Chil3	3.45796634697394
Gemin2	-0.623463231296773	Arg2	1.823058545678
Skor1	-0.599011083890684	Anxa1	2.39570286870194
B3gnt2	-0.620194768988158	C3	1.46464556095234
Zfp235	-0.603663587364906	Chil1	1.75720459184617
Tk1	-0.602301504114642	Ctsg	1.37882070257595
Nedd4l	-0.626395064773765	Cds1	1.72739663742104
Ube2d1	-0.591884229610563	Gm5416	1.3503689918117
Ttc34	-0.602027383609533	Arg1	1.95819888261523
Zfp202	-0.593677228603713	Hck	1.68288581399966
Pja2	-0.592812849928279	Rhbdl2	1.54044354922132
Tceal7	-0.595422426719631	Ttll13	1.37649859193496
F2	-0.597141137504126	Tgm2	2.14284829255344
Nat8	-0.619133264997815	Wfdc17	2.18247615659368
Mlh3	-0.607650982570083	S100a9	3.38467511012287
Lbx1	-0.623450956047048	Cebpd	1.74793227619287
Bpifa3	-0.620462667188897	Drd1a	1.38330133038076
Pdk1	-0.60499736908071	Alox5	2.73306814765331
Tat	-0.597280943370949	Gm5483	2.65289030827631
Mtfr1	-0.624389992117532	Bgn	1.35134857427113
Xcl1	-0.616336090229847	Ppp1r3d	1.87433189070564
Plch2	-0.62204334702253	Asprv1	2.33369838221998
Id2	-0.594348825177963	S100a8	3.76411710016141
Stat4	-0.62098586941284	Pla2g7	1.47762195430755
Pgk2	-0.60626304787858	Ugt1a6b	1.74432140173902
Pdk1	-0.60499736908071	Cyp2d22	2.19312169002904
Fkbp2	-0.611433432598004	Stfa1	2.32200689457036
Adss	-0.608413618320808	Irg1	2.79332083815615
Papss1	-0.622402113279398	Hk3	1.77369897600083
Slc23a2	-0.59867903664013	Lcn2	3.31238041604557
Notum	-0.605469036470481	Ccl9	1.70731968542493
Ube2c	-0.626642713508595	Pgm5	1.85208191859468
Btbd2	-0.608449613636548	Stfa2l1	2.38264758512961
Prss22	-0.590326338741757	Stfa2	2.66122597194834
Bcat1	-0.617913739312227	Pbx4	1.64233740369041
Sp1	-0.60570475999226	Ccl8	1.37144591380344
Kif11	-0.62423293428596	Ccl6	2.47216810855147
Suc1g2	-0.614285747822318	BC100530	2.69525468212014
Crcp	-0.59710864336154	Hdc	2.43560985299608
Csk	-0.610294013155883	Cebpe	2.17028418066933
S100a2	-0.611279151701422	Alas2	2.28530594469349
Nme7	-0.606073407183894	Slpi	1.3528121889266
Zfp239	-0.61936400768319	Chst3	1.45882981946147
Txn1l	-0.60677973423711	Alox5ap	1.89260729333074
Xxylt1	-0.592277419713285	Kif2b	1.64679793877747
Ftsj1	-0.593591204729123	Obox1	1.79723899241991
Uxs1	-0.616546558034285	ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Zfp772	-0.59044156344013	Ccl3	1.81022414358659
Selp	-0.609561627069979	Arg1	1.95819888261523
Kif20a	-0.59124767761357	Pygl	2.23240753503142
Gm4858	-0.593132124707363	Cyp4f14	1.66117216372407
Mms19	-0.593636794336557		
Pmpcb	-0.622688691665164		
Snrpa	-0.601989989258083		

Tabela 11: mRNAs que estão envolvidos no processo biológico de respostas a estímulos e seus valores de expressão

Respostas a estímulos			
CamI	-0.604437388622543	Ppbp	1.43905776011052
Nfatc4	-0.61027890861957	Ccl9	1.70731968542493
Rgmb	-0.598606565028234	Cd300lf	2.05121945416388
Figl1	-0.628736520752737	Ier3	1.79575916572456
Skor1	-0.599011083890684	Ccl8	1.37144591380344
Chrnbl	-0.602145182425023	Ccl6	2.47216810855147
Pja2	-0.592812849928279	Slnf4	1.67702563788345
Olfr1341	-0.608730854474876	Cebpe	2.17028418066933
F2	-0.597141137504126	Il1b	2.32004758877326
Mlh3	-0.607650982570083	Slc11a1	1.45584728930623
Bpifa3	-0.620462667188897	Olfr1340	1.43652952064384
Xcl1	-0.616336090229847	ENSMUST00000103472	1.43879456355448
Stat4	-0.62098586941284	Ccl3	1.81022414358659
Pdk1	-0.60499736908071	Olfr1089	1.52249275012036
Cxcl16	-0.600263342770185	Mapk13	1.94234445981159
Defb25	-0.600434029977732		
Csk	-0.610294013155883		
Txn1l	-0.60677973423711		
Olfr1316	-0.611558766609415		
Itgb3	-0.603040592802772		
Ccl4	1.90838233015423		
Tnf	1.9393645138103		
Olfr433	1.57935489081925		
Gm14548	1.94042186358144		
Saa3	1.59346148134864		
Gp49a	1.65776492186288		
Fcer1g	1.57907527966262		
Lilrb4	1.71310994505467		
Hck	1.68288581399966		
Olfr1342	1.52363072412567		
Clec4n	1.56728696081299		
Pf4	2.37542116519112		
Tas2r124	1.74685828995007		
Cebpd	1.74793227619287		
Clec4d	2.89140327021766		
Drd1a	1.38330133038076		
Ngp	3.96326440202909		
Bgn	1.35134857427113		
Camp	4.29357131649167		
Olfr1183	1.69626249346313		
Olfr490	1.4400024143225		
Ugt1a6b	1.74432140173902		
Trem2	1.4755044868931		
Ptafr	1.5435041877591		
Clec4e	2.33930416371204		
Irg1	2.79332083815615		
Ltb4r1	2.40260665990365		
G0s2	1.71898454970266		
Cxcl2	2.02928501394688		

