

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNA CANDIDATOS À REGULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA EM PÊNFIGO FOLIÁCEO**

CURITIBA

2012

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNA CANDIDATOS À REGULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA EM PÊNFIGO FOLIÁCEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler.

CURITIBA

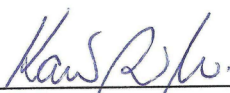
2012

PARECER

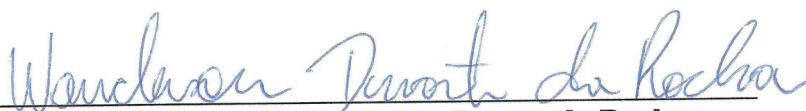
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **GABRIEL ADELMAN CIPOLLA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 17 de fevereiro de 2012



Professora Doutora Karin Braun-Prado
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular



Professor Doutor Wanderson Duarte da Rocha
Dep. Bioquímica/UFPR – Membro Titular



Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Aos meus pais, Miriam e Paulo, e a minha segunda mãe, Lu.

A toda minha família e, em especial, ao meu tio Reynaldo,
aonde estiver.

Aos pacientes.

Muito obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, que sabe o tamanho do investimento feito neste trabalho. Isso mostra a confiança que me foi depositada e não há palavras para agradecê-la. Muito obrigado de qualquer forma!

Ao meu pai Paulo, a minha segunda mãe Lu, a minha irmã Julia, ao meu irmão Lucas e, sobretudo, a minha mãe Miriam, que jamais deixou de me apoiar na busca pelos meus sonhos... Te amo, mãe! Vocês são a minha vida...

A toda a minha família, que mesmo estando longe sempre esteve presente.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que me ajudaram diretamente neste estudo, Danillo, Reginaldo, Liana e Juciane, seja na coleta ou no processamento das amostras. Agradecimento especial ao Danillo, que com o passar dos anos e convívio intenso no laboratório se tornou um grande amigo. Torço demais pelo seu sucesso! E Régis, todas aquelas noites em claro, trabalhando, só foram possíveis graças a você.

A todos os colegas e ex-colegas, ou melhor, amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana: Andressa, Áurea, Bruno, Danielle, Danillo, Eduardo, Eleonora, Juciane, Karin, Liana, Lorena, Márcia, Marcinha, Reginaldo, Sara, Sheyla e Simone. É muito divertido trabalhar com vocês!

Ao pessoal do laboratório da Profa. Dorly pelo empréstimo de material indispensável a este trabalho. Em breve devolveremos...

Aos pacientes e controles que participaram deste estudo e aos funcionários do Hospital Adventista do Pênfigo pela colaboração e acolhimento.

Aos meus amigos Bruno, Dani, Rê e Si! Nossos momentos juntos, mesmo que menos frequentes agora, são mais que especiais. Vocês são minha família fora de casa!

Ao meu amigo Diogo pelos quase 20 anos de amizade.

E ao meu amigo Henrique por todo o apoio e paciência neste momento...

“Viver é a coisa mais rara do mundo.
A maioria das pessoas apenas existe.”

Oscar Wilde

RESUMO

Células T reguladoras naturais expressam constitutivamente a molécula CD25 e o fator de transcrição Foxp3 e representam uma importante subpopulação de linfócitos T CD4 com atividade supressora. Estas células têm sido estudadas em várias doenças autoimunes, incluindo pênfigo vulgar, mas até o momento não foram estudadas em pênfigo foliáceo (PF). MicroRNA constituem uma classe de pequenos RNA não-codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam pós-transcricionalmente, participando da sintonia fina da expressão gênica através do pareamento com a região 3' não traduzida de certos RNA mensageiros. MicroRNA são importantes para o desenvolvimento e função normais do sistema imune, sendo que alterações quantitativas estão frequentemente associadas à doenças autoimunes. PF trata-se de uma doença autoimune caracterizada pela produção de autoanticorpos IgG dependente de células Th2 e direcionados contra proteínas de adesão entre células da pele. Considerando esta importância de células Th2 e B autorreativas, bem como o evidente papel de células T reguladoras na perda de autotolerância, o objetivo deste trabalho foi verificar o padrão de expressão de cinco microRNA candidatos à regulação da resposta (auto)imune adaptativa do PF (miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p, and miR-1321) nas três subpopulações de linfócitos acima mencionadas, bem como analisar a proporção de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. Os resultados principais foram: (1) em células B de memória expressando IgG de superfície (B IgG⁺) e Th2, miR-155 esteve 2 e 3 vezes superexpresso, respectivamente, em pacientes sem lesão em relação aos controles sadios ($P = 0,02$ and $P = 0,03$, respectivamente); (2) miR-1321 apresentou tendência de superexpressão em células Th2 do conjunto total de pacientes comparados aos controles sadios ($P = 0,10$) e há evidências de que este microRNA regule a expressão de BLYS, um estimulador de células B, uma vez que os seus níveis mostraram-se inversamente proporcionais aos de BLYS; (3) miR-148a não foi detectado em células B IgG⁺ de pacientes sem lesão, mas foi consistentemente expresso por células de pacientes com a doença ativa; e (4) células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ estiveram significativamente reduzidas em pacientes com a doença ativa em relação aos controles sadios ($P = 0,02$) e aos pacientes sem lesão ($P = 0,03$). Além disso, foi detectada uma tendência de menor expressão de Foxp3 em pacientes com a doença ativa, sugerindo que células T reguladoras sejam ainda menos frequentes no PF. Curiosamente, células Th2 e B IgG⁺, potenciais alvos de células T reguladoras, mostraram-se sutilmente mais frequentes em pacientes com lesões ativas. Estes resultados colocam miR-148a, miR-155 e miR-1321 como potenciais alvos para terapias alternativas em PF. Além disso, sugere-se que uma redução da frequência de células T reguladoras esteja associada ao PF, destacando a importância destas células para a manutenção da autotolerância.

Palavras-chave: microRNA; miR-148a; miR-155; miR-1321; células Th2; células T reguladoras; células B; pênfigo foliáceo.

ABSTRACT

Natural regulatory T cells express the CD25 molecule and Foxp3 transcription factor constitutively and represent an important CD4⁺ T cell subpopulation with suppressive functions. These cells have been implicated in many autoimmune diseases, including pemphigus vulgaris, but have not yet been studied in pemphigus foliaceus (PF). MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides that act at the posttranscriptional level as important gene expression fine-tuners, through binding to the 3' UTR of mRNAs. MicroRNAs have been increasingly implicated in normal immune function and their misregulation is frequently associated to autoimmune diseases. PF is an autoimmune disease characterized by a Th2-dependent production of IgG autoantibodies directed against skin adhesion proteins. Considering this importance of autoreactive Th2 and B cells, as well as the evidence of the role of regulatory T cells in loss of self-tolerance, we aimed to verify the expression patterns of five microRNAs candidates of PF adaptive (auto)immune regulation (miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p, and miR-1321) in the three mentioned lymphocytes subpopulations, as well as to analyze the proportion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the disease. Among our findings are: (1) in IgG⁺ B cells and Th2 cells, miR-155 is 2- and 3-fold upregulated, respectively, in patients with inactive disease compared to healthy controls ($P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively); (2) miR-1321 tends to be upregulated in Th2 cells of PF patients compared to healthy controls ($P = 0.10$) and is believed to target BLYS, a B cell stimulator, as its levels are inversely proportional to those of BLYS; (3) miR-148a was not detected in IgG⁺ B cells of patients with inactive disease, but was consistently expressed by these cells in patients with active disease; and (4) the CD4⁺CD25⁺ T cell subpopulation is significantly reduced in patients with active disease in relation to healthy controls ($P = 0.02$) and patients with inactive disease ($P = 0.03$). Moreover, we detected a tendency for lower expression of Foxp3 in patients with active disease, suggesting that this regulatory T cell subpopulation must be even less frequent in the disease. Interestingly, Th2 cells and IgG expressing memory B cells, potential targets of regulatory T cells, were slightly more frequent in patients with active disease. Together, these results place miR-148a, miR-155 and miR-1321 as potential targets for new therapeutic approaches in PF. In addition, we suggest that a quantitative impairment of regulatory T cells is associated with PF pathogenesis, highlighting the importance of these cells for maintenance of self-tolerance.

Keywords: microRNA; miR-148a; miR-155; miR-1321; Th2 cells; regulatory T cells; B cells; pemphigus foliaceus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura molecular das proteínas Dsg1 e Dsg3 _____	5
FIGURA 2 – Um modelo para a via de imunopatogenicidade do FS _____	5
FIGURA 3 – Estrutura do grampo intramolecular do pri-miRNA _____	16
FIGURA 4 – Processamento do pri-miRNA pela enzima Drosha _____	17
FIGURA 5 – Processamento do pre-miRNA _____	18
FIGURA 6 – Esquema da participação dos microRNA na hematopoiese e no desenvolvimento e função das células do sistema imune _____	24
FIGURA 7 – Fluxo de trabalho para isolamento de células B CD19 ⁺ e de memória IgG, células T reguladoras CD4 ⁺ CD25 ⁺ e células Th2 CD4 ⁺ CD294 ⁺ . _____	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O PÊNFIGO FOLIÁCEO	3
2.2 A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	8
2.2.1 A resposta imune adaptativa estendida ao pênfigo foliáceo	10
2.3 GENERALIDADES SOBRE microRNA E RNA DE INTERFERÊNCIA	12
2.3.1 Breve histórico sobre microRNA	13
2.3.2 Aspectos genômicos	14
2.3.3 Biogênese	15
2.3.4 Mecanismos de controle da expressão gênica	18
2.3.5 Distinção entre miRNA e siRNA	20
2.3.6 Nomenclatura e alvos	21
2.3.7 MicroRNA no desenvolvimento biológico	21
2.4 RNA NÃO-CODIFICANTE NA PATOFISIOLOGIA E TERAPIA DE DOENÇAS HUMANAS	23
2.4.1 MicroRNA e o sistema imune	23
2.4.2 MicroRNA e doenças autoimunes	25
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	28
4 ARTIGOS	29
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE	70
MATERIAL E MÉTODOS	70
Obtenção e caracterização da amostra	70
Critérios para escolha dos microRNA candidatos	71
Obtenção de células B CD19 ⁺ e de memória IgG, T reguladoras CD4 ⁺ CD25 ⁺ e Th2 CD4 ⁺ CD294 ⁺ a partir de PBMC	73
Extração de RNA	74
Quantificação por PCR-RT em tempo real	75
Análise estatística	76
ANEXO I	77
FICHA DE AVERIGUAÇÃO	77
ANEXO II	82
OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	82
ANEXO III	84
OBTENÇÃO DE CÉLULAS B CD19 ⁺ E DE MEMÓRIA IgG, T REGULADORAS CD4 ⁺ CD25 ⁺ E Th2 CD4 ⁺ CD294 ⁺ A PARTIR DE PBMC	84
ANEXO IV	91
ANATOMIA DAS PLACAS DE qPCR	91

1 INTRODUÇÃO

O pênfigo foliáceo (PF) é considerado uma doença autoimune que se manifesta sobretudo na pele, com a formação de bolhas intraepiteliais resultantes da perda de adesão entre células da epiderme conhecidas como queratinócitos. Este processo conhecido como acantólise se dá em função da presença de anticorpos antidesmogleína 1 (Dsg1), uma proteína da família das caderinas que é fundamental para a adesão celular. No Brasil, esta doença atinge seus maiores níveis de incidência, sendo portanto chamada de pênfigo foliáceo endêmico, popularmente conhecida como “fogo selvagem”.

MicroRNA (ou miRNA) e RNA de interferência curto (ou siRNA, do inglês *small interfering RNA*) representam duas classes de pequenas moléculas de RNA não-codificante variando entre 18 e 24 nucleotídeos de comprimento. Estas moléculas de RNA altamente conservadas entre diferentes espécies participam da regulação pós-transcricional, através de pareamento, no formato Watson-Crick, com a região 3' não traduzida (ou 3' UTR, do inglês *3' untranslated region*) de certos RNA mensageiros (RNAm). Dependendo da complementaridade entre miRNA ou siRNA e o RNAm alvo, o resultado poderá ser repressão da tradução ou degradação do transcrito.

Devido a sua ampla atuação, os microRNA são importantes em diversas etapas do desenvolvimento e diferenciação celular, o que resulta num potencial envolvimento de alterações de miRNA em diversas doenças humanas. Estudos anteriores já mostraram níveis de expressão de miRNA alterados em várias condições patológicas, como tumores, doenças autoimunes, como lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e psoríase, e, até mesmo, infecções virais. Além disso, a expressão de certos miRNA vem sendo correlacionada com aspectos normais de linhagens celulares específicas, principalmente células do sistema imune, como células B e T e seus subtipos (células T efectoras e células T reguladoras).

Mais de 1300 genes de microRNA já foram descritos para o genoma humano. Além disso, acredita-se que por volta de um terço dos aproximadamente 25000 genes presentes no nosso genoma tenham seus RNAm regulados por microRNA. A

importância destes para o desenvolvimento biológico e a sua relação com diversas doenças humanas, principalmente autoimunes, ainda são incipientes. Quanto ao pênfigo, não há quaisquer trabalhos publicados que tratem de microRNA, o que fortalece a relevância e urgência deste estudo, principalmente pelo fato dos resultados obtidos poderem ser empregados no desenvolvimento de tratamentos alternativos, tais como as terapias baseadas em RNA de interferência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PÊNFIGO FOLIÁCEO

O pênfigo é um conjunto de doenças cutâneas de etiologia desconhecida, mas caracterizadas pelo desenvolvimento de bolhas intraepidérmicas e/ou erupções da mucosa e por autoanticorpos direcionados contra proteínas de adesão, particularmente as desmogleínas (Dsg) 1 e 3, pertencentes à família das caderinas e fundamentais para a adesão entre células de superfície, como os queratinócitos (DIAZ *et al.*, 1989; GROVES, 2009). Desta forma, o pênfigo é entendido como uma doença autoimune e, assim como várias outras, tem um caráter complexo, ou seja, é uma doença multifatorial em que estão envolvidos fatores genéticos múltiplos e ambientais.

As formas clínicas principais do pênfigo podem ser diferenciadas em função de perfis distintos característicos de autoanticorpos. O pênfigo vulgar (PV) está associado à presença de anticorpos de classe IgG específicos para a Dsg3, podendo ou não haver anticorpos anti-Dsg1. O pênfigo foliáceo (PF), por sua vez, é caracterizado unicamente pela presença de anticorpos IgG anti-Dsg1, apesar de Hilario-Vargas *et al.* (2006) terem observado uma prevalência de anticorpos anti-Dsg3 não patogênicos em indivíduos com PF e que não desenvolveram nenhuma característica fenotípica de PV. Em função da sua ampla distribuição nas camadas inferiores da epiderme e da mucosa epitelial, a Dsg3, quando alvo de autoanticorpos, resulta na forma mais grave e ativa de pênfigo, com ulcerações nas mucosas. No PF, a acantólise e a formação de bolhas ocorrem na superfície da epiderme, em função da distribuição da Dsg1 nas camadas epidérmicas mais superficiais (HARMAN *et al.*, 2001; GROVES, 2009).

O pênfigo foliáceo pode ainda ser classificado de acordo com a sua epidemiologia. Segundo Diaz *et al.* (1989), pode ser esporádico, com baixa incidência em todos os países, ou endêmico, como o pênfigo foliáceo endêmico (PFE) restrito a países da América do Sul, onde é também conhecido como Fogo Selvagem (FS) e tido como clinicamente idêntico à forma idiopática observada na América do Norte e Europa.

O Brasil apresenta a maior incidência de FS, estando este distribuído principalmente entre 45° e 65° de longitude oeste e 5° e 25° de latitude sul, em regiões de altitude entre 500 e 800m. Além disso, os focos da doença estão nas proximidades dos rios Paraná e Tocantins e seus afluentes, abrangendo os estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (DIAZ *et al.*, 1989).

A área de maior incidência do FS no Brasil, além de uma série de outros aspectos, coincide com a distribuição geográfica de um inseto simuliídeo popularmente conhecido como borrachudo ou mosca negra (*Simulium nigrimanum*), podendo então ser considerado um fator de risco ambiental (LOMBARDI *et al.*, 1992). Seguindo esta evidência, Li *et al.* (2003) sugeriram que, um ou mais antígenos salivares do simuliídeo contenham moléculas capazes de desencadear uma reação cruzada contra a Dsg1, determinando uma resposta autoimune contra epítomos do quinto domínio extracelular (EC5) desta glicoproteína (FIGURA 1), uma vez que o soro de indivíduos no estágio pré-clínico reagiu contra o domínio EC5 de Dsg1. Em seguida, a resposta imune em indivíduos geneticamente predispostos ao FS estaria sujeita a um espalhamento intramolecular de epítomos em direção aos epítomos dos domínios EC1 e EC2 de Dsg1. Isto resultaria na manifestação da doença, já que o início dos sintomas clínicos está associado ao surgimento de anticorpos específicos para epítomos dos domínios EC1 e EC2 de Dsg1 e que o soro de todos os indivíduos com a doença no estado ativo reconheceu estes domínios (LI *et al.*, 2003).

Além dessa mudança de epítomo, entre os estágios pré-clínico e clínico, Culton *et al.* (2008) propuseram que ocorre uma mudança de isotipo de IgG1 para IgG4 do estágio pré-clínico para o clínico ou entre a remissão e a recidiva ao FS. Estes resultados mostram que a resposta imune humoral anti-Dsg1 em FS exhibe primeiramente produção de IgG1, seguida por uma resposta de IgG4, que determina efetivamente a manifestação da doença e torna esta mudança de isotipo um interessante alvo terapêutico. Assim, considerando o papel patogênico de IgG4, é possível que este anticorpo reconheça diferentes epítomos em relação ao anticorpo não-patogênico IgG1 (FIGURA 2).

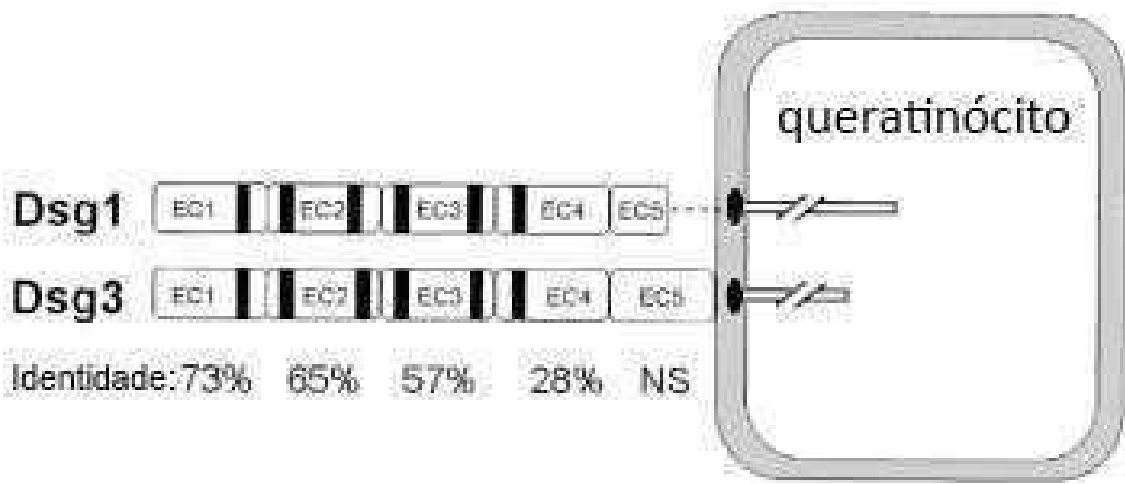


FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura molecular das proteínas Dsg1 e Dsg3. *Identidade* indica a semelhança entre Dsg1 e Dsg3 quanto às repetições de caderinas. *NS* indica que a homologia de sequência entre Dsg1 e Dsg3 não é significativa. Os detalhes em preto mostram seis supostos motivos de ligação de Ca^{2+} nas repetições de caderinas (adaptado de LI *et al.*, 2003).