Considerando os 200 mRNAs mais reprimidos e os processos biológicos que esses genes estão envolvidos, podemos observar que 16 mRNAs estão envolvidos no processo biológico de localização, 2 mRNAs estão envolvidos no processo de locomoção, 4 mRNAs estão envolvidos no processo de adesão celular, 17 mRNAs estão envolvidos no processo de regulação biológica, 11 mRNAs estão envolvidos no processo de componente celular e biogênese, 9 mRNAs estão envolvidos no processo de desenvolvimento, 67 mRNAs estão envolvidos no processo celular, 7 mRNAs estão envolvidos no processos de organismos multicelular, 9 mRNAs estão envolvidos no processo de sistema imune, 2 mRNAs estão envolvidos no processo de reprodução, 59 mRNAs estão envolvidos no processo metabólico e 20 mRNAs estão envolvidos no processo de respostas a estímulos.

Em relação aos 200 mRNAs que tiveram sua expressão mais induzido podemos observar que 24 mRNAs estão envolvidos no processo de localização, 11 mRNAs estão envolvidos no processo de locomoção, 7 mRNAs estão envolvidos no processo de adesão celular, 27 mRNAs estão envolvidos no processo de regulação biológica, 7 mRNAs estão envolvidos no processo componente celular e biogênese, 12 mRNAs estão envolvidos no processo de desenvolvimento, 67 mRNAs estão envolvidos no processo celular, 18 mRNAs estão envolvidos no processo de organismos multicelular, 37 mRNAs estão envolvidos no processo de sistema imune, 3 mRNAs estão envolvidos no processo de reprodução, 52 mRNAs estão envolvidos no processo metabólico e 44 mRNAs estão envolvidos no processo de respostas a estímulos.

Desta forma, podemos observar que os processos biológicos mais afetados sob o silenciamento do miR-155 foram, processo celular (25,1%), processo metabólico (20,6%), resposta a estímulos (11,9%), regulação biológica (8,4%), processos do sistema imune (8,6%), localização (7,6%), processos de organismo multicelular (5,2%), processos de desenvolvimento (3,9%), componente celular de organização ou biogênese (3,3%), locomoção (2,4%), adesão biológica (2%) e reprodução (0,9%).

Quanto a modulação dos 400 mRNAs (200 mais expressos e os 200 menos expressos), que estão envolvidos nesses processos biológicos, podemos observar que quase todos tiveram sua expressão induzida sob o silenciamento do miR-155,

exceto nos processos metabólicos que a maioria teve sua expressão reprimida e no processo celular que não apresentou diferença entre os mRNAs com modulação induzida e reprimida.

6.6 Validação *in silico* da interação entre o miR-155 e os mRNAs envolvidos no desenvolvimento de timócitos

Para avaliar se os mRNAs envolvidos com o desenvolvimento de timócitos interagem com o miR-155, realizamos análises *in silico* utilizando o programa RNA-Hybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>). A Tabela 14 demonstra os sítios de interação, os valores de energia livre (mfe) entre o miR-155 e os respectivos mRNAs.

Tabela 12: Interação entre as sequências miR-155/mRNAs e seus respectivos valores de energia livre (mfe)

Símbolo dos mRNAs e do miR-155	Interação entre as sequências mRNA e miR-155	Valor de energia livre mfe (Kcal/mol)
Adam8 miR-155	5' U G G 3' ACCCU GCAGU GGCGU UGGGG UGUUA UCGUA 3' AUAG A AUU 5'	-21.7 kcal/mol
Bak1 miR-155	5' C G UG G C 3' ACCCU AUU GA AGC UGGGGA UAG UU UCG 3' UG AA UAAUU 5'	-21.3 kcal/mol
Camk2a miR-155	5' G AGCUG GG G 3' GCCUC UGCAAUUGGCA AA UGGGG GUGUUAUUCGU UU 3' AUA AA 5'	-24.5 kcal/mol

Continuação tabela 14: Interação entre as sequências de miR-155/mRNAs e seus respectivos valores de energia livre (mfe)

Símbolo dos mRNAs e do miRNA	Interação entre as sequências de mRNAs e miR-155	Valor de energia livre mfe (Kcal/mol)
Cd4	5' G CAAAAACC GUGGAUG GG A 3' ACCCUUA UUACAA AGC UAA UGGGGAU AGUGUU UCG AUU miR-155 3' AA UA 5'	-21.4 kcal/mol
Cd6	5' A G G GUGGAAGGGUG C 3' GCCCCUA CA AG GGCAUU UGGGGAU GU UU UCGUAA miR-155 3' A G AA UU 5'	-23.3 kcal/mol
Cd97	5' G C A 3' CCCUG CACGG GGCA GGGAU GUGUU UCGU miR-155 3' UG A AA AAUU 5'	-22.2 kcal/mol
Cdkn2a	5' C GC G 3' ACUUCUA GCGAU UAGCGU UGGGGAU UGUUA AUCGUA miR-155 3' AG AUU 5'	-21.3 kcal/mol
Hnf1a	5' U A A GCUGC C 3' GCC CCUG CACAG UGGC UGG GGAU GUGUU AUCG miR-155 3' A A UAAUU 5'	-21.6 kcal/mol
Il1b	5' C AGG GAAACCA C 3' GCUC GUCACAA UGGCA UGGG UAGUGUU AUCGU miR-155 3' GA A AAUU 5'	-21.9 kcal/mol
Jak3	5' G C 3' GCCCC AUCAC UGGGG UAGUG miR-155 3' A UAAUUCGUAAUU 5'	-19.7 kcal/mol
Irf4	5' C C C 3' GCUCUUG CACA UUGGCA UGGGGAU GUGU AAUCGU miR-155 3' A U AAUU 5'	-23.8 kcal/mol

Continuação tabela 14: Interação entre as sequências de miR-155/mRNAs e seus respectivos valores de energia livre (mfe)

Símbolo dos mRNAs e do miR-155	Interação entre as sequências de mRNAs e miR-155	Valor de energia livre mfe (Kcal/mol)
Ptcra miR-155	5' G G CAG G 3' UCUCUGUCA A GGCA GGGGAUAGU U UCGU 3' U G UAA AAUU 5'	-21.7 kcal/mol
Themis miR-155	5' U G A A 3' UU CUAUC ACAAUUGGCA GG GAUAG UGUUAAUCGU 3' U G AAUU 5'	-24.4 kcal/mol
Xcl1 miR-155	5' A AUUG A 3' ACCC CACAA UGGG GUGUU 3' GAUA AAUCGUAAUU 5'	-17.4 kcal/mol
Ccng2 miR-155	5' U UA GUACUAAAAC C 3' GCCUCU ACA GUUGGCA UGGGGA UGU UAAUCGU 3' UAG AAUU 5'	-21.0 kcal/mol
Ppp1r1c miR-155	5' A G CAACUGAUA G 3' AC CCUGUCAC GGUUAGUA UG GGAUAGUG UUAUCGU 3' G AAUU 5'	-24.4 kcal/mol

As interações consideradas fracas com o miR-155 foram com os seguintes mRNAs: Bax, Ccl19, Cd53, Inhba, Sh2d1a e Xcl1 (mfe $\geq$ -20). As demais interações, foram consideradas fortes (mfe $\leq$ -20).

6.7 Efeito biológico no desenvolvimento de timócitos sob o silenciamento do miR-155.

Após identificarmos por predição *in silico* que o silenciamento do miR-155 causa modulação em diferentes genes que são importantes para o desenvolvimento de timócitos, realizamos o teste biológico com o intuito de avaliarmos o efeito direto do silenciamento deste miRNA no desenvolvimento dessas células.

Para isso, analisamos por citometria de fluxo diferentes estágios de desenvolvimento do timócito, sendo eles DN1, DN2, DN3, DP, SP (CD4+CD8- e SP (CD4-CD8+) sob o silenciamento do miR-155 (Figura 12).

Figura 12. Frequência de timócitos segundo seus fenótipos. A) CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2) e CD44⁻CD25⁺ (DN3) dos grupos controle e tratado com anti-miR-155. B) CD3^{hi}CD4⁺ ou CD3^{low}CD4⁺CD8⁺ dos grupos controle e tratado com anti-miR-155.

Representamos os dados de citometria de fluxo, por gráfico de barras para melhor análise (Figura 13).

Figura 13. Gráficos de barras mostrando a frequência de timócitos CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3), CD3^{low}CD4⁺CD8⁺ (DP), CD3^{hi}CD4⁺ (SP CD4⁺) e CD3^{hi}CD8⁺ (SP CD8⁺) dos grupos controle e tratado com anti-miR-155.

Podemos observar que não houve diminuição na quantidade de células comparando o grupo controle e silenciado. Apesar de nossos dados demonstrarem que o silenciamento do miR-155 afeta a expressão de mRNAs que estão envolvidos no desenvolvimento de timócitos.

6.8 Confirmação da expressão de mRNA Adam-8 por meio de qRT-PCR.

Para confirmar os dados obtidos do experimento de *microarray*, avaliamos a expressão do mRNA Adam8, utilizando a método de qRT-PCR (Figura 14).

Figura 14. Confirmação dos dados de microarray por PCR quantitativa em tempo real para o mRNA Adam8.

Podemos observar que houve discreto aumento na expressão deste mRNA sob o silenciamento do miR-155 quando comparado com o grupo controle. Este aumento da expressão foi observado também no experimento do *microarray*, confirmando a indução do mRNA Adam 8.

7. DISCUSSÃO

O timo, é um órgão linfóide primário subdividido em medula e córtex que possui papel importante no sistema imune. Neste órgão os timócitos se desenvolvem passando por diferentes estágios e processos, onde essas células sofrem proliferação e diferenciação (anderson & Takahama 2012).