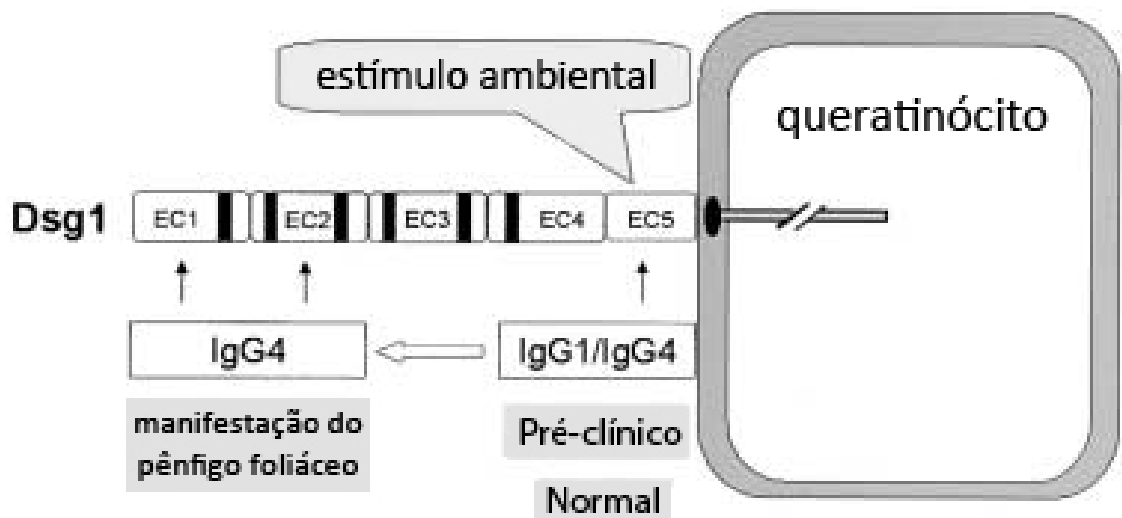


FIGURA 2 – Um modelo para a via de imunopatogenicidade do FS (adaptado de LI *et al.*, 2003).

Considerando a natureza proteica das Dsg, a ativação de células B para a produção de autoanticorpos anti-Dsg é dependente de células T autorreativas e específicas. Verificou-se que clones de células T do sangue periférico da maioria de pacientes com FS reconhecem e proliferam especificamente em resposta a epítomos do domínio extracelular da Dsg1 recombinante (LIN *et al.*, 1997). As células T reativas à Dsg1 exibiram um fenótipo de células T CD4⁺ de memória e produziram um perfil de citocinas característico de células T auxiliares (ou Th, do inglês *T helper*) do tipo 2 (Th2), ou seja, produziram interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-6, mas não interferon gama (IFN- γ), que é característico da resposta Th1 (MOESTA *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes objetivam melhor compreender a participação de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ no contexto do pênfigo. Estas células, dentre outras funções, monitoram e suprimem a atividade e proliferação de células T autoespecíficas. Veldman *et al.* (2004) observaram que um tipo de células T reguladoras induzidas por antígeno chamadas Tr1, com expressão de IL-10 e do fator de crescimento e transformação β (ou TGF- β , do inglês *transforming growth factor β*) e específicas para Dsg3 estão em menor frequência em pacientes com pênfigo vulgar do que nos indivíduos saudáveis. Este resultado sugere que a função deficiente destas células Tr1, que segundo Veldman *et al.* (2006) têm um papel na inibição da ativação de células Th1 e Th2 Dsg3-específicas a partir da secreção de IL-10 e TGF- β , possa ser importante para o desenvolvimento da doença.

A importância dos fatores genéticos para a patogênese do pênfigo é evidenciada pela agregação familiar de indivíduos com a doença e pelos estudos de associação. Vários estudos considerando genes do sistema imune como candidatos a estarem associados ao PFE foram feitos desde o trabalho pioneiro de Petzl-Erler e Santamaria (1989), em que se encontrou, por tipagem sorológica, associação primária positiva com *HLA-DR1* e *-DR4*, e associação primária negativa com *-DQ2*. Outros estudos encontraram associações de variantes genéticas de interleucina (*IL*) 6, *IL4* (PEREIRA *et al.*, 2004), morte celular programada 1 (*PDCD1*) (BRAUN-PRADO & PETZL-ERLER, 2007), *CD40*, *CD40L*, *BLYS* (MALHEIROS & PETZL-ERLER, 2009), *CD28*, *CD86* e antígeno 4 de linfócito T citotóxico (*CTLA4*) (DALLA-COSTA *et al.*, 2010) com o PFE.

É importante também destacar a ausência de associações de variantes genéticas do fator de necrose tumoral (*TNF*), linfotóxina alfa (*LTA*) (ROXO *et al.*, 2003), *BAX* e *TP53* (KÖHLER & PETZL-ERLER, 2006) e desmogleína 1 (*DSG1*) (PETZL-ERLER & MALHEIROS, 2005) com o PFE.

Em 2009, foi concluída por Malheiros uma análise de expressão global de RNAm em células T CD4⁺ em pênfigo foliáceo, comparando as formas localizada e generalizada, pacientes com e sem tratamento, pacientes sem tratamento e controles, pacientes de PF e PV e controles. Alguns genes diferencialmente expressos são *HLA-DPB1* (superexpresso em pacientes com forma generalizada em relação aos pacientes com a forma localizada), *CD1D* (superexpresso em pacientes com forma generalizada em relação aos controles, subexpresso em pacientes com forma generalizada com tratamento em relação aos pacientes sem tratamento, superexpresso em pacientes com forma generalizada em relação aos pacientes com a forma localizada, superexpresso e compartilhado em pacientes de PF e PV em relação aos indivíduos controles e superexpresso em lesão), *BLYS* (superexpresso em pacientes com forma generalizada em relação aos controles, subexpresso em pacientes com forma generalizada com tratamento em relação aos pacientes sem tratamento e tendência de expressão diferencial em lesão), *CD40L* (superexpresso em lesão) e *CTLA-4* (superexpresso em lesão) (MALHEIROS, 2009; MALHEIROS *et al.*, manuscrito em preparação).

De forma geral, o tratamento de indivíduos com pênfigo se dá por corticoterapia que causa imunossupressão generalizada. Muito esforço tem sido empregado na busca por terapias alternativas menos agressivas. Os fatores genéticos e ambientais envolvidos na patogênese do pênfigo ainda são pouco conhecidos e menos ainda se sabe sobre a importância da interferência por RNA e dos mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA e modificação de histonas e da cromatina, na origem e/ou manutenção da doença.

2.2 A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

As células responsáveis pela resposta imune adaptativa são as células B secretoras de anticorpos antígeno-específicos e as células T CD4 e CD8. ambas diferenciadas a partir de células T virgens. As células T CD4 se diferenciam em um amplo repertório de células reguladoras e efetoras com diferentes funções na resposta imune adaptativa.

As subpopulações funcionais de células T CD4 mais bem conhecidas são chamadas de células Th1, Th2, Th17 e T reguladoras. A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de moléculas efetoras como IL-2, INF- γ e TNF- α . Já as células Th2 produzem um repertório composto por IL-4, IL-5 e IL-13. Células Th17 representam uma subpopulação efetora reconhecida mais recentemente e são caracterizadas pela produção de IL-17, e não de INF- γ e IL-4.

Por último, células T CD4 virgens ativadas podem se diferenciar também em células T reguladoras (Treg). Enquanto a maioria das células T autorreativas entra em apoptose ou permanece anérgica após a seleção negativa no timo, algumas destas células escapam para a periferia. A função das células T reguladoras é monitorar e suprimir a atividade e proliferação destas células T autoespecíficas.

O local de formação das células T reguladoras subdivide esta linhagem em naturais (nTreg) e induzidas (iTreg). Ao passo que as nTreg se desenvolvem no timo e migram, em seguida, para a periferia, as iTreg podem se formar no baço, linfonodos e locais de inflamação a partir de células T CD4 virgens.

As células Treg constituem uma subpopulação de linfócitos T CD4 que expressa constitutivamente a subunidade alfa de alta afinidade do receptor da IL-2 (IL-2R α ou CD25), sendo portanto também chamadas de células T CD4⁺CD25⁺. As células nTreg expressam também altos níveis de selectina-L (ou CD62L) e o fator de transcrição Foxp3, de expressão restrita a este tipo celular (GUPTA *et al.*, 2008). As células iTreg constituem um grupo heterogêneo que inclui diversas subpopulações de células T com diferentes propriedades e fenótipos, como as células Th3 e as células Tr1, que não expressam Foxp3. As células conhecidas como Th3, responsáveis por controlar ou impedir as respostas imunes de mucosa, produzem IL-4, IL-10 e TGF- β como seu

repertório de citocinas supressoras. Já as células Tr1 secretam IL-10 e TGF- β , mas não IL-4.

A IL-10, produzida também pelas nTreg, atua reduzindo a síntese de IL-2, IL-5 e TNF- α pelas células T e inibindo, de forma indireta, a apresentação de antígenos através da redução da expressão de moléculas MHC e de moléculas coestimuladoras das APC. Já o TGF- β , também produzido pelas nTreg, além de reduzir a produção de citocinas pelas células T, bloqueia a divisão celular e a capacidade de lisar outras células.

As células T auxiliares, isto é, os linfócitos Th1 e Th2, são requeridas para a diferenciação das células B virgens em células plasmáticas secretoras de anticorpos e em células B de memória.

Moléculas presentes na superfície das células B e Th contribuem para o sinal gerado pela ligação do MHC:peptídeo da primeira ao TCR da segunda. Entre estas moléculas estão CD40, membro da superfamília de receptores TNF e expresso pela célula B, e o seu ligante na superfície da célula T (CD40L ou CD154) membro da superfamília de ligantes de receptores TNF. A ligação do CD40 das células B ao CD40L das células Th2 é fundamental para a ativação de fases importantes das células B, como proliferação, troca de classe de imunoglobulinas e hipermutação somática.

Outra molécula da superfamília de ligantes de receptores TNF, conhecida como estimulador de linfócito B (ou BLyS, do inglês *B-lymphocyte stimulator*, também referido como BAFF ou TNFSF13B), ocorre como uma proteína de membrana e também solúvel, secretada por células dendríticas, macrófagos e células T, que se liga a diversos receptores da célula B, dentro os quais, BAFF-R, BCMA e TACI (ou TNFRSF13B). BAFF-R e TACI são importantes mediadores da troca de classe de imunoglobulinas, enquanto que BCMA fornece sinais de sobrevivência durante a diferenciação terminal da célula B (BOSSSEN & SCHNEIDER, 2006).

As células B maduras podem se diferenciar em células plasmáticas, isto é, células com elevada síntese e secreção de imunoglobulinas, ou em células B de memória, que têm vida mais longa e expressam imunoglobulinas de superfície, mas não secretam anticorpos. Estas células B de memória são responsáveis pelos

anticorpos produzidos no início da resposta secundária de anticorpos, que se diferencia da resposta primária pela baixa produção de IgM e alta produção de IgG.

2.2.1 A resposta imune adaptativa estendida ao pênfigo foliáceo

É possível distinguir pelo menos dois mecanismos imunes para a garantia da autotolerância. O mais precoce deles envolve mecanismos de tolerância central que eliminam linfócitos autorreativos recém-formados no timo. Posteriormente, linfócitos maduros autorreativos que não foram eliminados pelos mecanismos de tolerância central, por não terem tido contato com os antígenos aos quais são específicos, ou por terem tido uma interação de baixa afinidade entre MHC:peptídeo próprio e TCR, podem ser inibidos ou eliminados na periferia. Os mecanismos de tolerância periférica são a anergia, a eliminação por apoptose e a supressão por células Treg. A manifestação de patologias autoimunes pode ser compreendida pela falha na geração e manutenção da autotolerância (central e periférica, respectivamente), sendo estas falhas resultado de fatores genéticos e ambientais de predisposição.

Outro aspecto interessante e relevante de certas doenças crônicas, que incluem as doenças autoimunes, se refere ao balanço entre as respostas Th1 e Th2. Considerando que existe uma regulação cruzada entre células Th1 e Th2, isto é, que citocinas produzidas por uma podem inibir a diferenciação da outra, se uma subpopulação de células T CD4 for preferencialmente ativada, o resultado será o predomínio da resposta Th1 ou Th2 na resposta crônica em questão. Isto ocorre no pênfigo foliáceo, no qual células T reativas à Dsg1 apresentam um perfil de secreção de citocinas característico de células Th2 (MOESTA *et al.*, 2002).

Existem ainda outros indícios diretos que apontam para a participação de células Th2 na resposta autoimune característica do pênfigo foliáceo. Uma delas é dada pela participação desta subpopulação efetora na estimulação de células B, por meio de IL-4, para que estas produzam anticorpos IgG4. Este isotipo de imunoglobulina G é, como já mencionado, o mesmo que leva à manifestação do fogo selvagem. Além disso, a resposta Th1 parece estar inibida no PF, visto que pacientes têm níveis mais elevados

de IL-10, molécula responsável por inibir o perfil Th1, resultando no predomínio da resposta Th2 (revisado por KÖHLER, 2009).

Outro indício refere-se ao gene de moléculas coestimuladoras adicionais capazes de modificar o segundo sinal. Como já citado, variantes dos genes *CD40* e *CD40L* estão associadas ao PF (MALHEIROS & PETZL-ERLER, 2009). O ligante de CD40 é expresso por células Th1 e Th2 e fornece sinais para macrófagos e células B, respectivamente, através do CD40 expresso por estas. Como o pênfigo envolve a produção de autoanticorpos por células B e como a principal molécula efetora de membrana expressa pelas células Th2 é o CD40L, que se liga ao CD40 da célula B, induzindo sua proliferação e troca de isotipo, as associações genéticas descritas passam a ter uma explicação biológica que, mais uma vez, colocam a resposta Th2 como a mais provável no contexto do PF.

Contudo, dada a dinâmica do sistema imune e a complexidade das respostas autoimunes, não se pode afirmar que outras células do sistema imune adaptativo, como linfócitos T citotóxicos e Th1, não tenham um papel relevante na patogênese do pênfigo. Uma demonstração disso é o fato de algumas células T CD8 serem capazes de, além de desempenharem função citotóxica, responderem ao antígeno secretando citocinas típicas da resposta Th1 ou Th2.

2.3 GENERALIDADES SOBRE microRNA E RNA DE INTERFERÊNCIA

Os RNA não codificantes (ou ncRNA, do inglês *non coding RNAs*) são moléculas transcritas a partir do genoma e não traduzidas em polipeptídeos, permanecendo geralmente no núcleo da célula, onde exercem sua função principal de regulação da expressão gênica tanto transcricional como pós-transcricionalmente. A interferência por moléculas de RNA não codificantes que atuam transcricionalmente é considerado um mecanismo epigenético, isto é, uma mudança estável e herdável da expressão gênica ou do fenótipo celular sem que haja alterações na sequência de bases do material genético (GOLDBERG *et al.*, 2007).

Os ncRNA podem ser divididos em três grandes grupos, em função de seu tamanho. Os dois primeiros correspondem às moléculas bem conservadas entre as espécies, sendo eles (1) miRNA e siRNA e (2) RNA nucleolares pequenos (ou snoRNA, do inglês *small nucleolar RNAs*), com tamanhos entre aproximadamente 20 e 30 e 60 e 300 nucleotídeos, respectivamente. O terceiro grupo é representado pelos RNA não codificantes longos, com pouca conservação e comprimento médio de 2 mil pares de bases (revisado por PANG *et al.*, 2007). Outros critérios, como origem, estrutura, proteínas efetoras associadas e função biológica, reduzem os limites entre os grupos de ncRNA e dificultam sua classificação (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

Apesar de miRNA e siRNA constituírem um único grupo de ncRNA em função de seu tamanho, estrutura, biogênese e mecanismo de ação semelhantes e ampla distribuição filogenética e fisiológica, eles podem ser diferenciados principalmente em função da origem das moléculas: enquanto os miRNA são tidos como endógenos, ou seja, como produtos do genoma do próprio organismo, os siRNA são considerados primariamente de origem exógena, sendo derivados diretamente de vírus, transposons ou transgenes (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

2.3.1 Breve histórico sobre microRNA

Os microRNA foram descobertos no início da década de 1990 em *Caenorhabditis elegans*, tendo sido sugerido um modelo molecular em que a tradução em proteína do RNAm lin-14 era inibida pela ligação de uma pequena molécula de RNA à extremidade 3'UTR do RNAm de lin-14 (LEE *et al.*, 1993). Este pequeno RNA, conhecido como lin-4, possui múltiplos sítios de complementaridade com lin-14 importantes para a regulação de sua transcrição, sendo responsável por diminuir os níveis de proteína LIN-14 sem alterar de forma detectável a quantidade do RNAm (LEE *et al.*, 1993; WIGHTMAN *et al.*, 1993). Quanto ao aspecto funcional, os mesmos autores mostraram que a repressão pós-transcricional de lin-14 por lin-4 compõe parte da via de regulação de transição do primeiro para o segundo estágio larval de *C. elegans*.

Durante sete anos, até o final da década de 1990, não havia evidências de outras moléculas não-codificantes semelhantes a lin-4 tanto em nemátodes, quanto em outros organismos. No entanto, a descoberta de let-7, novamente em *C. elegans*, que atua na transição do estágio larval tardio para o estágio adulto inicial (REINHART *et al.*, 2000), e a sua existência e de outros genes homólogos no genoma humano, de *Drosophila* e de outros doze animais bilaterais (PASQUINELLI *et al.*, 2000), permitiu supor que os miRNA, como uma classe, deveriam ter funções reguladoras amplas em muitas espécies diferentes.

Inicialmente referidos como RNA temporais pequenos (ou stRNA, do inglês *small temporal RNAs*), devido ao seu papel em etapas do desenvolvimento embrionário de *C. elegans*, o termo microRNA só foi cunhado em 2001, em três trabalhos publicados simultaneamente no volume 294 da revista científica *Science* (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LEE & AMBROS, 2001; LAU *et al.*, 2001). Nesta ocasião, os autores descreveram, no total, mais de cem novos genes de miRNA em vertebrados e invertebrados e de forma geral os consideraram amplamente conservados entre as espécies estudadas (humanos, *Drosophila* e *Caenorhabditis*). Entretanto, notaram que estes novos miRNA não necessariamente eram expressos em diferentes momentos do

desenvolvimento embrionário, mas principalmente que eram expressos por diferentes tipos celulares de uma espécie.