Esse processo de desenvolvimento no timo é conhecido como tolerância central que é caracterizada pela expressão gênica promíscua (pGE). Trabalhos na literatura demonstraram que mecanismos epigenéticos e modificações pós transcricionais, como o resultado da atuação de miRNAs, regulam a pGE o que causa o defeito no desenvolvimento de timócitos (Org et al. 2008; Ucar et al. 2013).

Além do controle de miRNAs, são encontrados diferentes trabalhos na literatura que avaliaram a expressão de genes importantes durante o desenvolvimento dos timócitos em diferentes condições, como em camundongos knockout de RAG1⁰, LAT⁰ e Cd3⁻ (Puthier et al. 2010), células sob o silenciamento de Aire (Pezzi et al. 2016) e a caracterização do estroma tímico de camundongos normais (Griffith et al. 2009).

No entanto, esse é o primeiro trabalho que conduziu o silenciamento do miR-155 nas células do timo. Nosso principal achado foi que silenciamento parcial *in vivo* do miR-155 modula (indução e repressão) a expressão de um conjunto de mRNAs que estão envolvidos em diferentes processos relacionados com o desenvolvimento de timócitos.

Para que o desenvolvimento dos timócitos ocorra de maneira eficiente, as células progenitoras linfóides oriundas da medula óssea e fígado migram para o córtex do timo através da junção cortico medular e se tornam células precursoras T que antecedem a fase de desenvolvimento DN (Bosselut & Vacchio 2016). Segundo o banco de dados *Immgen*, o gene *Camk2a* é mais expresso nessa fase de desenvolvimento de timócitos. Na literatura é descrito que o *Camk2a* é importante na via de sinalização de cálcio, necessária para a sobrevivência, controle de diferenciação, proliferação e apoptose celular (Victorero et al. 2004). No nosso trabalho, podemos observar a expressão do mRNA *Camk2a* reprimida após o silenciamento do miR-155 sendo um alvo potencial desse miRNA.

No córtex do timo, os timócitos se diferenciam em células DN, que são caracterizadas principalmente por sua proliferação e diferenciação nos seguintes estágios de desenvolvimento: DN1 (CD25⁻CD44⁺CD117^{hi}), DN2a (CD25⁺CD44⁺CD24^{hi}CD117^{hi}), DN2b (CD25⁺CD44⁺CD24^{hi}CD117^{lo}), DN3a (CD44⁻CD117⁻CD25⁺CD24^{hi}) e DN4(CD44⁻CD25⁻) (Bosselut & Vacchio 2016).

Nossos resultados revelaram que a expressão do mRNA Hnf1 foi aumentada durante a transição de estágio do DN2 para DN3. O Hnf1a, conhecido também como Tcf1, possui uma forte interação com o miR-155 e regula diferentes processos importantes durante os primeiros estágios no desenvolvimento de timócitos. Estudos na literatura demonstram que este gene está envolvido com o comprometimento da célula progenitora da medula óssea para célula T. Além disso, quando induzida a expressão do Tcf1 no timo ocorre a recombinação V(D)J para expressão de TCR β e reparo de danos em timócitos DN3 (Weber et al. 2011; Steinke & Xue 2014).

Já, durante o processo de seleção negativa foi visto que a ausência de Tcf1 induz a diferenciação para células SP Cd8⁺ o que demonstra que esse gene é necessário para a diferenciação de células SP Cd4⁺, mas não para células SP Cd8⁺ (Steinke et al. 2014).

Durante o estágio DN2 inicia-se a recombinação V(D)J da cadeia β ou δ e a formação do receptor TCR (*T Cell Receptor*) é completada no estágio DN3 com a recombinação V(D)J da cadeia α ou γ , os timócitos desse estágio podem também expressar o receptor NK1.1. Desta forma, essas células se diferenciam em timócitos T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$ ou células NKT invariantes (Murphy 2014).

Os timócitos T $\alpha\beta$ se tornam células DP e começam a expressar simultaneamente CD4 e CD8. No nosso trabalho, podemos observar que o silenciamento do miR-155 induziu mRNAs que são mais expressos nesse estágio. Dentre esses mRNAs encontramos o Themis que possui forte interação com o miR-155.

A função do gene Themis foi descrita a partir da observação que timócitos com a ausência de Themis possuem seleção positiva defeituosa sendo incompleta, resultando na diminuição e no defeito da sinalização de timócitos CD4⁺CD8^{int}. Adicionalmente, defeito na diferenciação de timócitos Simples positivos CD4⁺

causado pela diminuição da expressão de ThPok e GATA 3 que são fatores de transcrição essenciais para diferenciação de timócitos CD4⁺, enquanto que a diferenciação dos timócitos simples positivos CD8⁺ não foi alterado, porém foi observado que a sobrevivência dessa célula foi comprometida (Lesourne et al. 2009).

Além disso, outro gene importante encontrado em nosso trabalho e mais expresso em células DP foi o Cdkn2a que teve sua expressão induzida e interage fortemente com o miR-155. O locus de Cdkn2a codifica genes que são supressores tumorais importantes e que possuem alterações na leucemia linfoblástica aguda de célula T (Volanakis et al. 2013). De acordo com Miyazaki et al. (2008) a repressão desse gene causa defeito na transição de células DN para DP (Miyazaki et al. 2008).

Puthier e colaboradores revelaram que a diferenciação de timócitos DP é caracterizado pela expressão de Cd4, Cd8a, Ccr9, Cd97, Blr1/Cxcr5, Ets2 e Ccng2 (Puthier et al. 2010). Dentre esses genes, o silenciamento do miR-155 acarretou o aumento da expressão dos mRNAs Cd4 (marcador de superfície celular), Ccng2 (ciclina que inibe o ciclo celular) sendo ambos mais expressos em células DP e interagiram fortemente com o miRNA estudado.

Ainda foi observado em nossos dados a expressão de Cd97 que segundo o banco de dados Immgen é mais expresso em células NKT.

Outro gene importante expresso nas células DP é o Cd6 que também interagiu fortemente com o miRNA 155 e teve sua expressão induzida sob o silenciamento do mesmo. Trabalhos revelam que a deficiência da expressão de Cd6 no timo não altera a quantidade de células NKT, T $\gamma\delta$, DP e DN, porém acarreta uma redução da população de células SP CD4⁺ e CD8⁺ (Orta-Mascaró et al. 2016).

Após os timócitos completarem o processo de seleção positiva no córtex, essas células migram para a medula tímica, onde as células mTECs maduras expressam e apresentam antígenos restritos a tecidos periféricos para os mesmos. Além da célula mTEC, as células dendríticas presentes na medula tímica também funcionam como células apresentadoras de antígenos para os timócitos DP (Klein et al. 2014).

Essas células apresentam os antígenos próprios via MHC de classe I ou classe II. Portanto quando os timócitos DP encontram antígenos apresentados via MHC de classe I, ele se diferencia em célula SP CD8⁺CD4⁻, porém quando o

antígeno é apresentado via MHCII os timócitos DP se diferenciam em SP $CD4^+CD8^-$ (Klein et al. 2014). Se a interação de TCR do timócito com o MHC das mTECs ou das células dendríticas ocorrer com alta ou média avides, eles sofrem apoptose e esse processo é conhecido como seleção negativa. Após esse processo, os timócitos são tolerantes a antígenos próprios e aptos para migrar para a periferia (Yamaguchi et al. 2014; Passos et al. 2015).

Durante a diferenciação dos timócitos DP para SP, foi demonstrado que eles começam a expressar principalmente CD5, CD6, CD52, CD53, CCR7, Itgb2 e Itm2a (Puthier et al. 2010).

Em nossos dados foi encontrado modulação de mRNAs que estão mais expressos durante o estágio SP, como o Bak1 que teve sua expressão reprimida e interage fortemente com o miR-155 e está envolvido no controle pró-apoptótico. Trabalhos na literatura demonstram que a ausência do gene Bak1 causa aumento do timo devido ao aumento no número de timócitos, (diminuição da população de DP e aumento de DN e SP), revelando assim que então a ausência de Bak1 desregula a diferenciação dos timócitos (Biswas et al. 2010).

Outro mRNA modulado foi o Irf4, que sob silenciamento do miR-155 teve sua expressão foi aumentada e interage fortemente com este miRNA. O Irf 4 é expresso principalmente nos timócitos SP $CD4^+$, ele exerce um papel importante na diferenciação dos timócitos porque a sua super-expressão causa aumento da expressão de $CD4^+$ em timócitos $CD4^+CD8^{low}$ e ainda reprime a transcrição de Runx 3, o que causa o defeito na diferenciação de células SP $CD8^+$ (Cao et al. 2010).

Além da expressão da cadeia $\alpha\beta$ do TCR, os timócitos podem expressar as cadeias $\gamma\delta$. As células T $\alpha\beta$ são predominantemente encontrada no epitélio e nos tecidos associados a mucosa, sendo que no sangue periférico elas constituem cerca de 5%, enquanto que as células T $\alpha\beta$ são mais encontradas nos linfonodos e timo. Já no sangue periférico elas constituem cerca de 90% (Deniger et al. 2014).

Outra característica importante dessas células, é que elas reconhecem diretamente o antígeno de maneira independente do processamento e apresentação do MHC (Deniger et al. 2014).

Sob o silenciamento do miR-155 podemos observar a modulação de diferentes mRNAs que são marcadores dessa classe T $\gamma\delta$ de timócitos. Dentre eles o Jak 3 que apesar de interagir fracamente com o miR-155, teve sua expressão

induzida. O papel desse gene no desenvolvimento de timócitos através da sua deleção em camundongos que acarretou uma severa diminuição de timócitos T $\alpha\beta$, eliminação de timócitos T $\gamma\delta$ e diminuição da sobrevivência dos timócitos (Eynon et al. 1999).

Além disso, observamos a expressão induzida de Il-1b que interage fortemente com o miR-155 e que é outro marcador de timócitos $\gamma\delta$. O papel dessa citocina foi estudada por Mizutani e colegas, eles demonstraram que quando irradiado o timo do camundongo, ocorre a diminuição no número de timócitos nos primeiros dias, porém em seguida a proliferação dessas células são aumentadas devido o aumento da expressão do mRNA de Il-1b (Mizutani et al. 2002).

Outro gene marcador de timócitos $\gamma\delta$ é o Adam 8 que também teve sua expressão induzida e interage fortemente com o miR-155. Pesquisadores demonstraram que camundongos knockout de Adam 8 sofrem aumento do peso tímico resultante pela proliferação exacerbada de timócitos DN, DP^{lo} e DP^{hi}, diminuição da apoptose e migração dos timócitos para a medula diminuída. Essa diminuição é causada pelo acúmulo de timócitos nesse local causando alteração da disponibilidade dessa célula para a medula tímica e deficiência na seleção negativa (Gossens et al. 2010).