Desde então, uma série de novos trabalhos utilizando técnicas de clonagem revelaram numerosos novos genes para miRNA em mamíferos, peixes, helmintos, insetos e plantas. Com isso, a necessidade de catalogar a informação e facilitar a atribuição de nomes a novos miRNA levou ao desenvolvimento de um banco de dados de microRNA – o miRNA Registry, atualmente conhecido como miRBase (GRIFFITHS-JONES, 2004).

2.3.2 Aspectos genômicos

Em diversas espécies, a distribuição dos genes de microRNA predomina em regiões relativamente distantes de genes previamente anotados, sugerindo que eles derivam de unidades de transcrição independentes (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LEE & AMBROS, 2001; LAU *et al.*, 2001). Por outro lado, uma minoria significativa destes miRNA tem suas sequências codificadas em introns de pré-RNAm, não possuindo um promotor próprio. Nestes casos, é esperada uma expressão coordenada de um miRNA e uma proteína derivados do mesmo pré-RNAm, compondo um cenário de regulação mais simplificado (revisado por BARTEL, 2004). Contudo, se coexpressos, tanto o RNAm quanto o miRNA teriam a mesma orientação, o que não se observa na prática. Em outras palavras, o que de fato acontece, pelo menos em *C. elegans*, é a expressão independente dos miRNA de regiões intrônicas em relação aos RNAm previstos (LAU *et al.*, 2001).

Os miRNA podem também estar distribuídos formando agrupamentos (em inglês, *clusters*), isto é, grupos de microRNA dispostos à jusante um do outro, sendo expressos como um transcrito primário policistrônico (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001). Embora existam vários exemplos de *clusters* de miRNA no genoma humano e de *C. elegans*, nestes os microRNA estão distribuídos em sua maioria de forma isolada e não agrupada. Já em *Drosophila*, mais da metade dos miRNA está organizada em *clusters* (ARAVIN *et al.*, 2003).

No que diz respeito à expressão dos microRNA, é razoável propor que, em função do número de genes já conhecidos e dos diferentes padrões de expressão estabelecidos por estudos de transcriptômica, cada tipo celular tenha, em determinada etapa do desenvolvimento embrionário ou tecidual, um perfil distinto de microRNA, resultado não apenas da expressão ou não-expressão de certas moléculas, mas também da abundância destas num dado momento (BARTEL, 2004).

Um grande questionamento entre os especialistas em microRNA é a demora para sua descoberta, uma vez que a resposta definitivamente não está na raridade destas moléculas. Pelo contrário, os miRNA e proteínas associadas são aparentemente um dos complexos ribonucleoproteicos mais abundantes da célula. Assim, alguns autores sugerem dificuldades técnicas de transcriptômica, como a clonagem não otimizada para capturar microRNA (BARTEL, 2004), enquanto outros apontam para aspectos da estrutura destas moléculas, como a falta de um quadro aberto de leitura (ou ORF, do inglês *open reading frame*) que permitisse identificar um candidato a gene (LAU *et al.*, 2001). Várias hipóteses existem, mas nenhuma ainda responde satisfatoriamente esta questão.

2.3.3 Biogênese

Assim como genes codificadores de proteínas, snoRNA e RNA nucleares pequenos (ou snRNA, do inglês *small nuclear RNAs*) que compõem o spliceosoma, os genes de miRNA e siRNA são ativados por fatores de transcrição e transcritos pela RNA polimerase II. Menos frequentemente, os microRNA podem ser transcritos pela RNA polimerase III, da mesma forma que alguns snRNA são produtos desta enzima (revisado por BARTEL, 2004).

Desta forma, o primeiro passo é a transcrição do microRNA em um transcrito primário (ou pri-miRNA, do inglês *primary miRNA*), com comprimento podendo chegar a alguns quilobases, onde há a formação de estruturas secundárias no caso de complementaridade entre sequências da fita simples do pri-miRNA. A estrutura secundária mais importante é o *stem-loop* (haste-laço), ou simplesmente grampo,

gerado por duas regiões complementares do pri-miRNA, com a formação de duas regiões sem pareamento chamadas de haste (do inglês *stem*) e laço (do inglês *loop*) (FIGURA 3) (revisado por SUN & TSAO, 2008).

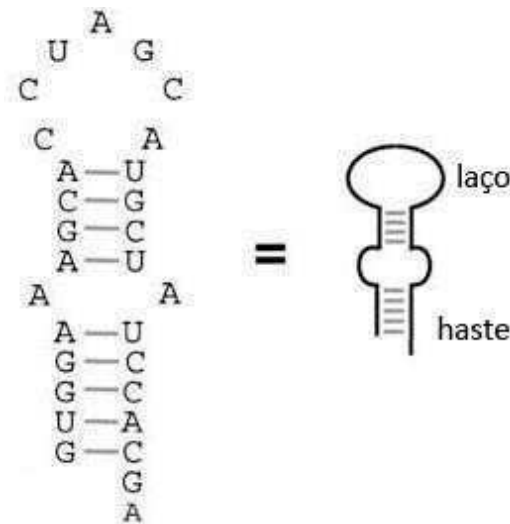


FIGURA 3 – Estrutura do grampo intramolecular do pri-miRNA, com detalhe para uma sequência hipotética e sua correspondente estrutura secundária chamada laço-haste (do inglês *stem-loop*) (adaptado de SUN & TSAO, 2008).

O grampo intramolecular é reconhecido, no núcleo, por um complexo protéico que inclui a enzima Drosha (uma RNaseIII), cuja função é excisar o grampo do restante da estrutura do pri-miRNA. Este grampo excisado de aproximadamente 60 nucleotídeos é chamado de microRNA precursor (ou pre-miRNA, do inglês *precursor miRNA*), composto pelo laço, por uma sequência de RNA fita dupla de aproximadamente 20 pares de base (pb) e por uma saliência de 2 nucleotídeos na extremidade 3'. Os pre-miRNA são reconhecidos por uma proteína que os transfere do núcleo para o citoplasma (FIGURA 4) (revisado por SUN & TSAO, 2008).

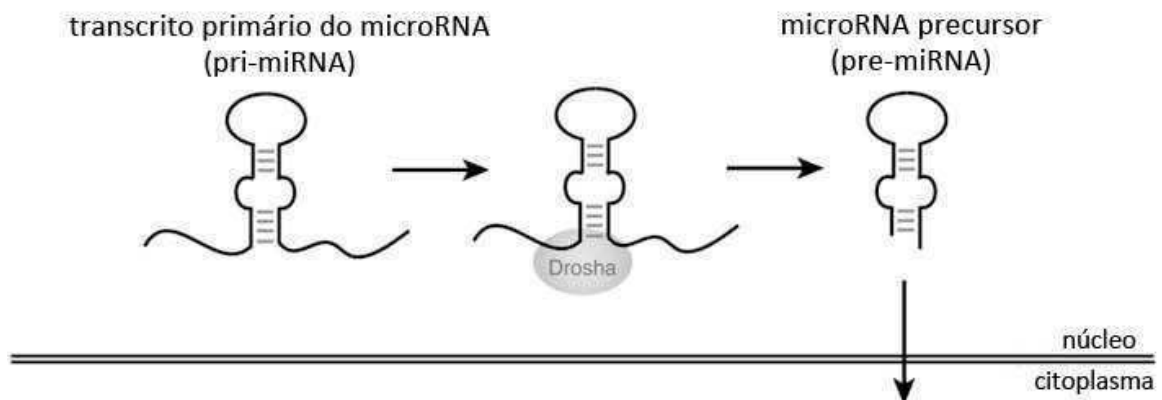


FIGURA 4 – Processamento do pri-miRNA pela enzima Drosha (adaptado de SUN & TSAO, 2008).

No citoplasma, os pre-miRNA são processados pela enzima Dicer (também uma RNaseIII) que remove o laço, deixando apenas o RNA dupla fita (formado pelo pareamento miRNA:miRNA*) de aproximadamente 20 pb. A molécula é então capturada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (ou RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), onde ocorre a separação das duas fitas, sendo uma (miRNA*) dissociada e posteriormente degradada e outra (miRNA) permanecendo associada ao RISC. O miRNA é o elemento que reconhecerá o RNAm alvo e determinará a inibição da transcrição através de dois mecanismos distintos dependendo do grau de complementaridade miRNA:RNAm. Se o pareamento for perfeito, o RNAm será clivado pela subunidade Argonaute (ou Ago) do RISC. Se o pareamento for imperfeito, o RISC apenas inibirá o processo de tradução do RNAm (FIGURA 5). Os componentes da via dos miRNA se sobrepõem aos do siRNA a partir da etapa de clivagem pela Dicer e apenas um subtipo de Argonaute de mamíferos, a Ago2, é capaz de levar à clivagem do RNAm localizado no RISC, isto é, somente Ago2 possui atividade de nuclease (revisado por SUN & TSAO, 2008).

A “escolha” de qual fita do *duplex* de RNA será incorporada ao RISC se deve principalmente a relativa estabilidade das extremidades da molécula. Tanto para *duplex* de siRNA quanto de miRNA, a fita que entrará no complexo de silenciamento será aquela cuja extremidade 5' possui pareamento mais fraco. Nos casos em que a estabilidade das duas porções 5' é semelhante, espera-se que haja incorporação de

ambas as fitas em diferentes RISC, evento este mais raro e observado em alguns vertebrados e insetos (revisado por BARTEL, 2004).

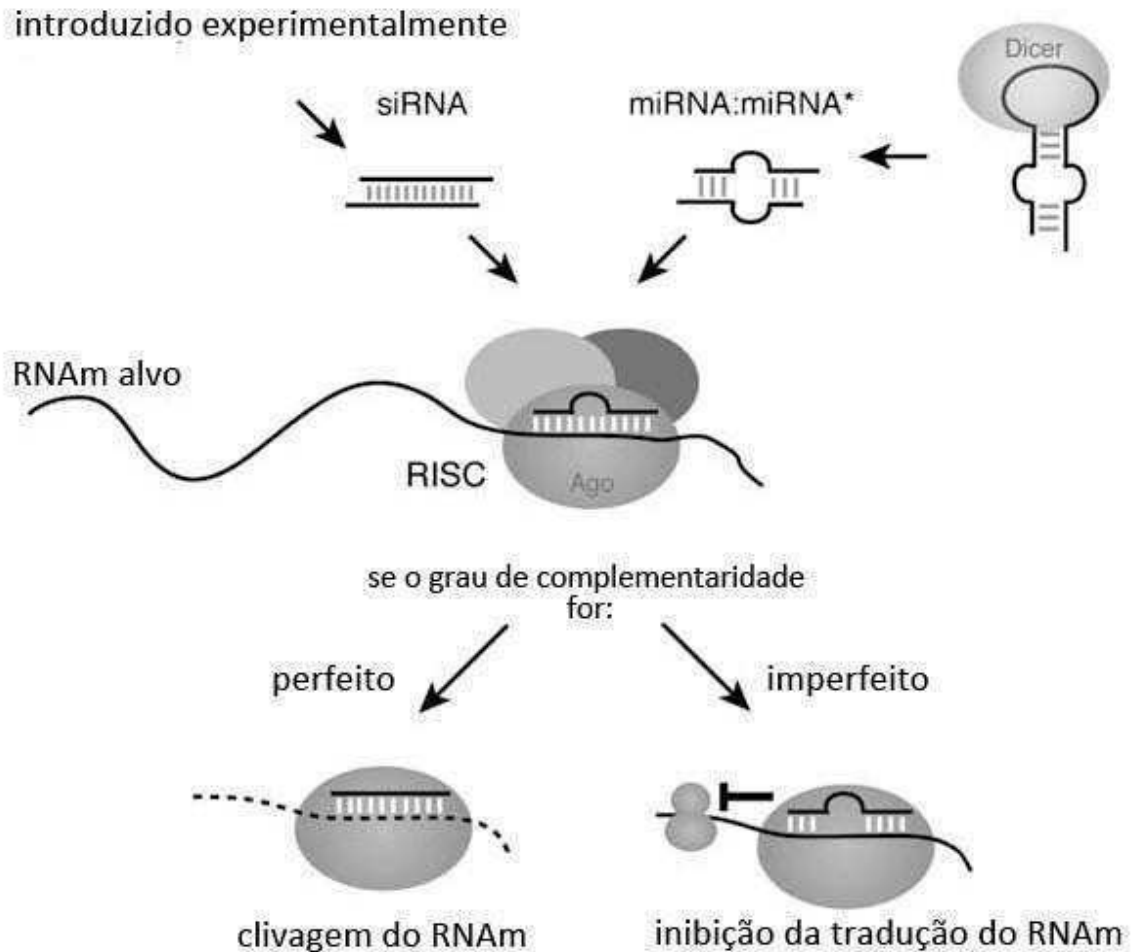


FIGURA 5 – Processamento do pre-miRNA pela enzima citoplasmática Dicer, com formação de um miRNA maduro capaz de reconhecer um ou mais RNAm e regulá-los pós-transcricionalmente (adaptado de SUN & TSAO, 2008).

2.3.4 Mecanismos de controle da expressão gênica

Como comentado anteriormente, o mecanismo pelo qual os miRNA e siRNA impedem a tradução do RNAm alvo dependerá do grau de complementaridade entre estas moléculas: se o pareamento for perfeito, o RNAm será clivado; se o pareamento for imperfeito, o processo de tradução do RNAm será inibido.

Quando há clivagem, o ponto de corte é exatamente entre os resíduos do RNAm pareados com os nucleotídeos 10 e 11 do miRNA ou siRNA. Após a clivagem, estes permanecem intactos e podem direcionar o reconhecimento e processamento de novos transcritos (revisado por BARTEL, 2004).

Já a inibição da tradução pode ocorrer de duas maneiras distintas: em uma delas, a velocidade de tradução é drasticamente reduzida ou totalmente interrompida logo após a iniciação, como resultado da interferência sobre o deslocamento dos ribossomos sobre o RNAm; enquanto que na outra situação, não há interferência sobre a velocidade de tradução, que prossegue normalmente, mas produz polipeptídeos não terminados que são em seguida degradados (revisado por BARTEL, 2004).

Um aspecto interessante deste último mecanismo é que a ação de múltiplos RISC sobre um único RNAm torna mais eficiente a inibição da tradução, o que explica a existência de diversos transcritos com dois ou mais sítios, na região 3'UTR, complementares a microRNA (revisado por BARTEL, 2004).

O inverso também é verdadeiro, ou seja, um único microRNA é capaz de controlar de dezenas a centenas de genes. E isto é possível em função da especificidade da sua sequência, assim como através de outras características intrínsecas ao RNAm, como composição da porção rica em AU próxima ao sítio de ligação do miRNA, proximidade a sítios para miRNA coexpressos, proximidade a resíduos pareando com os nucleotídeos 13 a 16 do miRNA, posicionamento na 3'UTR a pelo menos 15 nucleotídeos do códon de parada da tradução e posicionamento distanciado do centro dos UTR (GRIMSON *et al.*, 2007). Além disso, em mamíferos a complementaridade miRNA:RNAm tende a ser imperfeita, à exceção de uma região integralmente complementar entre os resíduos 2 e 9 na extremidade 5' do miRNA conhecida como sequência *seed* (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

Esta sequência *seed*, que inclui pelo menos os resíduos de 2 a 8, é característica de praticamente todos, se não todos, os miRNA de vertebrados e invertebrados, e mal-pareamentos nesta região podem impedir o reconhecimento inicial do alvo, prevenindo a clivagem ou repressão da tradução, independentemente do grau de complementaridade fora desta segmento. Sugere-se assim que, havendo pareamento suficiente, mas não necessariamente total, fora da sequência *seed*, a

clivagem seguirá. Entretanto, o pareamento da região *seed* complementado com apenas alguns pareamentos ao redor parece ser o suficiente para mediar a repressão da tradução, havendo outros RISC associados ao RNAm (LEWIS *et al.*, 2003).

Outra peculiaridade dos microRNA é o fato de alguns terem sítios de complementaridade em regiões codificadoras de RNAm. Além disso, novas evidências sugerem que miRNA podem também regular positivamente a expressão gênica através da ligação à sequências reguladoras, caracterizando um novo mecanismo conhecido como ativação por RNA (PORTNOY *et al.*, 2011).

2.3.5 Distinção entre miRNA e siRNA

Por compartilharem boa parte da via de biogênese e poderem atuar de forma intercambiável, miRNA e siRNA não podem ser distinguidos quanto a composição química ou mecanismo de ação. Contudo, algumas diferenças existem quanto à origem, conservação evolutiva e tipos de genes que regulam.

Ao passo que os microRNA geralmente derivam de regiões genômicas independentes, os siRNA são oriundos de RNAm, transposons, transgenes, vírus ou DNA heterocromático. Em segundo lugar, os miRNA são processados a partir de sequências de RNA que podem formar estruturas secundárias como os grampos intramoleculares, enquanto os siRNA são formados a partir de longas moléculas de RNA dupla-fita ou de longos grampos de RNA. Terceiro, uma única molécula de miRNA é gerada a partir de um pre-miRNA, ao passo que várias moléculas de siRNA podem ser formadas a partir de um longo precursor de siRNA. Por último, os microRNA são geralmente conservados em várias espécies próximas, enquanto siRNA endógenos raramente exibem conservação (AMBROS *et al.*, 2003; BARTEL, 2004).

Pode-se somar a estas diferenças a hipótese de que os miRNA regulam genes diferentes dos quais lhes deram origem, enquanto siRNA tipicamente silenciam os mesmos locos ou locos muito similares a eles (BARTEL, 2004).

2.3.6 Nomenclatura e alvos

Para a nomenclatura dos microRNA, são usados como prefixo 3 ou 4 caracteres para designar a qual espécie pertence. Por exemplo, para os humanos (*Homo sapiens*), o prefixo é “hsa”, como em hsa-miR-101. As sequências maduras são designadas “miR”, ao passo que as sequências precursoras são chamadas de “mir”. Para sequências parálogas cujos miRNA diferem em apenas uma ou duas posições, um caractere é usado como sufixo, por exemplo em hsa-miR-146a e hsa-miR-146b. Grupos diferentes que dão origem a miRNA maduros idênticos são diferenciados por um número como sufixo, por exemplo dme-mir-281-1 e dme-mir-281-2 em *D. melanogaster*. Quando dois miRNA maduros são originados do mesmo pre-miRNA pela excisão e manutenção de ambas as fitas, um sufixo 5p ou 3p é adicionado para indicar que o miRNA corresponde à fita da região 5' ou 3' do grampo, respectivamente (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006).

Uma vez que a maioria dos microRNA em seres humanos já foi identificada, pesquisadores têm se interessado em caracterizá-los funcionalmente, o que significa, entre outros, identificar os alvos destas moléculas. Nesse sentido, o uso de programas disponíveis na *Internet*, por exemplo TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) e Miranda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), tem sido fundamental para prever possíveis RNAs alvos de um microRNA (TSAI & YU, 2010).

2.3.7 MicroRNA no desenvolvimento biológico

Estudos em camundongos *knockout* para a enzima Dicer, o que impede a produção de todos os miRNA maduros, têm revelado a importância destas pequenas moléculas para o desenvolvimento biológico global dos organismos e o papel em tecidos e órgãos específicos. Dois estudos recentes com *knockouts* Dicer para células da epiderme começaram a revelar a importância dos miRNA para a integridade da pele. Nestes camundongos, uma série de defeitos anatômicos e moleculares dos

folículos pilosos foi observada. Além disso, observou-se a ausência de células-tronco dos folículos pilosos, sugerindo um papel direto ou indireto dos miRNA na formação ou manutenção desta população celular (revisado por SUN & TSAO, 2008).

A importância de alguns miRNA para certos tecidos também já foi investigada. Mir-203, por exemplo, mostrou-se um microRNA fundamental para a diferenciação epitelial de camundongos (YI *et al.*, 2008). Sabe-se também que os miRNA são elementos-chave para a diferenciação de subtipos de células do sistema imune, assim como para suas funções imunológicas (revisado por LU & LISTON, 2009).

2.4 RNA NÃO-CODIFICANTE NA PATOFISIOLOGIA E TERAPIA DE DOENÇAS HUMANAS

Devido ao importante papel dos microRNA na regulação da diferenciação e proliferação celular, é de se esperar que uma alteração significativa de seus padrões de expressão esteja associada a diversas doenças, como o câncer e distúrbios autoimunes.

No câncer, certas alterações genômicas estão associadas a diversos tipos de tumores. Com a descoberta dos microRNA, acredita-se que algumas destas associações sejam com genes codificadores de miRNA, podendo estes atuarem como supressores de tumor ou como oncogenes (revisado por SUN & TSAO, 2008).

Uma vez que há associação entre os níveis de expressão anormais de vários microRNA e algumas doenças humanas, têm-se duas estratégias terapêuticas principais baseadas em miRNA: uma delas é restaurar os níveis de miRNA com expressão reduzida, enquanto a outra é atenuar miRNA superexpressos (TSAI & YU, 2010).

Outra estratégia na qual muito tem se investido se utiliza da própria via de biogênese e ação dos miRNA e é chamada de RNA de interferência. Neste caso, sabendo-se que a redução ou o aumento de expressão de um gene específico numa dada doença possa ser um alvo terapêutico, é possível inserir, nas células afetadas, siRNA artificiais, que atuam de forma semelhante aos miRNA, com capacidade de se ligar ao RNAm do gene alvo de terapia e, assim, restabelecer os níveis de expressão considerados normais. Entretanto, uma preocupação atual é quanto à entrega correta, segurança e eficácia da terapia mediada por siRNA (SUN & TSAO, 2008).

2.4.1 MicroRNA e o sistema imune

Apesar do conhecimento do efeito de um conjunto de microRNA ou de microRNA individuais em processos celulares estar no princípio, já sabe-se que estes têm um papel fundamental no sistema imune inato e adaptativo, onde participam da

diferenciação inicial de células B e de sua diferenciação após o contato com o antígeno, em células plasmáticas ou de memória, da regulação das vias de indução de linhagens de células T e da indução, função e manutenção de uma linhagem de células T reguladoras (Figura 6) (LU & LISTON, 2009).

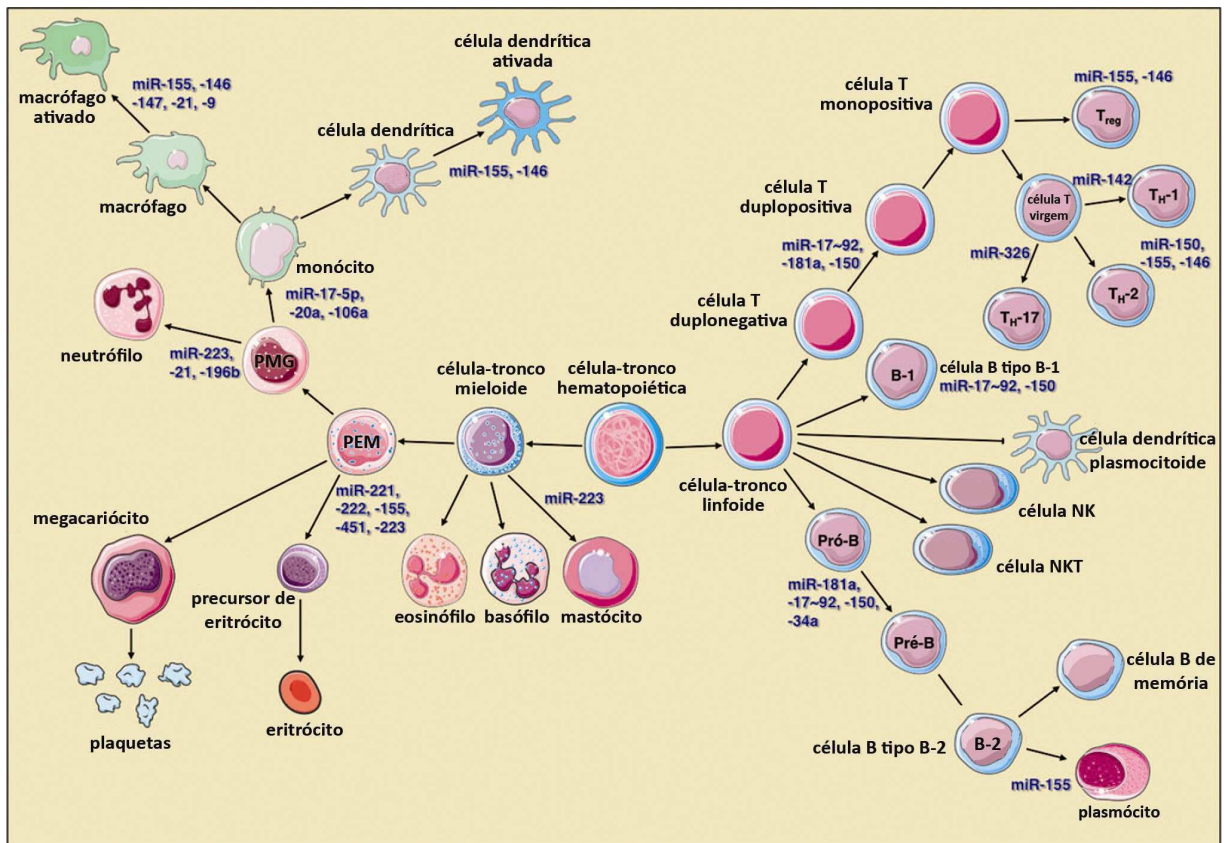


FIGURA 6 – Esquema da participação dos microRNA na hematopoiese e no desenvolvimento e função das células do sistema imune (adaptado de ANGLICHEAU *et al.*, 2010).

Em células T, o *cluster* miR-17~92 parece ter importância para a expansão de células T CD4⁺ e CD8⁺, uma vez que a ausência deste microRNA esteve associado a uma perda de células T no timo e no sistema imune periférico. MiR-181 mostrou ser capaz de aumentar a sensibilidade da sinalização pelos receptores de células T. Nos órgãos linfóides periféricos, o papel dos miRNA é mais óbvio, tendo uma tarefa importante na geração de diferentes linhagens de células Th. Enquanto a deficiência de miR-155 promoveu a indução para Th2 em condições não-polarizantes, células T deficientes para Dicer exibiram uma indução preferencial para Th1, com significativa

redução de indução para Th17. Em termos de função de células T, a ausência de miR-101 causou o aumento da expressão do coestimulador de células T induzível (ou ICOS, do inglês *inducible T-cell co-stimulator*) em células T virgens, levando a um fenótipo semelhante ao de células T efectoras e resultando em autoimunidade. Em células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, miR-155 é diretamente regulado por Foxp3 e é crítico para a manutenção da resposta destas células ao fator de sobrevivência e crescimento IL-2 (revisado por LU & LISTON, 2009).

Quanto às células B, notou-se que a ausência do miR-17~92 induz o aumento de expressão de uma molécula pró-apoptótica resultando em bloqueio da transição de células pró-B para pré-B. De forma similar, miR-181 se mostrou um regulador positivo da diferenciação de células B. Mir-150, além de também afetar a diferenciação inicial de células B, é considerado importante para a resposta de células B maduras. Já miR-155 parece controlar aspectos da biologia de células B, como a mudança de classe de imunoglobulinas (revisado por LU & LISTON, 2009).

2.4.2 MicroRNA e doenças autoimunes

O panorama apresentado leva a crer que uma regulação apropriada por miRNA é necessária para a prevenção de autoimunidade e para o estabelecimento de funções imunes normais. Diversos trabalhos sobre as doenças autoimunes mais estudadas têm sugerido que uma desregulação dos microRNA pode ser importante para a patogênese de doenças autoimunes humanas.

Em lupus eritematoso sistêmico (LES), uma doença caracterizada pela presença de autoanticorpos contra inúmeros autoantígenos, como cromatina, ribonucleoproteínas e fosfolipídeos, observou-se, por meio de análise global por microarranjos, a expressão diferencial de 16 microRNA em células mononucleares de sangue periférico de pacientes em relação aos controles. Alguns destes microRNA foram miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-383 e miR-384, todos superexpressos, e miR-21, miR-142-3p, miR-342, miR-299-3p e miR-198, todos subexpressos (DAI *et al.*, 2007). Os autores deste trabalho também observaram diferenças de expressão de

microRNA entre subgrupos de pacientes de acordo com o nível de atividade da doença.

Tang *et al.* (2009) analisaram o perfil de expressão de 156 microRNA em pacientes de LES e controles. Como resultado principal, observaram que miR-146a tem sua expressão reduzida em até 6 vezes em pacientes em relação aos controles. Análises posteriores mostraram que a subexpressão de miR-146a correlacionou negativamente com o nível de atividade clínica da doença e com os valores de interferon tipo I em pacientes.

A artrite reumatóide (AR), por sua vez, é um distúrbio caracterizado por inflamação crônica do tecido sinovial, resultando em dano irreversível à articulação. Diversos estudos sobre expressão de microRNA já foram realizados em AR, sendo alguns dos resultados mais importantes: superexpressão de miR-155 e miR-146a em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR em relação aqueles de pacientes com osteoartrite (OA) (STANCZYK *et al.*, 2008); superexpressão de miR-155 (STANCZYK *et al.*, 2008) e miR-146a (NAKASA *et al.*, 2008) em tecido sinovial de pacientes com AR em relação aqueles de pacientes com OA; superexpressão de miR-155, miR-146a, miR-132 e miR-16 em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AR em relação aos controles saudáveis (PAULEY *et al.*, 2008); e superexpressão de miR-150 e miR-146a, que correlacionou positivamente com os níveis do fator de necrose tumoral (TNF) α , e subexpressão de miR-21 em células T CD4⁺ do tecido sinovial em relação ao mesmo tipo celular do sangue periférico de indivíduos controle (LI *et al.*, 2010).

Quanto à esclerose múltipla (EM), Junker *et al.* (2009) observaram expressão aumentada de miR-155 e outros microRNA em lesões ativas e astrócitos de pacientes. Analisando a expressão de 365 microRNA em diferentes subtipos de linfócitos de pacientes de remissão-recidiva de EM, Lindeberg *et al.* (2010) relataram superexpressão de miR-17-5p em células T CD4⁺ de pacientes em relação aos controles, o que correlacionou com alterações de expressão de potenciais genes-alvo de miR-17-5p.

Em diabetes tipo 1, uma análise global de miRNA mostrou expressão aumentada de miR-510 e reduzida de miR-342 e miR-191 em células T reguladoras de pacientes em relação ao controles (HEZOVA *et al.*, 2010).

Zibert *et al.* (2009) investigaram as interações entre miRNA e RNAm em lesão e tecido sadio de pacientes com psoríase em relação à pele de controles sadios. Além da superexpressão de 42 microRNA e da subexpressão de outros 5 na lesão de pacientes em comparação com a pele de controles sadios, observou-se que alguns microRNA, como miR-21, miR-221 e miR-222, têm como possíveis alvos RNAm envolvidos em crescimento celular, proliferação, apoptose e degradação da matriz extracelular.

Considerando genes diferencialmente expressos e variantes associadas ao PF, utilizou-se um programa de predição de alvos de microRNA para a escolha de um conjunto de miRNA candidatos a regulação de tais genes em PF. Em seguida, alguns critérios arbitrários foram usados para a obtenção de um conjunto menor de miRNA candidatos (APÊNDICE). À exceção de miR-155, escolhido a partir da sua importância em várias doenças autoimunes e para o sistema imune, todos os microRNA analisados neste trabalho foram obtidos através da abordagem resumida neste parágrafo e datalhada na seção Apêndice.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente evidência do papel dos microRNA em doenças autoimunes e a natureza da resposta imune adaptativa do PF, onde células T reguladoras estão presentes e células Th2 autorreativas são necessárias para a estimulação de linfócitos B produtores de autoanticorpos IgG, levantamos a hipótese de que uma alteração do padrão de expressão de certos microRNA nessas células esteja envolvida no desenvolvimento e manifestação da doença autoimune PF.

Dessa forma, no presente trabalho objetivamos investigar se o padrão de expressão de microRNA candidatos está associado ao PF.

Para atingir este objetivo, pretendeu-se:

- I. estabelecer um protocolo de obtenção, a partir de sangue periférico, de células B CD19⁺ de memória expressando IgG de superfície, células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e células Th2 CD4⁺CD294⁺, visando quantificar estas subpopulações em pacientes com PF e em controles sadios;
- II. verificar se há diferença significativa entre os níveis de expressão dos microRNA candidatos miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p e miR-1321 nas subpopulações celulares mencionadas em I obtidas de pacientes com PF e de controles sadios;
- III. estender a análise sugerida em II, para pacientes de PF com e sem lesão ativa sob tratamento imunossupressor;
- IV. interpretar os resultados obtidos no contexto do conhecimento dos processos celulares imunes envolvidos na patogênese do pênfigo foliáceo e dos fatores genéticos de predisposição já descritos.

É importante destacar que, por ser uma doença complexa em que fatores genéticos e ambientais estão envolvidos, os mecanismos autoimunes que resultam no pênfigo ainda são pouco conhecidos. Não há registros de estudos sobre a análise de microRNA em qualquer forma de pênfigo. Assim, este estudo é relevante e urgente, e poderá contribuir para o seu entendimento, ampliando os possíveis alvos de terapias alternativas para a doença.

4 ARTIGOS

Decreased frequency of circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the autoimmune disease pemphigus foliaceus

Authors and Affiliations

Gabriel Adelman Cipolla¹, Reginaldo Vieira de Sene¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹ Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Corresponding author

Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler
Departamento de Genética
Universidade Federal do Paraná
Caixa Postal 19071
81531-990 Curitiba, Brazil
Tel: (+5541) 33611746; 3611724
Fax: (+5541) 33611793
e-mail: gabriel.cipolla@ufpr.br; perler@ufpr.br

Abstract

Natural regulatory T cells express the CD25 molecule and Foxp3 transcription factor constitutively and represent an important CD4⁺ T cell subpopulation with suppressive functions. These cells have been implicated in many autoimmune diseases, including pemphigus vulgaris, but have not yet been studied in pemphigus foliaceus, a disease of

the skin characterized by the production of autoantibodies against adhesion proteins. We aimed to analyze the proportion of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with pemphigus foliaceus. We found that this subpopulation is significantly reduced in patients with active disease in relation to healthy controls ($P = 0.02$) and patients with inactive disease ($P = 0.03$). Moreover, we detected a tendency for lower expression of Foxp3 in patients with active disease, suggesting that this suppressive T cell subpopulation must be even less frequent in the disease. Interestingly, Th2 cells and IgG expressing memory B cells, potential targets of regulatory T cells, were more frequent in patients with active disease. Together, these results suggest that a quantitative impairment of regulatory T cells is associated with pemphigus foliaceus pathogenesis, highlighting the importance of these cells for maintenance of self-tolerance.

Keywords: regulatory T cells, CD25 molecule, Foxp3, pemphigus foliaceus.

Introduction

Pemphigus refers to a set of complex autoimmune blistering diseases in which adhesion proteins, namely desmosomal glycoproteins (desmogleins), are the target of autoantibodies. As a result of this primary pathogenic process occurs loss of cell-cell adhesion (acantholysis) and intraepidermal blisters and/or mucosal erosions are typically seen in patients [Diaz *et al.*, 1989; Groves, 2009]. Pemphigus foliaceus (PF) is characterized by class G immunoglobulin (IgG) autoantibodies directed against the extracellular domains of desmoglein 1 (Dsg1), restricted to the upper skin layers, resulting in epidermal blister formation and superficial erosions [Groves, 2009; Harman *et al.*, 2001]. In Brazil, PF reaches its highest incidence, hence being named as endemic pemphigus foliaceus, popularly known as *fogo selvagem*, with apparently no difference other than its epidemiology from the idiopathic form of PF present in North America and Europe [Diaz *et al.*, 1989].

Regulatory T cells (Treg) consist of a highly heterogeneous population of CD4⁺ T cells that share their ability to insure peripheral tolerance by metabolic disruption, cytolysis, modulation of dendritic cells or by secretion of inhibitory cytokines [Mellanby *et al.*, 2009]. Treg are commonly classified as natural (nTreg) or induced (iTreg). nTreg cells express constitutively CD25, the alpha chain of the high-affinity IL-2 receptor (IL-2R α), hence being referred to as CD4⁺CD25⁺ Treg. These cells also express high levels of the transcription factor Foxp3 and suppress immune responses by secreting IL-10, TGF- β and IL-35. To date, CD4⁺CD25⁺ Treg cells are known to play an important role in many autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, where commonly their frequencies and/or function are impaired in patients in relation to controls [Kuhn *et al.*, 2009].

Regarding autoimmune skin blistering diseases little is known about the role of Treg in their pathogenesis. In bullous pemphigoid, where components of the basement membrane zone are targeted as autoantigens, a detailed study did not reveal reduced frequency or function of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg [Rensing-Ehl *et al.*, 2007]. Otherwise, the authors reported that the number and function of these cells were similar in untreated patients and healthy controls. In contrast, two studies verified that the proportion of Treg is reduced in peripheral blood of patients with pemphigus vulgaris (PV) when compared to the control groups [Alecu *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2007]. In PF, no data is available regarding frequency or function of Treg.

Considering the growing evidence for the role of Treg in autoimmune diseases, including PV, and their crucial role for maintenance of self-tolerance, we aimed to verify if PF pathogenesis and/or control is associated with a quantitative impairment of CD4⁺CD25⁺ Treg.

Material and Methods

Patients and controls

We studied 18 subjects, 6 patients with active lesions (aPF), 4 patients with inactive disease (iPF) characterized by a recent disease activity and beginning of remission, 3 long-term remitting patients (REM), and 5 healthy controls (CTL). All patients were properly diagnosed by clinical and laboratory tests, among which histopathological and/or immunohistochemistry analysis of skin lesion biopsies were included. All patients, except for the remitting group, were under corticosteroid treatment at the time of blood collection. Most patients were accessed at the Hospital Adventista do Pênfigo, in the city of Campo Grande, Brazil.