Além dos genes marcadores dos timócitos $\gamma\delta$ que tiveram sua expressão induzida sob o silenciamento do miR-155, podemos observar também em nosso trabalho a expressão reprimida de outros marcadores. Dentre eles estão o mRNA de Ppp1r1c que interage fortemente com o miR-155 e o Xcl1 que interage fracamente com este miRNA (Lei et al. 2011).

Os efeitos da deficiência de Xcl1 no timo de camundongos causou uma diminuição na quantidade de células dendríticas tímicas presentes na medula e um aumento dessa população na junção cortico medular sem ter causado alteração na quantidade dessa população. Isso demonstra que Xcl1 é necessário para a permanência das células dendríticas tímica na medula do timo, onde ela auxilia a mTEC apresentar antígenos próprios para os timócitos durante o processo de seleção negativa (Lei et al. 2011).

Apesar do camundongo deficiente de Xcl1 não apresentar comprometimento no processo de seleção negativa dos timócitos, foi observado que esse gene é importante para a geração de células T regulatórias naturais e que esses

camundongos apresentam infiltrado de linfócitos em diferentes órgãos causando dano na glândula lacrimal (Lei et al. 2011).

Por fim, foi observado que quando transferido timócitos do camundongo deficiente de *Xcl1* para o camundongo que não possui timo, eles desenvolveram inflamação da glândula lacrimal e quando transferido timócitos do camundongo selvagem para o camundongo deficiente de *Xcl1* houve redução na lesão da glândula lacrimal. Isso demonstra que timócitos do camundongo deficiente de *Xcl1* não conseguem controlar inflamação autoimune desta glândula (Lei et al. 2011).

Como dito anteriormente, outro gene marcador de células $T\gamma\delta$ que apresentam a sua expressão diminuída em nosso trabalho foi o *Ppp1r1c*. O gene *Ppp1r1c* ou TARPP é um substrato do *Carm1*, uma enzima que induz metilação. Pesquisadores observaram que a deleção do *Carm1* e a não metilação do TARPP causa a diminuição de timócitos, principalmente timócitos DN, porque as células na sua fase precoce de progenitor de timócitos ficam retido no seu local de desenvolvimento sem migrar para os outros locais do timo. Desta forma, a deleção de *Carm1* causa a não metilação do TARPP levando a desregulação no desenvolvimento na fase precoce de progenitor de timócitos (Kim et al. 2004).

Portanto, neste trabalho nós analisamos que o silenciamento parcial *in vivo* do miR-155 induz ou reprime a expressão desses mRNAs que estão envolvidos em diferentes processos relacionados com o desenvolvimento de timócitos.

Além disso, vimos também que o silenciamento do miR-155 no período analisado, ou seja, 24 h após as transfecções, não altera de maneira relevante a população de células dos estágios de desenvolvimento de timócitos. Pesquisadores já demonstraram a dificuldade em avaliar o efeito biológico do silenciamento de um único miRNA. Neste caso foi construído camundongo knockout condicionais para o miR-205, um miRNA expresso em células mTEC. Foi visto que a deleção deste miRNA, não altera a arquitetura tímica, a quantidade de subtipos de timócitos em desenvolvimento e também não altera a tolerância central e a tolerância periférica (Khan et al. 2015).

Como os miRNAs possuem sequencias muito parecidas entre si, um único mRNA pode ser controlado por diferentes miRNAs, portanto com o silenciamento ou a deleção de um miRNA, os mRNAs podem ser regulados por outros que ainda são expressos (Bartel 2009; Li & Rana 2014; Khan et al. 2015).

Desta forma, muitos pesquisadores inibem a expressão de uma família inteira de miRNAs ou das enzimas que participam de sua via de biogênese (Yi et al. 2006; Ucar et al. 2013; Khan et al. 2014; Khan et al. 2015).

Apesar de não ter alterado as subpopulações de células, sob o silenciamento do miR-155 houve alteração na expressão de mRNAs que estão envolvidos em diferentes processos. Dentre esses processos observamos que os mRNAs estão envolvidos na localização, locomoção e adesão celular, regulação biológica, componente celular e biogênese, processo de desenvolvimento, processo celular e organismos multicelular, processo de sistema imune, reprodução, metabólico e respostas a estímulos.

Salientamos que na literatura, ainda não há trabalhos sobre o efeito do miR-155 sobre esses mRNAs que participam no desenvolvimento de timócitos, processos esses essenciais para a localização, locomoção e a adesão.

Finalmente reafirmamos que este é o primeiro estudo que avalia a participação de um único miRNA que é expresso por timócitos e que desempenha uma função importante no seu desenvolvimento. Nossos resultados, apontam a existência de um papel para o miR-155 no controle pós-transcricional de mRNAs que são expressos nas diferentes fases e nos diferentes processos de desenvolvimento dos timócitos e abrem novas perspectivas para estudarmos sobre o controle pós-transcricional durante o desenvolvimento dessa célula.

8. CONCLUSÃO

Concluimos que o miR-155 interage com um conjunto de mRNAs que codificam proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento dos timócitos, o que confirma a hipótese do trabalho.

9. REFERÊNCIAS:

Abbas, k abul, Lichtman, H.A. & Pillai, S., 2012. *Imunologia Celular e Molecular* 7th ed.,

Anderson, G. & Takahama, Y., 2012. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development & repertoire selection. *Trends in Immunology*, 33(6), pp.256–263. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490612000555> [Accessed October 22, 2016].

Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells & the control of immunity. *Nature*, 392(6673), pp.245–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521319>.

Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition & regulatory functions. *Cell*, 136(2), pp.215–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167326> [Accessed October 22, 2016].

Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical & Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society.*, 57, pp.289–300.

Biswas, S. et al., 2010. A role for proapoptotic Bax & Bak in T-cell differentiation & transformation. *Blood*, 116(24), pp.5237–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813900> [Accessed August 20, 2016].

Blackburn, C.C. & Manley, N.R., 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 4(4), pp.278–289. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1331>.

Bolstad, B. et al., 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance & bias. *Bioinformatics*.

Bosselut, R. & Vacchio, M., 2016. T Cell Development.pdf.

Bruserud, Ø. et al., 2016. AIRE-mutations & autoimmune disease. , 43, pp.8–15.

Cao, Y. et al., 2010. Interferon regulatory factor 4 regulates thymocyte differentiation by repressing Runx3 expression. *European Journal of Immunology*, 40(11), pp.3198–3209. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201040570> [Accessed August 20, 2016].

Cheng, M., Shum, A. & Anderson, M., 2007. What's new in the Aire? *Trends Immunol*, pp.321–327.

Deniger, D.C., Moyes, J.S. & Cooper, L.J.N., 2014. Clinical Applications of Gamma Delta T Cells with Multivalent Immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, p.636. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00636/abstract> [Accessed August 23, 2016].

Derbinski, J. et al., 2005. Promiscuous gene expression in thymicepithelialcells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.*

Derbinski, J. et al., 2001. Promiscuous gene expressionin medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol*, pp.1032–1039.

Dudda, J.C. et al., 2013. virus infection & cancer. *Immunity*, 38(4), pp.742–753.

DuPage, M. & Bluestone, J., 2016. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*.

Eynon, E. et al., 1999. Distinct effects of Jak3 signaling on alphabeta & gammadelta thymocyte development. *J Immunol*.

Fausto, C. et al., 2004. Timo: caracterização ultrasonográfica. *Radiol Bras*, pp.207–210.

Gascoigne, N.R.J. et al., 2016. TCR Signal Strength & T Cell Development. , 32,

pp.327–348.

Giraud, M. et al., 2012. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

González-García, S. et al., 2012. Notch1 & IL-7 receptor signalling in early T-cell development & leukaemia. *Curr Top Microbiol Immunol.*, pp.47–73.

Gordan, J. & Manley, N.R., 2011. Mechanisms of thymus organogenesis & morphogenesis. *Development*.

Gossens, K. et al., 2010. Deficiency of the Metalloproteinase-Disintegrin ADAM8 Is Associated with Thymic Hyper-Cellularity. , 5(9).

Gracias, D. et al., 2013. The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nat Immunol*.

Griffith, A. V. et al., 2009. Spatial Mapping of Thymic Stromal Microenvironments Reveals Unique Features Influencing T Lymphoid Differentiation. *Immunity*, 31(6), pp.999–1009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.024>.

Hager-Theodorides, A. et al., 2005. The transcription factor Gli3 regulates differentiation of fetal CD4- CD8- double-negative thymocytes. *Blood*.

Hu, Z., Lancaster, J. & Ehrlich, L., 2015. The Contribution of Chemokines & Migration to the Induction of Central Tolerance in the Thymus. *Front Immunol*.

Hutcheson, J. et al., 2005. Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis & in thymocyte apoptosis. , 201(12), pp.1949–1960.

Jurberg, A.D., Vasconcelos-fontes, L. & Cotta-de-almeida, V., 2015. A tale from TGF- β superfamily for thymus ontogeny & function. , 6(August), pp.1–15.

Khan, I. et al., 2014. Canonical microRNAs in thymic epithelial cells promote central tolerance. *Eur J Immunol*.

Khan, I.S. et al., 2015. Identification of MiR-205 As a MicroRNA That Is Highly Expressed in Medullary Thymic Epithelial Cells.

Kim, J. et al., 2004. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein & deregulated early T cell development. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), pp.25339–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096520> [Accessed September 3, 2016].

Klein, L. et al., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection & central Tolerance induction. *Nat Rev Immunol*.

Klein, L. et al., 2014. Positive & negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), pp.377–391. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3667> [Accessed August 20, 2016].

Krill, K. et al., 2013. Dicer deficiency reveals microRNAs predicted to control gene expression in the developing adrenal cortex. *Mol Endocrinol*.

Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function & decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), p.597. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2843> [Accessed October 26, 2016].

Kyewski, B. & Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: na extended view. *Nat. Rev. Immunol*.

Kyewski, B. & Klein, L., 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev.Immunol*.

Ladi, E. et al., 2006. Thymic microenvironments for T cell differentiation & selection.

Nat Immunol.

Lee, C., Feinbaum, R. & Ambrost, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*.

Lei, Y. et al., 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells & contributes to regulatory T cell development. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(2), pp.383–394. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20102327> [Accessed September 3, 2016].

Lesourne, R. et al., 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol.*

Lewis, B., Burge, C. & Bartel, D., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, pp.15–20.

Li, Z. & Rana, T.M., 2014. Therapeutic targeting of microRNAs: current status & future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(8), pp.622–638. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd4359> [Accessed October 22, 2016].

Lind, E.F. & Ohashi, P.S., 2014. Mir-155 , a central modulator of T-cell responses. , pp.11–15.