Isolation of Th2, Treg and surface IgG expressing memory B cells

Forty ml of peripheral blood were collected by venipuncture from each subject. One day after blood collection, the material was processed for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) according to manufacturer's manual. Dead cells were magnetically removed with the Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by separation over a MACS Column. The live cell fraction was then labeled with anti-CD4 microbeads from the CD4 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec), as a first positive selection parameter. CD4⁺ T cells were retained on a MACS Column and recovered for a second magnetic labeling with anti-PE microbeads that bind to the anti-CD294 (CRTH2)-PE of the CD294 (CRTH2) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) previously incubated together with the anti-CD4 microbeads. This CD4⁺ T cell fraction was then set on a new MACS Column for positive selection of CD4⁺CD294⁺ Th2 cells. The depleted fraction of Th2 cells was labeled with anti-CD25 microbeads, CD25 MicroBeads II (Miltenyi Biotec), for the positive selection of CD4⁺CD25⁺ Treg. The CD4⁻ fraction obtained initially was processed simultaneously for the isolation of surface IgG expressing memory B cells. This consisted of a positive selection using anti-CD19

microbeads from the CD19 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec), followed by the labeling with anti-IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec) as a second selection parameter. Aliquots of all cell fractions of interest from each subject were counted manually and analyzed through flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences) to evaluate the purity of the sorted subpopulations.

RNA extraction and FOXP3 qRT-PCR

RNA was extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to manufacturers' protocol. RNA quality and concentration were assessed by UV absorbance. For each reverse transcription reaction, 100ng of the RNA sample depleted of microRNAs was used. RNA qRT-PCR was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Gene Expression Master Mix, and TaqMan Gene Expression Assay primers for *FOXP3* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RNA levels were normalized to beta-glucuronidase (*GUSB*). All reactions were performed in duplicates (Mastercycler Realplex 2S, Eppendorf).

Statistical analysis

The cycle threshold (Ct) values, corresponding to the PCR cycle number at which fluorescence emission reaches a threshold above baseline emission, were determined and the relative RNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [Livak & Schmittgen, 2001].

For evaluation of the data derived from quantification of cell fractions and quantitative RT-PCR, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney nonparametric tests were performed, in order to compare all samples together and samples taken two by two, respectively. Analyses were done using GraphPad Prism software version 5.04. *P* values less than 0.05 were adopted as the significance limit. Statistical analysis with a one-tailed *P* value was performed in all cases.

Results

CD4⁺CD25⁺ Treg are less frequent in peripheral blood of patients with active PF than in healthy controls and patients with inactive disease

After magnetic cell sorting, subpopulations of B and T cells were counted manually and values were compared by the Mann-Whitney test (Table 1). Treg cells were significantly less frequent in patients with active PF in relation to healthy controls ($P = 0.02$) (Figure 1c). In addition, this subpopulation was significantly less frequent in patients with active PF in relation to those with inactive disease ($P = 0.03$) (Figure 1c).

The frequency of Th2 and IgG expressing memory B cells is directly proportional to disease activity

Although not statistically significant according to Mann-Whitney test, Th2 and IgG expressing memory B cells (IgG⁺ B cells) presented an interesting frequency distribution along samples, with the highest mean frequency in aPF and lowest in CTL ($P = 0.27$ and 0.24 , respectively), with intermediate values for iPF (Figure 1a-b). Interestingly, these mean frequencies were higher as the disease activity of the sample increased.

Levels of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ Treg indicate that regulatory T cells are eventually even less frequent in aPF

In order to confirm the higher proportion of CD4⁺CD25⁺ Treg in aPF in relation to CTL and iPF, we extracted the RNA of these sample cell fractions and performed a qRT-PCR for the commonly used Treg marker, Foxp3. Although not significantly downregulated, *FOXP3* showed a tendency for lower expression in patients with active lesions when compared to healthy controls (0.74-fold, $P = 0.15$) and patients with inactive disease (0.85-fold, $P = 0.28$) (Figure 2). Together, these data suggest that Treg are eventually even less frequent in patients with active PF when compared to healthy controls, and this may also be the case when compared to patients with inactive PF.

Discussion

In this study, we verified that circulating CD4⁺CD25⁺ Treg cells are significantly less frequent in patients with active PF when compared to healthy controls. Interestingly, patients with inactive disease showed intermediate frequencies of CD4⁺CD25⁺ Treg cells that differed significantly from those of aPF. The fact that both the aPF and the iPF groups were under corticosteroid treatment at the time of blood collection allows us to rule out the possibility that the observed differences are a result of the immunosuppression caused by the medication.

Since the CD25 molecule is also expressed upon CD4⁺ T cell activation, and considering that the best Treg marker so far is Foxp3 that cannot be used for magnetic cell sorting [Rensing-Ehl *et al.*, 2007], we quantified this molecule in the sample Treg subpopulations. *FOXP3* mRNA levels showed a tendency for lower expression in patients with active PF in relation to inactive PF and healthy controls. Besides sustaining the lower proportion of Treg in aPF, these results also suggest that the more active suppressive cell subpopulation may be even less frequent in the disease.

Since Foxp3 does not identify a single defined cell subpopulation [Ziegler, 2006], and considering that its expression can be induced in effector T cells *in vitro* [Walker *et al.*, 2003], the functional activity of Treg cells should be evaluated in future studies as the gold standard for defining Treg [Liu *et al.*, 2006].

As potential targets of Treg-mediated suppression, autoreactive Th2 and IgG expressing memory B cells were also quantified in PF. Despite no statistical differences, aPF exhibited the higher proportions of Th2 and IgG⁺ B cells (Table 1), followed by iPF. These observations can be associated with the frequency, and eventually functional impairment of the Treg subpopulation.

Treg are represented by a heterogeneous cell population with broad suppressive effects. Type I regulatory T cells (Tr1) are a class of iTreg that exert their suppressive effect throughout the secretion of IL-10 and TGF- β . Based on the detection of lower levels of Dsg3-specific Tr1 (Dsg3-Tr1) and higher levels of Dsg3-Th2 cells in PV patients in relation to healthy controls [Veldman *et al.*, 2004], and on the conversion of these Dsg3-Tr1 into Dsg3-Th2-like cells upon Foxp3 inhibition [Veldman *et al.*, 2006], it

has been hypothesized that an imbalance between autorreactive Tr1 and Th2 cells is critical for the pathogenesis of PV [Veldman *et al.*, 2009]. As these Th2 cells are important for autoantibody production by B cells, low levels of Tr1 cells fail to suppress the high levels of autorreactive Th2 cells, resulting in loss of self-tolerance and PV manifestation.

The similarity between PV and PF and our preliminary results regarding T and B cell proportions in PF, where Th2 and IgG⁺ B cells seem to be more frequent, and Treg more rare in relation to healthy controls, allow us to suggest that such imbalance must also be associated to PF pathogenesis. A previous study had already shown that Treg cells are present in the skin lesions [Malheiros *et al.*, manuscript in preparation] Together, these results reinforce the involvement of Treg in PF pathogenesis.

Conclusion

We found that circulating regulatory T cells are less frequent in patients with active disease and that this frequency seems to increase as disease activity diminishes. Consequently, we suggest that these cells are, to some extent, involved in PF pathogenesis and in the control of the disease. It remains to be addressed whether this quantitative deficiency is accompanied by a Treg functional impairment.

References

Alecu M, Ursaciuc C, Surcel M, Coman G, Ciotaru D, Dobre M. CD28 T-cell costimulatory molecule expression in pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009, 23, 288-91.

Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, Almeida FA, Castro RM, Macca ML, Lavrado C, *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol* 1989, 92, 4-12.

Groves RW. Pemphigus: a brief review. *Clin Med* 2009, 9, 371-5.

Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001, 144, 775-80.

Kuhn A, Beissert S, Krammer PH. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2009, 301, 71-81.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006, 203, 1701-11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001, 25, 402-8.

Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci (Lond)* 2009, 116, 639-49.

Rensing-Ehl A, Gaus B, Bruckner-Tuderman L, Martin SF. Frequency, function and CLA expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2007, 16, 13-21.

Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* 2007, 214, 210-20.

Veldman C, Höhne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Type 1 regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2004, 172, 6468-75.

Veldman C, Pahl A, Beissert S, Hansen W, Buer J, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. *J Immunol* 2006, 176, 3215-22.

Veldman C, Pahl A, Hertl M. Desmoglein 3-specific T regulatory 1 cells consist of two subpopulations with differential expression of the transcription factor Foxp3. *Immunology* 2009, 127, 40-9.

Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003, 112, 1437-43.

Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol* 2006, 24, 209-26.

Tables and Figures

Table 1 – Relative and absolute frequencies of B and T cells and their subpopulations in healthy controls and PF patients[#].

	CTL (n = 5)	REM (n = 3)	iPF (n = 4)	aPF (n = 6)
CD19 ⁺ B cells [§]				
Frequency, % of PBMC	1.8 ± 1.3	3.1 ± 1.2	1.4 ± 0.8	1.8 ± 1.1
Absolute number /10 ⁶ PBMC	18317.5	30553.3	14078.9	17935.1
IgG memory	16.6 ± 2.3	18.6 ± 5.7	20.8 ± 7.8	29.6 ± 15.8
CD4 ⁺ T cells				
Frequency, % of PBMC	8.5 ± 10.9	13.3 ± 7.2	7.4 ± 3.5	4.3 ± 2.5
Absolute number /10 ⁶ PBMC	85365.1	132505.7	74497.9	43477.3
Th2 cells	20.8 ± 3.8	15.4 ± 6.7	23.2 ± 5.4	24.4 ± 10.0
Treg cells	11.2 ± 2.5	8.3 ± 6.3	9.8 ± 1.1	7.8 ± 1.6*

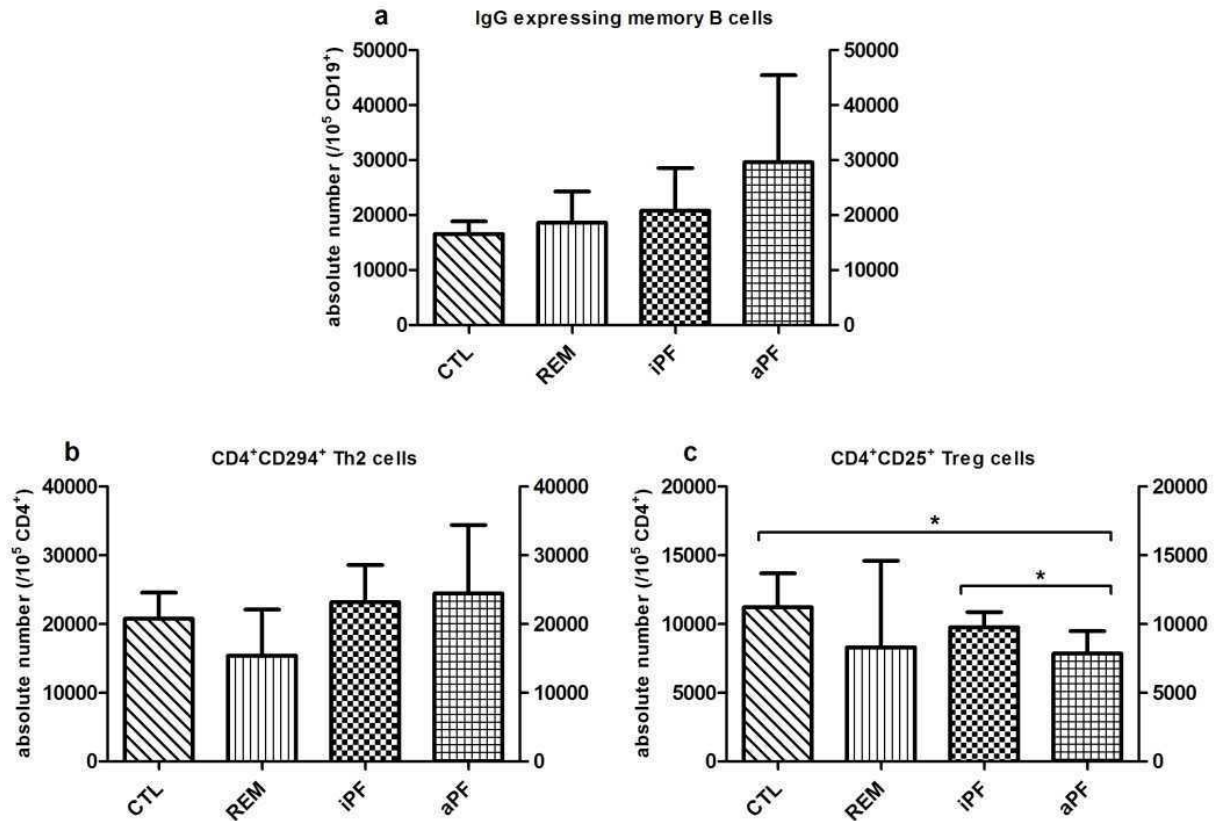
[#] Values are the mean % ± SD. For IgG⁺ B cells and Th2/Treg cells, values are the corresponding % of total CD19⁺ B cells and CD4⁺ T cells, respectively.

[§] For CD19⁺ B cells, the CTL group has n = 4.

* $P < 0.05$ versus CTL and iPF, by Mann-Whitney test.

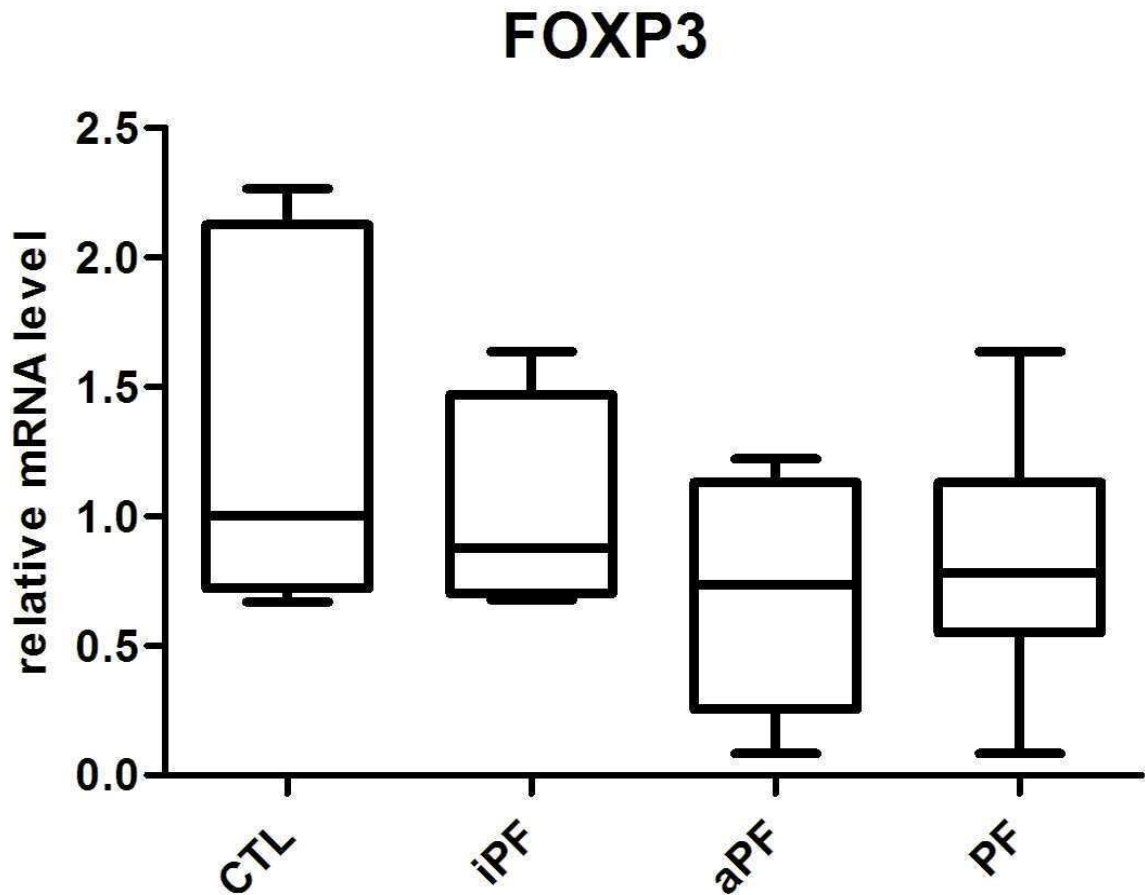
CTL = healthy controls, REM = remitting patients, iPF = patients with inactive disease, aPF = patients with active lesions.

Figure 1 – Absolute frequencies of IgG⁺ B cells, CD4⁺CD294⁺ Th2 cells and CD4⁺CD25⁺ Treg cells in healthy controls and PF patients.



Absolute frequencies of IgG⁺ B cells (a), CD4⁺CD294⁺ Th2 cells (b) and CD4⁺CD25⁺ Treg cells (c) per 10^5 CD19⁺ or CD4⁺ cells, in healthy controls (CTL), remitting patients (REM), patients with inactive disease (iPF) and patients with active lesions (aPF). * $P < 0.05$ for aPF versus CTL and iPF, by Mann-Whitney test.

Figure 2 – Relative *FOXP3* levels in CD4⁺CD25⁺ Treg cells of CTL, iPF, aPF, and PF (iPF + aPF).



Relative *FOXP3* levels in CD4⁺CD25⁺ Treg cells of healthy controls (CTL), patients with inactive disease (iPF), patients with active lesions (aPF), and iPF and aPF together (PF). The CTL sample was set as the reference group according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data are shown as a box-plot, where the bar within the box represents the median value, the outlines of the boxes show the 25th and the 75th percentiles and the bars outside the boxes represent the minimum and maximum values of the distribution.

Quantification of mature microRNAs in Th2, Treg and IgG expressing memory B cells in the autoimmune disease pemphigus foliaceus

Authors and Affiliations

Gabriel Adelman Cipolla¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹ Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Corresponding author

Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler
Departamento de Genética
Universidade Federal do Paraná
Caixa Postal 19071
81531-990 Curitiba, Brazil
Tel: (+5541) 33611746; 3611724
Fax: (+5541) 33611793
e-mail: gabriel.cipolla@ufpr.br; perler@ufpr.br

Abstract

MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides that act at the posttranscriptional level as important gene expression fine-tuners, through binding to the 3' UTR of mRNAs. MicroRNAs have been increasingly implicated in normal immune function and their misregulation is frequently associated to autoimmune diseases. Pemphigus foliaceus is an autoimmune disease characterized by a Th2-dependent production of IgG autoantibodies directed against skin adhesion proteins. Considering this importance of autoreactive Th2 and B cells, as well as the evidence of

the role of regulatory T cells in loss of self-tolerance, we aimed to verify the expression patterns of five microRNAs candidates of PF (auto)immune regulation (miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p, and miR-1321) in the three mentioned lymphocytes subpopulations. Among our findings are: (1) in IgG⁺ B cells and Th2 cells, miR-155 is 2- and 3-fold upregulated, respectively, in patients with inactive disease compared to healthy controls ($P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively); (2) miR-1321 tends to be upregulated in Th2 cells of PF patients compared to healthy controls ($P = 0.10$) and is believed to target BLYS, a B cell stimulator, since miR-1321 levels are inversely proportional to those of BLYS; and (3) miR-148a was not detected in IgG⁺ B cells of patients with inactive disease, but was consistently expressed by these cells in patients with active disease. Together, these results place miR-148a, miR-155 and miR-1321 as potential targets for new therapeutic approaches in pemphigus foliaceus.

Keywords: microRNA, miR-148a, miR-155, miR-1321, Th2 cells, Treg cells, B cells, pemphigus foliaceus.

Introduction

Pemphigus refers to a set of complex autoimmune blistering diseases in which adhesion proteins, namely desmosomal glycoproteins (desmogleins), are the target of autoantibodies. As a result of this primary pathogenic process named acantholysis, intraepidermal blisters and/or mucosal erosions are typically seen in patients [Diaz *et al.*, 1989; Groves, 2009]. Pemphigus foliaceus (PF) is characterized by type G immunoglobulin (IgG) autoantibodies directed against the extracellular region of desmoglein 1 (Dsg1), restricted to the upper skin layers, resulting in epidermal blister formation and superficial erosions [Groves, 2009; Harman *et al.*, 2001]. In Brazil, PF reaches its highest incidence, hence being named as endemic pemphigus foliaceus, popularly known as *fogo selvagem*, with apparently no clinical difference to the idiopathic form of PF present in North America and Europe [Diaz *et al.*, 1989].

As a multifactorial disease, PF is the outcome of genetic, epigenetic and environmental factors. Previous studies have reported associations between PF and variants of genes acting in the immune responses, such as *HLA-DRB1* [Pavoni *et al.*, 2003], *interleukin (IL)6* and *IL4* [Pereira *et al.*, 2003], *CD40*, *CD40LG* and *TNFSF13B* (*BAFF* or *BLYS*) [Malheiros & Petzl-Erler, 2009]. A more recent study analyzed the genome-wide expression profile of CD4⁺ T cells and identified many genes differentially expressed in PF, including overexpression of *FOXP3*, a regulatory T cell (Treg) transcription factor [Malheiros, *et al.*, manuscript in preparation]. Based on PF epidemiology, it is suggested that an environmental risk factor is triggering the disease [Lombardi *et al.*, 1992].

MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, single-stranded, non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides that bind to the 3' untranslated region (3' UTR) of messenger RNAs (mRNAs), inducing translational repression or mRNA cleavage [Bartel, 2004]. This posttranscriptional regulation mechanism is believed to be a transcriptome-wide process, with a third of human genes being targeted by microRNAs [Sun & Tsao, 2008].

More recently, microRNAs have been considered to play a key role in hematopoiesis and normal immune development and function, presenting unique expression patterns in cells of the innate and adaptive immune system [Anglicheau *et al.*, 2010]. Given these vital roles, it is not surprising that misregulation of certain miRNAs has been constantly related to cancer and increasingly linked to development and pathogenesis of human autoimmune disorders [Pauley *et al.*, 2009].

Considering the growing evidence of the role of microRNAs in autoimmune diseases and the adaptive immune response underlying PF, where Treg cells seem to be present and autoreactive T-helper type-2 (Th2) cells are needed for the stimulation of autoreactive IgG-producing B cells, we aimed to verify the expression level of five candidate miRNAs (miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p, and miR-1321) in three different lymphocytes subpopulations obtained from PF patients.

Material and Methods

Patients and controls

We studied 15 subjects, 6 patients with active lesions (aPF), 4 patients with inactive disease (iPF) characterized by a recent disease activity and beginning of remission, and 5 healthy controls (CTL). All patients were properly diagnosed by clinical and laboratory tests, among which histopathological and/or immunohistochemistry analysis of skin lesion biopsies. All patients, except for the remitting group, were under corticosteroid treatment at the time of blood collection. Most patients were accessed at the Hospital Adventista do Pênfigo, in the city of Campo Grande, Brazil.

Isolation of Th2, Treg and surface IgG expressing memory B cells

Forty ml of peripheral blood were collected by venipuncture from each subject. One day after blood collection, the material was processed for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) according to manufacturer's manual. Dead cells were magnetically removed with the Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) by separation over a MACS Column. The live cell fraction was then labeled with anti-CD4 microbeads from the CD4 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec), as a first positive selection parameter. CD4⁺ T cells were retained on a MACS column and recovered for a second magnetic labeling with anti-PE microbeads that bind to the anti-CD294 (CRTH2)-PE of the CD294 (CRTH2) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) previously incubated together with the anti-CD4 microbeads. This CD4⁺ T cell fraction was then set on a new MACS column for positive selection of CD4⁺CD294⁺ Th2 cells. The fraction depleted of Th2 cells was labeled with anti-CD25 microbeads, CD25 MicroBeads II (Miltenyi Biotec), for the positive selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. The CD4⁻ fraction obtained initially was processed simultaneously for the isolation of surface IgG expressing memory B cells. This consisted of a positive selection using anti-CD19 microbeads from the CD19 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec), followed by the

labeling with anti-IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec) as a second selection parameter. Aliquots of all cell fractions of interest from each subject were analyzed through flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences) to evaluate the purity of the sorted subpopulations.

RNA extraction and qPCR-RT

MicroRNAs were extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the protocol of the manufacturers. MicroRNA quality and concentration was assessed by UV absorbance. For each reverse transcription reaction, 2,5ng of the microRNA sample was used. miRNA qRT-PCR was performed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Universal PCR Master Mix, and TaqMan MicroRNA Assay primers for miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p, and miR-1321 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The miRNA levels were normalized to RNU44. All reactions were performed in duplicates (Mastercycler Realplex 2S, Eppendorf).

Statistical analysis

The cycle threshold (Ct) values, corresponding to the PCR cycle number at which fluorescence emission reaches a threshold above baseline emission, were determined and the relative miRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [Livak & Schmittgen, 2001].

For evaluation of the data, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney nonparametric tests were performed to compare all samples together and samples taken two by two, respectively. Analyses were done using GraphPad Prism software version 5.04. *P* values less than 0.05 were adopted as the significance limit. Statistical analysis with a two-tailed *P* value was performed for all microRNAs, except for miR-155, that was believed a priori to be overexpressed in PF, as seen in other autoimmune disorders when differentially expressed [Leng *et al.*, 2011]. In this case a one-tailed *P* value was considered.

Results

miR-155 is upregulated in IgG⁺ B cells and CD4⁺CD294⁺ Th2 cells

miR-155 was the only microRNA found significantly differentially expressed among those investigated. In IgG⁺ B cells and Th2 cells, miR-155 is 2- and 3-fold upregulated, respectively, in patients with inactive disease compared to healthy controls (Figure 1d and 1e, $P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively). Patients with active lesions showed a broader expression of miR-155 in IgG⁺ B cells and Th2 cells in relation to iPF ($P = 0.09$ and $P = 0.08$, respectively).

CD4⁺CD294⁺ Th2 cells exhibit a tendency for upregulation of miR-1321 in PF

Although not significantly differentially expressed, miR-1321 tends to be upregulated in Th2 cells of PF patients (aPF + iPF) compared to healthy controls (Figure 1h, $P = 0.10$). There is conflicting data as miR-1321 has *TNFSF13B* (also known as *BLYS*, *BAFF*) as a highly possible target (score = -0.26, Table 1) and since *BLYS* is upregulated in CD4⁺ T cells of PF patients [Malheiros, *et al.*, manuscript in preparation]. Considering these results and the fact that aPF showed a broader expression level of miR-1321 as for most miRNAs, possibly due to disease heterogeneity, we performed *BLYS* quantification and related its levels to those of miR-1321. In both aPF and iPF, *BLYS* levels strongly negatively correlated to miR-1321 levels ($r = -0.55$ and -0.96 , respectively) (Figure 2a and 2b, respectively). These findings suggest that *BLYS* is a direct target of miR-1321.

Patients with inactive disease do not express mir-148a in IgG⁺ B cells

Interestingly, miR-148a was not detected in IgG⁺ B cells of patients with inactive disease, but was consistently expressed by these cells in patients with active disease (Figure 1a). This result suggests a link between miR-148a downregulation and PF remission.

IgG⁺ B cells and CD4⁺CD25⁺ Treg cells do not express miR-145 and miR-338-5p

miR-338-5p and miR-145, possible regulators of *CTLA4* with relatively high scores, -0,24 and -0,13 (Table 1), respectively, were under detection levels in Treg cells from all samples. This result may not be surprising, given that Treg cells express *CTLA4* constitutively.

Discussion

MicroRNAs have emerged as a class of small non-coding RNAs with implications in many cancers, autoimmune diseases and viral infections. Just a small number of these have their function well established in normal cell growth and differentiation and immune responses. Many of these microRNAs have shown to be differentially expressed in autoimmune diseases, such as miR-146a and miR-155, the latter one being analyzed in this study. miR-155 appears as a broadly expressed molecule, with regulatory functions in many different cell subpopulations, such as B, T and dendritic cells (DCs). In general, miR-155 is reported as upregulated in certain immune disturbs, commonly in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis [Pauley *et al.*, 2009; Leng, *et al.*, 2011].

In the present study, we considered candidate microRNAs those that possibly target genes differentially expressed in or genetically associated to PF. Considering the low context scores presented in Table 1 for miR-155 and its aforementioned importance, we lead our discussion throughout the documented targets of miR-155 in Th2 and memory B cells.

In the absence of miR-155 in memory B cells, the humoral response is impaired by a lower production of high-affinity IgG1 antibodies [Vigorito *et al.*, 2007]. Meanwhile, in PF an intramolecular epitope spreading leads to a shift of production from non-pathogenic IgG1 to predominantly IgG4 pathogenic antibodies against the Dsg1 antigen, resulting in PF onset or relapse [Li *et al.*, 2003]. Besides its non-pathogenicity, anti-Dsg1 IgG1 is believed to be protective, since more than 50% of the members of the

Terena tribe, a reservation of Limao Verde (Mato Grosso do Sul, Brazil) where there is a 3.4% prevalence of PF [Hans-Filho *et al.*, 1996], present low levels of anti-Dsg1 IgG1 antibodies but are considered clinically normal [Warren *et al.*, 2000]. As we detected a significant 2-fold overexpression of miR-155 in IgG expressing memory B cells of patients with inactive disease when compared to healthy controls and a 2.4-fold tendency for overexpression in relation to patients with active lesions, we postulate that this upregulation can be important for the production of protective/non-pathogenic IgG1 antibodies and, consequently, for PF remission. In order to corroborate this hypothesis, we intend to verify the IgG levels in these subjects, as well as study IgG production in B cells upon stimulation with miR-155.

Regarding miR-155 function in T helper cells, it is known that deficiency of this microRNA results in biased differentiation towards a Th2 profile, evidenced by the elevated number of IL-4 producing cells and the increased secretion of cytokines typical of Th2 responses [Rodriguez *et al.*, 2007].

By analyzing these findings in the context of the significant miR-155 upregulation in CD4⁺CD294⁺ Th2 cells of patients with inactive disease compared to healthy controls (3.07-fold) and the tendency for overexpression in relation to patients with active lesions (2.51-fold), we hypothesize that, since Th2 responses predominate during active PF, miR-155 indirectly downregulates the Th2 cytokine production that sustains the humoral response. As a consequence, the PF immune pathway is downregulated, resulting in disease inactivity. In order to validate this hypothesis, we propose the quantification of Th1 and Th2 cytokines in the subjects of this study, aiming on IL-4, important for the production of IgG4 antibodies and genetically associated to PF [Pereira *et al.*, 2003].

Another important result, although not statistically addressed due to analysis limitation, refers to the absence of miR-148a in IgG⁺ B cells of patients with inactive disease, in contrast with its consistent expression in patients with active disease. Surprisingly, miR-148a is a strong potential regulator of antigen presenting molecules (HLA-DQB1 and HLA-DQB2), class II transcription activator (CIITA) and IL-6 signal transducer (IL6ST) (Table 1), that we believe to be downregulated by miR-148a overexpression in IgG⁺ B cells of patients with a lower PF activity. As this data results from a bioinformatics approach, it will be important to check if indeed this occurs *in vivo*.

In systemic lupus erythematosus, miR-148a is upregulated in CD4⁺ T cells of patients and in an animal model of the disease. Moreover, miR-148a promotes DNA hypomethylation of CD4⁺ T cells by targeting the DNA methyltransferase 1 (DNMT1), resulting in the expression of methylation-sensitive genes that are associated to autoimmune diseases [Pan *et al.*, 2010]. Together, these data render the methylation status of IgG⁺ B cells in the context of PF interesting to analyze, since miR-148a was only detected in the most active PF sample and considering that epigenetic factors, such as methylation, may also be involved in the disease pathogenesis.

Two recent studies have suggested an important role for *TNFSF13B*, also known as *BAFF* or *BLYS*, in PF. In addition to the genetic association described [Malheiros & Petzl-Erler, 2009], *BLYS* is upregulated in CD4⁺ T cells of patients lacking treatment in relation to healthy controls, among others [Malheiros *et al.*, manuscript in preparation]. Given the importance of microRNAs for post-transcriptional regulation and using a bioinformatics tool, we found that miR-1321 is a strong candidate for regulation of BLYS, a potent stimulator of B cells secreted or associated to the membrane of DCs, macrophages and effector T cells [Mackay & Leung, 2006]. Following the tendency for upregulation of miR-1321 in Th2 cells of PF, we also quantified BLYS. Consistently, the highest levels of miR-1321 corresponded to the lowest levels of BLYS, as the lowest levels of miR-1321 correlated with the highest of BLYS. These findings, besides pointing BLYS as a target of miR-1321, place this microRNA as an interesting alternative therapy in PF, in the sense that its higher expression could eventually reduce B cell stimulation.

The fact that our results suggest a different scenario from the one pointed by Malheiros *et al.* [manuscript in preparation], since miR-1321 is apparently overexpressed in PF, resulting in lower levels of BLYS, can be explained by the disease heterogeneity among PF individuals of our samples. Here, we have two PF samples that were established based on disease activity, or simply on the presence (aPF) or absence (iPF) of lesions. In Malheiros *et al.*, PF subjects were grouped according to the extent of the lesions (localized or wide-spread) and to the absence or presence of treatment. Consequently, investing in more homogeneous samples can shed further light on the matter.

Conclusion

This study provides the first insights on the role of microRNAs in the pathogenesis of the autoimmune disease pemphigus foliaceus. We found that miR-155 is significantly upregulated in two lymphocytes subpopulations of patients with inactive disease compared to healthy controls. Moreover, this microRNA seems to be downregulated in patients with active disease in relation to those without lesions. These results highlight miR-155 as a very important microRNA for normal immune development and autoimmune disease pathogenesis. In IgG⁺ B cells, miR-148a was not detected in the inactive form of the disease, while miR-1321 seems to regulate BLYS expression in Th2 cells. Together, miR-148a, miR-155 and miR-1321 arise as potential targets for new therapeutic approaches in pemphigus foliaceus.

References

- Anglicheau D, Muthukumar T, Suthanthiran M. MicroRNAs: small RNAs with big effects. *Transplantation* 2010, 90; 105-12.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116, 281-97.
- Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Hum Immunol* 2010, 71, 809-17.
- Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, Almeida FA, Castro RM, Macca ML, Lavrado C, *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol* 1989, 92, 4-12.
- Groves RW. Pemphigus: a brief review. *Clin Med* 2009, 9, 371-5.
- Hans-Filho G, dos Santos V, Katayama JH, Aoki V, Rivitti EA, Sampaio SA, Friedman H, Moraes JR, Moraes ME, Eaton DP, Lopez AL, Hoffman RG, Fairley JA, Giudice GJ, Diaz LA. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. *J Invest Dermatol* 1996, 107, 68-75.

- Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001, 144, 775-80.
- Leng RX, Pan HF, Qin WZ, Chen GM, Ye DQ. Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011, 22, 141-7.
- Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med* 2003, 197, 1501-10.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001, 25, 402-8.
- Lombardi C, Borges PC, Chaul A, Sampaio SA, Rivitti EA, Friedman H, Martins CR, Sanches Júnior JA, Cunha PR, Hoffmann RG, *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". *J Invest Dermatol* 1992, 98, 847-50.
- Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 2006, 18, 284-9.
- Malheiros D, Petzl-Erler ML. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genes Immun* 2009, 10, 547-58.
- Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 2010, 184, 6773-81.
- Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009, 32, 189-94.
- Pavoni DP, Roxo VM, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes Immun* 2003, 4, 110-6.
- Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. *Cytokine* 2004, 28, 233-41.
- Petzl-Erler ML, Santamaria J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? *Tissue Antigens* 1989, 33, 408-14.

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007, 316, 608-11.

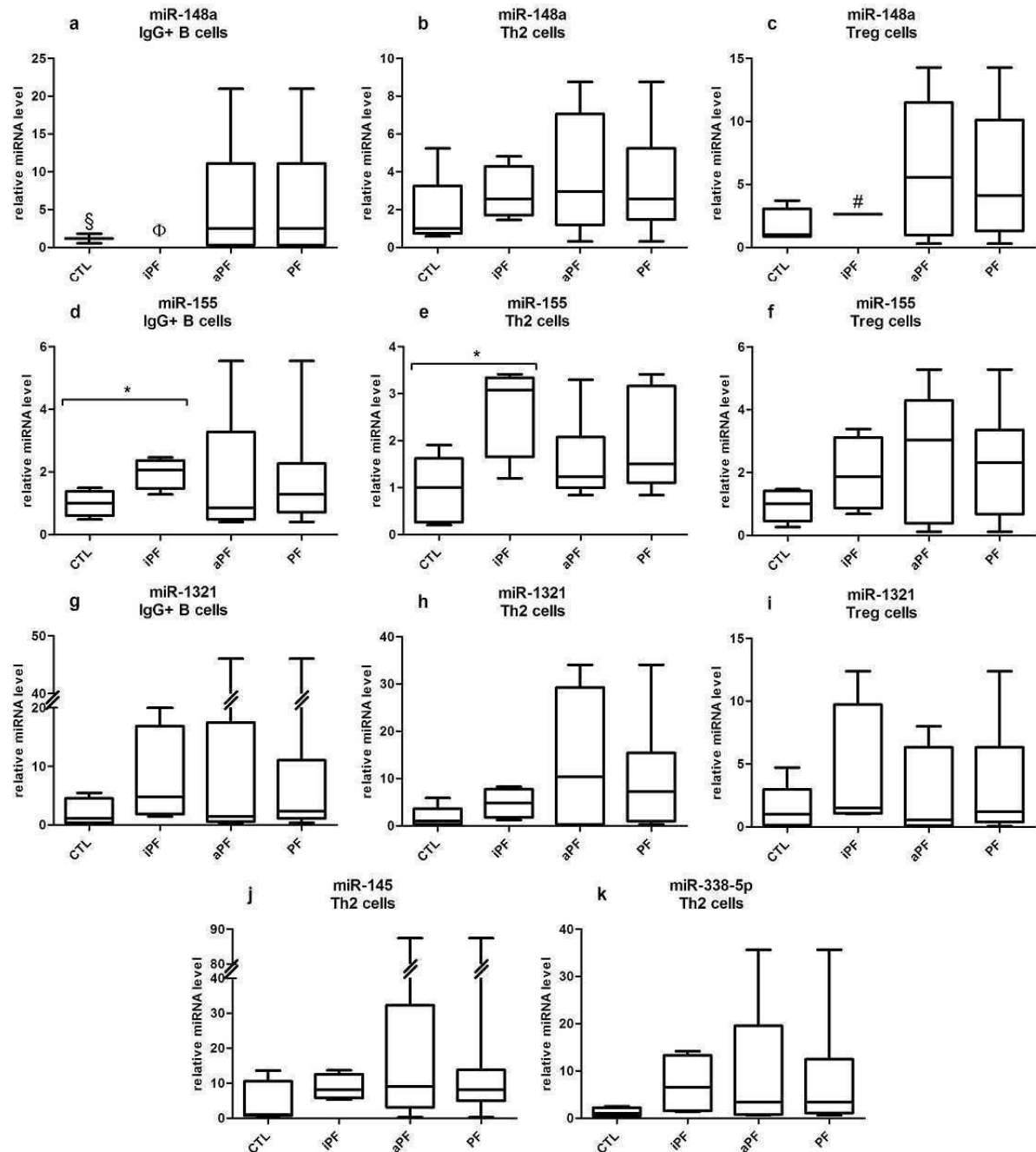
Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol* 2008, 59, 725-37.

Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP, Miska EA, Rodriguez A, Bradley A, Smith KG, Rada C, Enright AJ, Toellner KM, Maclennan IC, Turner M. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007, 27, 847-59.

Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. *N Engl J Med* 2000, 343, 23-30.

Tables and Figures

Figure 1 – Relative miR-148a, miR-155, miR-1321, miR-145 and miR-338-5p levels in IgG⁺ B cells, CD4⁺CD294⁺ Th2 cells and CD4⁺CD25⁺ Treg cells in PF.



Relative miR-148a, miR-155, miR-1321, miR-145 and miR-338-5p levels in IgG⁺ B cells (a, d, g), CD4⁺CD294⁺ Th2 cells (b, e, h, j, k) and CD4⁺CD25⁺ Treg cells (c, f, i) in healthy controls (CTL), patients with inactive disease (iPF), patients with active lesions (aPF) and iPF and aPF together (PF). The CTL sample was set as the reference group

according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data are shown as a box-plot, where the bar within the box represents the median value, the outlines of the boxes show the 25th and the 75th percentiles and the bars outside the boxes represent the minimum and maximum values of the distribution. miR-145 and miR-338-5p were not detected in IgG⁺ B cells and Treg cells. [§] miR-148a was detected in only 2 CTL subjects. ^ϕ miR-148a was not detected in iPF. [#] miR-148a was detected in only 1 iPF subject. * $P < 0.05$ for CTL versus iPF, by Mann-Whitney's test.

Table 1 – Candidate microRNAs and their predicted target genes.

target gene ¹	transcript ID ²	main protein function	status in PF ³	microRNA	score ⁴
<i>CD1D</i>	NM_001766	mediates the presentation of lipid and glycolipid Ag to T cells	DE	miR-145	-0,50
				miR-148a	-0,07
				miR-338-5p	-0,09
<i>CD28</i>	NM_006139	binds to B7 molecules (CD80, CD86) delivering signal 2 for T-cell proliferation and survival, cytokine production and Th2 development	GA [Dalla-Costa <i>et al.</i> , 2010]	miR-145	-0,14
				miR-146a	-0,16
				miR-155	-0,02
				miR-338-5p	-0,24
<i>CD40</i>	NM_152854	binds to CD40LG inducing Ig class switching, memory B cell development, and GC formation	GA [Malheiros & Petzl-Erler, 2009]	miR-145	-0,22
<i>CD40LG</i>	NM_000074	binds to CD40 inducing Ig class switching, memory B cell development, and GC formation	DE/GA [Malheiros & Petzl-Erler, 2009]	miR-148a	-0,08
<i>CD80</i>	NM_005191	binds to CD28 delivering signal 2 for T-cell proliferation and survival, cytokine production and Th2 development	<i>CD86</i> homologue	miR-146a	-0,12
				miR-145	-0,17
<i>CD86</i>	NM_176892		GA [Dalla-Costa <i>et al.</i> , 2010]	miR-148a	-0,12
<i>CIITA</i>	NM_000246	positive regulator of class II MHC gene transcription	GA [Piovezan <i>et al.</i> , manuscript in preparation]	miR-1321	-0,13
				miR-145	-0,10
				miR-148a	-0,34
<i>CTLA4</i>	NM_001037631	binds to B7 molecules (CD80, CD86) transmitting an inhibitory signal to T cells	DE/GA [Dalla-Costa <i>et al.</i> , 2010]	miR-155	*
				miR-145	-0,13
				miR-155	-0,07
<i>HLA-DPB1</i>	NM_002121	class II molecule that present peptides derived from extracellular proteins to CD4 ⁺ T cells	DE	miR-338-5p	-0,24
				miR-145	-0,02
				miR-338-5p	-0,09
<i>HLA-DQB1</i>	NM_002123	class II molecule that present peptides derived from extracellular proteins to CD4 ⁺ T cells	GA [Petzl-Erler & Santamaria, 1989]	miR-148a	-0,27
<i>HLA-DQB2</i>	NM_001198858	class II molecule that present peptides derived from extracellular proteins to CD4 ⁺ T cells		miR-148a	-0,42
<i>HLA-DRB1</i>	NM_002124	class II molecule that present peptides derived from extracellular proteins to CD4 ⁺ T cells	GA [Pavoni <i>et al.</i> , 2003]	miR-155	*
				miR-1321	-0,16
				miR-145	-0,47
<i>IL6</i>	NM_000600	inflammation and maturation of B cells	GA [Pereira <i>et al.</i> , 2003]	miR-338-5p	-0,47
<i>IL6R</i>	NM_000565	binds to IL6 delivering intracellular signals that lead to B cell maturation	subunit of the IL6R	miR-155	-0,11
				miR-338-5p	-0,01
<i>IL6ST</i>	NM_001190981	signal transducer of IL6-R	subunit of the IL6R	miR-148a	-0,42
				miR-155	-0,04
				miR-338-5p	-0,06*
				miR-1321	-0,03
<i>TNFSF13</i>	NM_003808	proliferation and differentiation of B cells	<i>TNFSF13B</i> homolog.	miR-145	-0,05
<i>TNFSF13B</i>	NM_006573	proliferation and differentiation of B cells	DE/GA [Malheiros & Petzl-Erler, 2009]	miR-338-5p	-0,05
				miR-1321	-0,26

¹ official symbol of predicted target gene.

² ID of the target's transcript sequence used by TargetScan 6.0.

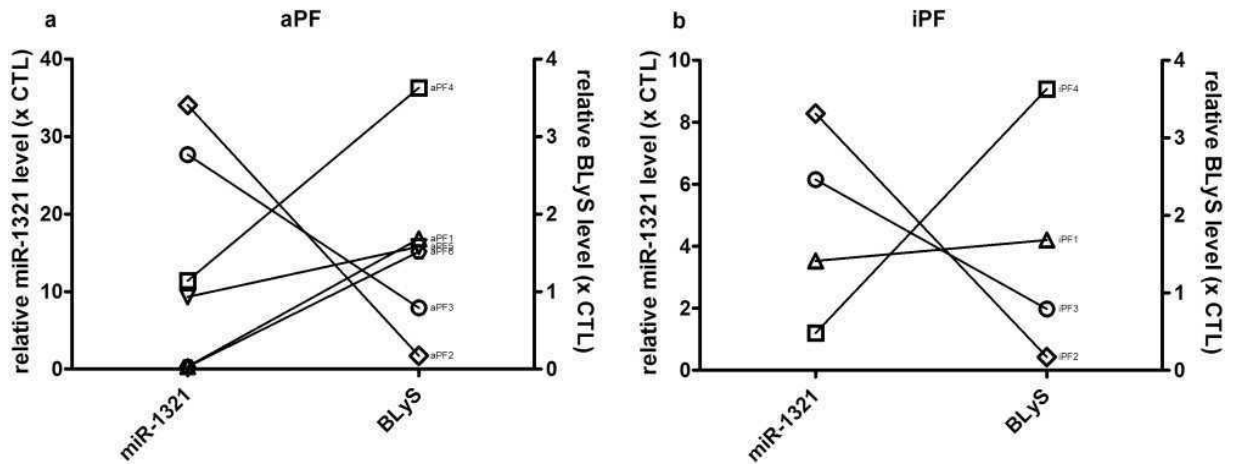
³ differentially expressed (DE) in or genetically associated (GA) to pemphigus foliaceus; for DE genes refer to Malheiros *et al.*, manuscript in preparation, otherwise see table.

⁴ context score predicted by TargetScan 6.0 – a more negative context score indicates a more relatively favorable site for the microRNA.

GC = germinal center.

* a single nucleotide polymorphism is located on the 3'UTR's microRNA site, as predicted by PolymiRTS Database 2.0 (miR-155 was not predicted by TargetScan 6.0 to bind to the mRNA of *CIITA* and *HLA-DRB1*).

Figure 2 – Relative individual miR-1321 and BLyS expression in Th2 cells aPF



Relative individual miR-1321 and BLyS expression in Th2 cells of patients with active lesions (aPF) (a) and patients with inactive disease (iPF) (b) in relation to healthy controls (CTL). A geometrical shape represents each individual sample, for which a line connects miR-1321 and BLyS levels. Except for aPF4, represented by a square on the left graph, the highest levels of miR-1321 always corresponded to the lowest levels of BLyS, as the lowest levels of miR-1321 correlated with the highest levels of BLyS. These results suggest that miR-1321 regulates BLyS expression in Th2 cells.

5 DISCUSSÃO

Dentre os resultados de análise quantitativa de células do sistema imune adaptativo no pênfigo foliáceo, o mais marcante foi que existe uma diferença significativa na frequência de células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ circulantes na amostra de pacientes com a doença ativa em comparação aos controles sadios. Esta subpopulação celular tem um perfil fenotípico muito próximo ao das células nTreg, cuja função é monitorar e suprimir a atividade e proliferação de linfócitos autorreativos através da secreção de IL-10 e TGF- β , constituindo assim um importante mecanismo de autotolerância periférica (MELLANBY *et al.*, 2009).

Dessa forma, sugere-se, assim como em pênfigo vulgar (Alecu *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2007), que as células Treg estejam envolvidas na patogênese do PF, estando neste caso o seu decréscimo relacionado ao nível de atividade da doença, uma vez que pacientes sem lesão e pacientes de remissão apresentam frequências intermediárias destas células. Propõe-se, então, que uma deficiência quantitativa de células Treg, eventualmente em conjunto com alterações qualitativas, seja importante para a origem e manifestação da doença a partir do momento em que tais células, em baixa frequência, perdem a capacidade de suprimir a resposta imune dos linfócitos autorreativos.

Alternativamente, é possível que as células Treg circulantes estejam em menor número em pacientes com a doença ativa em relação aos controles por estarem concentradas nas lesões daqueles, como foi demonstrado por Malheiros (2009), que detectou superexpressão de marcadores de células Treg (*FOXP3*, *IL10*, *TGFB1*, *GATA3* e *CTLA4*) em tecido lesionado em relação ao tecido não-lesionado de pacientes.

Tais alterações quantitativas de células Treg já foram descritas diversas vezes para lúpus eritematoso sistêmico, diabetes tipo I e artrite reumatoide, mas os resultados podem ser conflitantes, principalmente para lúpus, onde outros trabalhos sugerem também aumento de células Treg (KUHN *et al.*, 2009). Isso pode ser explicado por se tratarem todas de doenças multifatoriais, e pode ser melhor

compreendido considerando-se também os aspectos funcionais, ou seja, qualitativos, das células Treg.

Outro resultado interessante derivado da análise quantitativa das células separadas diz respeito à distribuição da frequência de células B CD19⁺ de memória expressando IgG de superfície. Estas células, que compreendem os linfócitos B de memória autorreativos essenciais para a recidiva da doença, apresentaram maior frequência quanto maior o nível de atividade do PF, sendo mais frequente em pacientes com lesão ativa e menos frequente em controles sadios, com valores intermediários para pacientes sem lesão e pacientes em remissão. Estes dados colocam as células B CD19⁺ de memória IgG como interessantes alvos terapêuticos para o pênfigo, já que seus níveis circulantes diminuem à medida que a doença regride, até atingir a remissão completa.

Dentre todos os microRNA, miR-155 é um dos mais importantes no que diz respeito às doenças autoimunes, apresentando funções reguladoras em diversas linhagens celulares, como linfócitos B e T e células dendríticas. Quando diferencialmente expresso, estas funções podem estar comprometidas, contribuindo para a manifestação de fenótipos autoimunes. Diversos estudos demonstram que miR-155 tem um potencial patogênico importante e que sua superexpressão pode contribuir para o desenvolvimento de respostas autoimunes, como lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e esclerose múltipla (revisado por LENG *et al.*, 2011).

Considerando que miR-155 foi analisado em função de sua importância em diversas doenças autoimunes, a explicação para a superexpressão deste microRNA em células B CD19⁺ de memória IgG e células Th2 CD4⁺CD294⁺ pode estar relacionada a aspectos mais gerais da função de miR-155 nestas células.

Sabe-se que a resposta de células B de memória está reduzida na ausência de miR-155 e que a deficiência deste microRNA resulta numa menor produção de anticorpos IgG1 de alta afinidade, relacionado a um aumento de expressão de PU.1, um regulador transcricional da família Ets e alvo de miR-155 (VIGORITO *et al.*, 2007). No pênfigo foliáceo, a mudança de isotipo de IgG1 para IgG4 do estágio pré-clínico para o clínico ou entre a remissão e a recidiva, proposta por LI *et al.* (2003), pode estar diretamente relacionada aos níveis de miR-155 em células B de memória produtoras de

anticorpos IgG. Quando superexpresso por estas células em pacientes com a doença ativa, miR-155 pode induzir a mudança de isotipo para IgG1, induzindo a produção de anticorpos não-patogênicos e, conseqüentemente, a regressão da doença. Esta hipótese é sustentada pelos resultados de superexpressão de miR-155 em pacientes sem lesão em relação aos controles sadios (diferença de expressão (DE) = 2,06, $P = 0,02$) e também em relação aos pacientes com a doença ativa (DE = 2,40, $P = 0,09$).

Resumidamente, sugere-se que a superexpressão de miR-155 em células B CD19⁺ de memória IgG de pacientes sem lesão resulte num aumento de produção de anticorpos IgG1, que estão, por sua vez, relacionados à remissão da doença. Afim de sustentar esta hipótese, pode-se verificar os níveis de anticorpos IgG1 e IgG4 nestes grupos amostrais e também testar o efeito deste microRNA na produção, *in vitro*, de tais anticorpos.

Quanto à função de células Th, a deficiência de miR-155 resulta em diferenciação favorável para Th2, tendo em vista a observação de um número elevado de células produtoras de IL-4 e a secreção aumentada de citocinas efetoras típicas da resposta Th2. Além disso, verificou-se que c-Maf, um potente transativador do promotor da *IL4*, é regulado por miR-155 e que seus níveis de RNAm e proteína estão aumentados em células Th2 deficientes para miR-155 (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Os dados acima, analisados no contexto do predomínio da resposta Th2 em relação a Th1 em PF (MOESTA *et al.*, 2002; revisado por KÖHLER, 2009), e da superexpressão de miR-155 em células Th2 CD4⁺CD294⁺ de pacientes sem lesão em relação aos controles sadios (DE = 3,07, $P = 0,03$) e também em relação aos pacientes com a doença ativa (DE = 2,51, $P = 0,08$), permitem propor que miR-155 reduz o espectro de ação das células Th2 em pacientes de pênfigo sem lesão, através da redução da produção de citocinas efetoras importantes para a manutenção da resposta imune humoral. No PF, a associação genética descrita para *IL4* (Pereira *et al.*, 2003) e a importância desta citocina para a produção de anticorpos neutralizantes IgG4 tornam interessante verificar se os seus níveis estão inversamente relacionados aos níveis de miR-155 nos pacientes sem lesão em relação aos controles sadios e aos pacientes com a doença ativa.

Estes resultados sugerem um papel diferente para miR-155 no PF em relação às outras doenças autoimunes. Isto é, a superexpressão de miR-155 frequentemente descrita em LES, AR e EM está, em geral, associada a manifestação e manutenção da doença, enquanto que no PF parece estar relacionada à regressão das lesões. Dessa forma, futuramente, a administração ou a indução da expressão de miR-155 pode ser considerada na busca por terapias alternativas para o tratamento do pênfigo foliáceo.

Escolheu-se analisar miR-1321 pois se trata de um potencial regulador de *TNFSF13B*, também referido como *BAFF* ou *BLYS*, um importante estimulador de células B expresso por linfócitos T (Mackay & Leung, 2006). *BLyS* possui variantes associadas ao PF (Malheiros & Petzl-Erler, 2009) e foi descrito como superexpresso em células T CD4⁺ de pacientes sem tratamento em relação aos controles sadios (MALHEIROS, 2009; MALHEIROS *et al.*, manuscrito em preparação). Com o objetivo de validar a tendência descrita de superexpressão de miR-1321 em células Th2 de PF em relação aos controles sadios, quantificou-se também BLYS nesta subpopulação celular. Notou-se que os níveis individuais de miR-1321 correlacionaram negativamente aos de BLYS, e vice-versa, sugerindo que BLYS seja um alvo real de miR-1321 em células Th2. De forma importante, este resultado coloca miR-1321, além de miR-155, como possível alvo para o desenvolvimento de terapias alternativas em PF.

No entanto, os resultados deste estudo propõem um cenário diferente daquele proposto por Malheiros *et al.* (manuscrito em preparação), uma vez que miR-1321 aparentemente superexpresso em PF, resultaria em menores níveis de BLYS. Assim, é preciso interpretar os dados com cautela, visando obter futuramente uma amostra mais homogênea de pacientes com a doença ativa, amostra esta que apresentou, na maioria das análises, maior amplitude nos níveis de expressão dos microRNA. Investir na obtenção de amostras de pacientes com a forma localizada ou generalizada da doença, bem como de indivíduos com ou sem tratamento, pode ser de grande valia neste sentido.

6 CONCLUSÕES

Este foi o primeiro trabalho que analisou a expressão de microRNA na doença autoimune pênfigo foliáceo. Apesar de poucos microRNA e da amostra limitada, os resultados são de grande importância, pois ampliam os alvos de terapias alternativas para a doença.

Dentre eles, miR-155, superexpresso em pacientes sem lesão em relação aos controles saudáveis e aos pacientes com lesão, tanto em células Th2, quanto em células B de memória expressando IgG de superfície. Também miR-1321, agora um grande candidato a regular BLYS, molécula com importância cada vez mais evidente na fisiologia do pênfigo. E ainda, miR-148a, não expresso nas referidas células B de pacientes sem lesão, mas consistentemente expresso por estas células na forma ativa da doença.

De forma geral, obter subpopulações celulares menos heterogêneas, principalmente no contexto do sistema imune, visando estar sempre o mais próximo possível de uma subpopulação especializada, como feito aqui, parece ser fundamental quando o objetivo é analisar o perfil de expressão de microRNA. Isto decorre da elevada especificidade dos microRNA em determinadas condições e etapas do desenvolvimento celular, bem como da própria especialidade da célula.

Por fim, a importância já descrita de células T reguladoras para a patogênese do pênfigo vulgar foi também sugerida por este trabalho para o pênfigo foliáceo, colocando as células T reguladoras também como potenciais alvos de terapias alternativas.