Macedo, C. et al., 2009. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Molecular immunology*, 46(16), pp.3240–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720399> [Accessed October 31, 2016].

Magalhães, D. et al., 2006. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol*, pp.81–99.

Mathis, D. & Benoist, C., 2007. A decade of AIRE. *Nature reviews; Immunology*.

Miyazaki, M. et al., 2008. Thymocyte Proliferation Induced by Pre-T Cell Receptor Signaling Is Maintained through Polycomb Gene Product Bmi-1-Mediated Cdkn2a Repression. *Immunity*, 28(2), pp.231–245.

Mizutani, N. et al., 2002. Inflammatory & anti-inflammatory cytokines regulate the recovery from sublethal X irradiation in rat thymus. *Radiation research*, 157(3), pp.281–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839090> [Accessed August 22, 2016].

Oliveira, E. et al., 2013. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator(Aire). *Immunobiology*.

Org, T. et al., 2008. The autoimmune regulator PHD finger binds to nonmethylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep*.

Orta-Mascaró, M. et al., 2016. CD6 modulates thymocyte selection & peripheral T cell homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(8), pp.1387–1397. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20151785> [Accessed August 18, 2016].

Passos, G.A., Mendes-da-Cruz, D.A. & Oliveira, E.H., 2015. The Thymic Orchestration Involving Aire, miRNAs, & Cell–Cell Interactions during the Induction of Central Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 6, p.352. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00352/abstract> [Accessed August 20, 2016].

Petersen, C. et al., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*.

Pezzi, N. et al., 2016. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire

protein, deregulates cell adhesion genes & decreases thymocyte interaction. *Molecular immunology*, 77, pp.157–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27505711> [Accessed October 25, 2016].

Puthier, D. et al., 2010. A General Survey of Thymocyte Differentiation by Transcriptional Analysis of Knockout Mouse Models 1.

Rehmsmeier, M. et al., 2004. Fast & effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(10), pp.1507–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383676> [Accessed November 1, 2016].

Reinhardt, A. et al., 2014. CCR7-mediated migration in the thymus controls $\gamma\delta$ T-cell development. *Eur J Immunol*.

Rowbotham, N.J. et al., 2009. Sonic hedgehog negatively regulates pre-TCR – induced differentiation by a Gli2-dependent mechanism. , 113(21), pp.5144–5157.

Schwarzenbach, H. et al., 2014. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*.

Singer, A., Adoro, S. & Park, J., 2008. Lineage fate & intense debate: myths, models & mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol*.

Smyth, G.K., 2004. Linear models & empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*.

Staal, F.J.T. et al., 2001. Wnt signaling is required for thymocyte development & activates Tcf-1 mediated transcription. , pp.285–293.

Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A., 2003. Positive & negative selection of T cells. *Annual review of immunology*, 21, pp.139–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414722>.

Steinke, F.C. et al., 2014. TCF-1 & LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4⁺ T cell fate & interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8⁺ T cells. *Nature Immunology*, 15(7), pp.646–656. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2897> [Accessed August 4, 2016].

Steinke, F.C. & Xue, H.-H., 2014. From inception to output, Tcf1 & Lef1 safeguard development of T cells & innate immune cells. *Immunologic Research*, 59(1-3), pp.45–55. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-014-8545-9> [Accessed August 4, 2016].

Tsai, C. et al., 2013. MicroRNA miR-155 Affects Antiviral Effector & Effector Memory CD8 T Cell Differentiation. *Journal of Virology*.

Tykocinski, L., Sinemus, A. & Kyewski, B., 2008. The thymus medulla slowly yields its secrets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

Ucar, O. et al., 2013. An evolutionarily conserved mutual interdependence between Aire & microRNAs in promiscuous gene expression. *Eur J Immunol*.

Victorero, N.G. et al., 2004. Knockout Mouse Models of Differentiation by Transcriptional Analysis A General Survey of Thymocyte A General Survey of Thymocyte Differentiation by Transcriptional Analysis of Knockout Mouse Models 1. *J Immunol Material Supplementary html The Journal of Immunology at Univ.Sao Paulo/Fac.Medic.Ribeirao Preto/Bibl.Centr on August*, 173(9), pp.6109–6118. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/173/10/6109> [Accessed August 9, 2016].

Vigorito, E. et al., 2013. miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunol Rev*.

Volanakis, E.J., Boothby, M.R. & Sherr, C.J., 2013. Epigenetic regulation of the Ink4a-Arf (Cdkn2a) tumor suppressor locus in the initiation & progression of Notch1-driven T cell acute lymphoblastic leukemia. *Experimental hematology*, 41(4), pp.377–

86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178376> [Accessed August 18, 2016].

Weber, B.N. et al., 2011. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification & differentiation. *Nature*, 476(7358), pp.63–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814277> [Accessed August 4, 2016].

Yamaguchi, Y. et al., 2014. In vitro co-culture systems for studying molecular basis of cellular interaction between Aire-expressing medullary thymic epithelial cells & fresh thymocytes. *Biology open*, 3(11), pp.1071–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25326516> [Accessed August 20, 2016].

Yi, R. et al., 2006. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature genetics*, 38(3), pp.356–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462742> [Accessed October 22, 2016].

Zhou, L., Chong, M.M.W. & Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30(5), pp.646–655.

Zlotoff, D. et al., 2010. CCR7 & CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*.