REFERÊNCIAS

- ALECU, M.; URSACIUC, C.; SURCEL, M.; COMAN, G.; CIOTARU, D.; DOBRE, M. CD28 T-cell costimulatory molecule expression in pemphigus vulgaris. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, p. 288, 2009.
- AMBROS, V.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B.; CARRINGTON, J. C.; CHEN, X.; DREYFUSS, G.; EDDY, S. R.; GRIFFITHS-JONES, S.; MARSHALL, M.; MATZKE, M.; RUVKUN, G.; TUSCHL, T. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, v. 9, p. 277, 2003.
- ANGLICHEAU, D.; MUTHUKUMAR, T.; SUTHANTHIRAN, M. MicroRNAs: Small RNAs With Big Effects. **Transplantation**, v. 90, p. 105, 2010.
- ARAVIN, A. A.; LAGOS-QUINTANA, M.; YALCIN, A.; ZAVOLAN, M.; MARKS, D.; SNYDER, B.; GAASTERLAND, T.; MEYER, J.; TUSCHL, T. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster*. **Dev. Develop Cell**, v. 5, p. 337, 2003.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, p. 281, 2004.
- BOSSSEN, C.; SCHNEIDER, P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. **Semin Immunol**, v. 18, p. 263, 2006.
- BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genet Mol Biol**, v. 30, p. 314, 2007.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642, 2009.
- CULTON, D. A.; QIAN, Y.; LI, N.; RUBENSTEIN, D.; AOKI, V.; FILHO, G. H.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus phenotype. **J Autoimmun**, v. 31, p. 311, 2008.
- CURTALE, G.; CITARELLA, F.; CARISSIMI, C.; GOLDONI, M.; CARUCCI, N.; FULCI, V.; FRANCESCHINI, D.; MELONI, F.; BARNABA, V.; MACINO, G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. **Blood**, v. 115, p. 265, 2010.
- DAI, Y.; HUANG, Y. S.; TANG, M.; LV, T. Y.; HU, C. X.; TAN, Y. H.; XU, Z. M.; YIN, Y. B. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 16, p. 939, 2007.

DALLA-COSTA, R.; PINCERATI, M. R.; BELTRAME, M. H.; MALHEIROS, D.; PETZLER-ERLER, M. L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Hum Immunol**, v. 71, p. 809, 2010.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): I Clinical features and immunopathology. **J Am Acad Dermatol**, v. 20, p. 657, 1989.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; HANZ-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II Current and Historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol**, v. 92, p. 4, 1989.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, p. 635, 2007.

GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. **Nucleic Acid Res**, v. 32 (Database issue), p. 109, 2004.

GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, R. J.; VAN DONGEN, S.; BATEMAN, A.; ENRIGHT, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acid Res**, v. 34 (Database issue), p. 140, 2006.

GRIMSON, A.; FARH, K. K.; JOHNSTON, W. K.; GARRETT-ENGELE, P.; LIM, L. P.; BARTEL, D. P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Mol Cell**, v. 27, p. 91, 2007.

GROVES, R. W. Pemphigus: a brief review. **Clin Med**, v. 9, p. 371, 2009.

GUPTA, S.; SHANG, W.; SUN, ZUOMING. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 56, p. 85, 2008.

HANS-FILHO, G.; DOS SANTOS, V.; KATAYAMA, J.H.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, S. A.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; EATON, D. P.; LOPEZ, A. L.; HOFFMAN, R. G.; FAIRLEY, J. A.; GIUDICE, G. J.; DIAZ, L. A. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. **J Invest Dermatol**, v. 107, p. 68, 1996.

HARMAN, K. E.; SEED, P. T.; GRATIAN, M. J.; BHOGAL, B. S.; CHALLASCOMBE, S. J.; BLACK, M. M. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. **Br J Dermatol**, v. 144, p. 775, 2001.

HEZOVA, R.; SLABY, O.; FALTEJSKOVA, P.; MIKULKOVA, Z.; BURESOVA, I.; RAJA, K. R.; HODEK, J.; OVESNA, J.; MICHALEK, J. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. **Cell Immunol**, v. 260, p. 70, 2010.

HILARIO-VARGAS, J.; DASHER, D. A.; LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; DOS SANTOS, V.; QAQISH, B. F.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil. **J Invest Dermatol**, v. 126, p. 2044, 2006.

JUNKER, A.; KRUMBHOLZ, M.; EISELE, S.; MOHAN, H.; AUGSTEIN, F.; BITTNER, R.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R.; MEINL, E. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. **Brain**, v. 132, p. 3342, 2009.

KÖHLER, K. F.; PETZL-ERLER, M. L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Int J Immunogenet**, v. 33, p. 141, 2006.

KÖHLER, K. F. **Pênfigo foliáceo endêmico: avaliação celular e humoral de epítomos imunodominantes da proteína desmogleína 1 e sua relação com os genótipos HLA-DRB1 associados à doença**. 180 f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KUHN, A.; BEISSERT, S.; KRAMMER, P. H. CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. **Arch Dermatol Res**, v. 301, p. 71, 2009.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, p. 853, 2001.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, p. 858, 2001.

LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, p. 862, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843, 1993.

LENG, R. X.; PAN, H. F.; QIN, W. Z.; CHEN, G. M.; YE, D. Q. Role of microRNA-155 in autoimmunity. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, p. 141, 2011.

LEWIS, B. P.; SHIH, I.; JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, p. 787, 2003.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A.; DIAZ L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **J Exp Med**, v. 197, p. 1501, 2003.

LI, J.; WAN, Y.; GUO, Q.; ZOU, L.; ZHANG, J.; FANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; FU, X.; LIU, H.; LU, L.; WU, Y. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 12, p. 81, 2010.

LIN, M. S.; SWARTZ, S. J.; LOPEZ, A.; DING, X.; FERNANDEZ-VINA, M. A.; STASTNY, P.; FAIRLEY, J. A.; DIAZ, L. A. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. **J Clin Invest**, v. 99, p. 31, 1997.

LINDBERG, R. L.; HOFFMANN, F.; MEHLING, M.; KUHLE, J.; KAPPOS, L. Altered expression of miR-17-5p in CD4⁺ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. **Eur J Immunol**, v. 40, p. 888, 2010.

LIU, W.; PUTNAM, A. L.; XU-YU, Z.; SZOT, G. L.; LEE, M. R.; ZHU, S.; GOTTLIEV, P. A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T. R.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D. M.; ZIEGLER, S. F.; BLUESTONE, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. **J Exp Med**, v. 203, p. 1701, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402, 2001.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; FRIEDMAN, H.; MARTINS, C. R.; SANCHES, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMAN, R. G.; DIAZ, L. A. The cooperative group on Fogo selvagem Research. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**, v. 98, p. 847, 1992.

LU, L. F.; LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. **Immunology**, v. 127, p. 291, 2009.

MACKAY, F.; LEUNG, H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. **Semin Immunol**, v. 18, p. 284, 2006.

MALHEIROS, D. **Análise do perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ aplicada ao estudo da doença autoimune pênfigo foliáceo endêmico**. 92 f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes Immun**, v. 10, p. 547, 2009.

MELLANBY, R. J.; THOMAS, D. C.; LAMB, J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, p. 639, 2009.

MOESTA, A. K.; LIN, M. S.; DIAZ, L. A.; SINHA, A. A. T cell receptor Beta chain gene usage in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**, v. 119, p. 377, 2002.

NAKASA, T.; MIYAKI, S.; OKUBO, A.; HASHIMOTO, M.; NISHIDA, K.; OCHI, M.; ASAHARA, H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 1284, 2008.

PAN, W.; ZHU, S.; YUAN, M.; CUI, H.; WANG, L.; LUO, X.; LI, J.; ZHOU, H.; TANG, Y.; SHEN, N. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. **J Immunol**, v. 184, p. 6773, 2010.

PANG, K. C.; FRITH, M. C.; MATTICK, J. S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. **Trends Genet**, v. 22, p. 1, 2006.

PASQUINELLI, A. E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M. Q.; KURODA, M. I.; MALLER, B.; HAYWARD, D. C.; BALL, E. E.; DEGNAN, B.; MÜLLER, P.; SPRING, J.; SRINIVASAN, A.; FISHMAN, M.; FINNERTY, J.; CORBO, J.; LEVINE, M.; LEAHY, P.; DAVIDSON, E.; RUVKUN, G. Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, p. 86, 2000.

PAULEY, K. M.; SATOH, M.; CHAN, A. L.; BUBB, M. R.; REEVES, W. H.; CHAN, E. K. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Res Ther**, v. 10, p. 101, 2008.

PAULEY, K. M.; CHA, S.; CHAN, E. K. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. **J Autoimmun**, v. 32, p. 189, 2009.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M.; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes Immun**, v. 4, p. 110, 2003.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M. T.; ROXO, V. M.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER M. L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, p. 233, 2004.

PEREIRA, E.; TAMIA-FERREIRA, M. C.; CARDOSO, R. S.; MELLO, S. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; PASSOS, G. A. S.; DONADI, E. A. Immunosuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 113, p. 99, 2004.

PETZL-ERLER, M. L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, p. 408, 1989.

PETZL-ERLER, M. L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: Is there any relationship? **J Autoimmun**, v. 25, p. 121, 2005.

PORTNOY, V.; HUANG, V.; PLACE, R. F.; LI, L. C. Small RNA and transcriptional upregulation. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 2, p. 748, 2011.

RENSING-EHL, A.; GAUS, B.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; MARTIN, S. F. Frequency, function and CLA expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in bullous pemphigoid. **Exp Dermatol**, v. 16, p. 13, 2007.

RODRIGUEZ, A.; VIGORITO, E.; CLARE, S.; WARREN, M. V.; COUTTET, P.; SOOND, D. R.; VAN DONGEN, S.; GROCOCK, R. J.; DAS, P. P.; MISKA, E. A.; VETRIE, D.; OKKENHAUG, K.; ENRIGHT, A. J.; DOUGAN, G.; TURNER, M.; BRADLEY, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, v. 316, p. 608, 2007.

ROXO, V. M.; PEREIRA, N. F.; PAVONI, D. P.; LIN, M. T.; HANSEN, J. A.; DE O POERSCH, C.; FILHO, A. M.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? **Tissue Antigens**, v. 62, p. 394, 2003.

STANCZYK, J.; PEDRIOLI, D. M.; BRENTANO, F.; SANCHEZ-PERNAUTE, O.; KOLLING, C.; GAY, R. E.; DETMAR, M.; GAY, S.; KYBURZ, D. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 1001, 2008.

SUGIYAMA, H.; MATSUE, H.; NAGASAKA, A.; NAKAMURA, Y.; TSUKAMOTO, K.; SHIBAGAKI, N.; KAWAMURA, T.; KITAMURA, R.; ANDO, N.; SHIMADA, S. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. **Dermatology**, v. 214, p. 210, 2007.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, p. 725, 2008.

TANG, Y.; LUO, X.; CUI, H.; NI, X.; YUAN, M.; GUO, Y.; HUANG, X.; ZHOU, H.; DE VRIES, N.; TAK, P. P.; CHEN, S.; SHEN, N. MicroRNA-146A contributes to abnormal

activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. **Arthritis Rheum**, v. 60, p. 1065, 2009.

TSAI, L. M.; YU, D. MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, p. 102, 2010.

VELDMAN, C.; HÖHNE, A.; DIECKMANN, D.; SCHULER, G.; HERTL, M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. **J Immunol**, v. 172, p. 6468, 2004.

VELDMAN, C.; PAHL, A.; BEISSERT, S.; HANSEN, W.; BUER, J.; DIECKMANN, D.; SCHULER, G.; HERTL, M. Inhibition of Foxp3 converts Dsg-3-specific Tr1 cells into Th2-like cells. **J Immunol**, v. 176, p. 3215, 2006.

VIGORITO, E.; PERKS, K. L.; ABREU-GOODGER, C.; BUNTING, S.; XIANG, Z.; KOHLHAAS, S.; DAS, P. P.; MISKA, E. A.; RODRIGUEZ, A.; BRADLEY, A.; SMITH, K. G.; RADA, C.; ENRIGHT, A. J.; TOELLNER, K. M.; MACLENNAN, I. C.; TURNER, M. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. **Immunity**, v. 27, p. 847, 2007.

WALKER, M. R.; KASPROWICZ, D. J.; GERSUK, V. H.; BENARD, A.; VAN LANDEGHEN, M.; BUCKNER, J. H.; ZIEGLER, S. F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1437, 2003.

WARREN, S. J.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; HOFFMANN, R. G.; HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SANTOS, V.; DIAZ, L. A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **N Engl J Med**, v. 343, p. 23-30, 2000.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, p. 855, 1993.

YI, R.; POY, M. N.; STOFFEL, M.; FUCHS, E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. **Nature**, v. 452, p. 225, 2008.

ZIBERT, J. R.; LØVENDORF, M. B.; LITMAN, T.; OLSEN, J.; KACZKOWSKI, B.; SKOV, L. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. **J Dermatol Sci**, v. 58, p. 177, 2010.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: Of Mice and Men. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 209, 2006.

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e caracterização da amostra

Amostras de 40 mL de sangue periférico de pacientes foram obtidas, por venopunção, no Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande-MS, e em coletas semanais feitas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba-PR.

A participação dos pacientes se deu de forma voluntária, com livre consentimento e preenchimento de ficha averiguação (ANEXO I). Foram coletadas amostras de sangue apenas de pacientes diagnosticados por exames clínicos e laboratoriais adequados, como coleta e análise de biópsia de lesão e titulação dos níveis de anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg-3.

Este trabalho se insere no projeto maior intitulado “Aspectos genéticos e imunológicos da doença autoimune pênfigo foliáceo”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEP-Biológicas), sob registro de número 020-05.

A amostra é composta por 6 pacientes de PF com lesão ativa sob tratamento imunossupressor (PF/LAT), 4 pacientes de PF sem lesão sob tratamento imunossupressor (PF/SLT), 3 pacientes de PF em remissão (PF/REM) e 5 controles sadios (CTL) (TABELA 1).

TABELA 1 – Caracterização da amostra.

CÓDIGO	SEXO	IDADE	LESÃO	TRATAMENTO	REMISSÃO	COLETA	IDENTIFICAÇÃO
P348NPS	M	47	+	+	–	HC/PR	PF/LAT 1
P349CPP	F	31	+	+	–	HAP/MS	PF/LAT 2
P351VRF	M	32	+	+	–	HAP/MS	PF/LAT 3
P353JME	M	66	+	+	–	HAP/MS	PF/LAT 4
P358EES	F	50	+	+	–	HAP/MS	PF/LAT 5
P359RSG	F	25	+	+	–	HAP/MS	PF/LAT 6
PK236ECC	F	41	–	+	–	HAP/MS	PF/SLT 1
P266RMS	F	27	–	+	–	HAP/MS	PF/SLT 2
P350FBL	F	31	–	+	–	HAP/MS	PF/SLT 3
P352UDS	M	14	–	+	–	HAP/MS	PF/SLT 4
P242NRS	F	59	–	–	30 anos	HAP/MS	PF/REM 1
P243ERS	M	67	–	–	30 anos	HAP/MS	PF/REM 2
P316VRS	M	71	–	–	10 anos	HAP/MS	PF/REM 3
C630ILB	F	70	–	–	–	HAP/MS	CTL 1
C664AFO	M	29	–	–	–	HAP/MS	CTL 2
C687KOA	M	45	–	–	–	HAP/MS	CTL 3
043MLP	F	58	–	–	–	HC/PR	CTL 4
369GAC	M	24	–	–	–	HC/PR	CTL 5

Legenda: sexo masculino (M) ou feminino (F); idade em anos; lesão ativa (+) ou sem lesão (–); sob tratamento (+) ou sem tratamento (–); coleta no Hospital Adventista do Pênfigo, MS, (HAP/MS) ou no Hospital de Clínicas, PR, (HC/PR); identificação do indivíduo pertencente à subamostra de pênfigo foliáceo com lesão ativa sob tratamento (PF/LAT), pênfigo foliáceo sem lesão ativa sob tratamento (PF/SLT), pênfigo foliáceo em remissão (PF/REM) ou controle (CTL).

Critérios para escolha dos microRNA candidatos

A escolha dos microRNA de interesse no contexto do pênfigo se deu em várias etapas, seguindo os critérios apresentados. Primeiramente, fez-se um levantamento de genes associados geneticamente ao PF e de genes diferencialmente expressos, com prioridade para aqueles de função menos geral em respostas imunes e mais

característica dos mecanismos subjacentes ao PF. Para tal, resultados obtidos nos vários anos de estudo da equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana, do Departamento de Genética da UFPR, foram consultados, incluindo um dos trabalhos mais recentes do grupo, em que foi estabelecido o perfil de expressão global da doença (MALHEIROS, 2009).

Em seguida, por meio do *software on-line* TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), um dos principais programas disponíveis para verificar potenciais alvos de microRNA, elaborou-se uma lista de mais de 300 miRNA que possivelmente regulam os genes de interesse, isto é, os de associação genética e diferencialmente expressos em PF.

Para reduzir esta lista, critérios arbitrários foram usados. O primeiro deles, que mantém apenas microRNA que potencialmente regulam três ou mais genes de interesse, reduziu a lista para 90. O segundo critério baseou-se na probabilidade de um miRNA regular um gene de interesse específico, sendo esta probabilidade maior quanto menor for o *context score*, um valor calculado pelo TargetScan com base em vários aspectos da complementaridade miRNA:RNAm de interesse. Assim, microRNA com *context scores* superiores a -0,2 foram excluídos, com exceção daqueles que, independentemente deste escore, fossem potenciais reguladores de pelo menos 4 genes de interesse. Com este critério, o número de microRNA foi reduzido para 52. Em terceiro, foram mantidos aqueles que regulam principalmente genes altamente expressos em pacientes em relação aos controles e genes com forte associação genética, resultando numa lista de 20 microRNA.

Finalizando, miR-145, miR-148a, miR-155, miR-338-5p e miR-1321 foram selecionados para este estudo após comparar a lista de 20 microRNA com dados da literatura específica. Aqueles diferencialmente expressos em outras doenças autoimunes ou importantes para a hematopoiese e função de células do sistema imune foram escolhidos, à exceção de miR-1321, para o qual não há informações na literatura, mas é provável regulador de BLYS, associado geneticamente e diferencialmente expresso em PF, além de um atual alvo de terapia por anticorpos em outras doenças autoimunes.

Obtenção de células B CD19⁺ e de memória IgG, T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e Th2 CD4⁺CD294⁺ a partir de PBMC

A partir de 40mL de sangue periférico de pacientes e controles, foram obtidas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após centrifugação em barreira de densidade em HISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA), sempre 30 horas após a coleta do material. O protocolo utilizado para a obtenção de PBMC (ANEXO II) foi adaptado a partir do manual deste produto e de sugestões dos manuais dos *kits* usados para as separações celulares feitas à jusante desta etapa.

A partir de PBMC, fez-se o isolamento das células de interesse por meio de sucessivas seleções positivas usando esferas magnéticas (*microbeads*) acopladas ao anticorpo específico para o tipo celular (FIGURA 7). Para o isolamento de células B CD19⁺ e de memória IgG, células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e células Th2 CD4⁺CD294⁺, foram usados *CD19 MultiSort Kit + Anti-IgG MicroBeads*, *CD25 MicroBeads II* e *CD294 (CRTH2) MicroBead Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), respectivamente, sendo que, para os dois últimos, o *CD4 MultiSort Kit* (Miltenyi Biotec) foi empregado como primeiro parâmetro de seleção para obtenção de células CD4⁺. O complexo protocolo para o isolamento das subpopulações celulares de interesse (ANEXO III) foi desenvolvido a partir de sugestões dos técnicos da Miltenyi Biotec e de diversos testes realizados no laboratório.

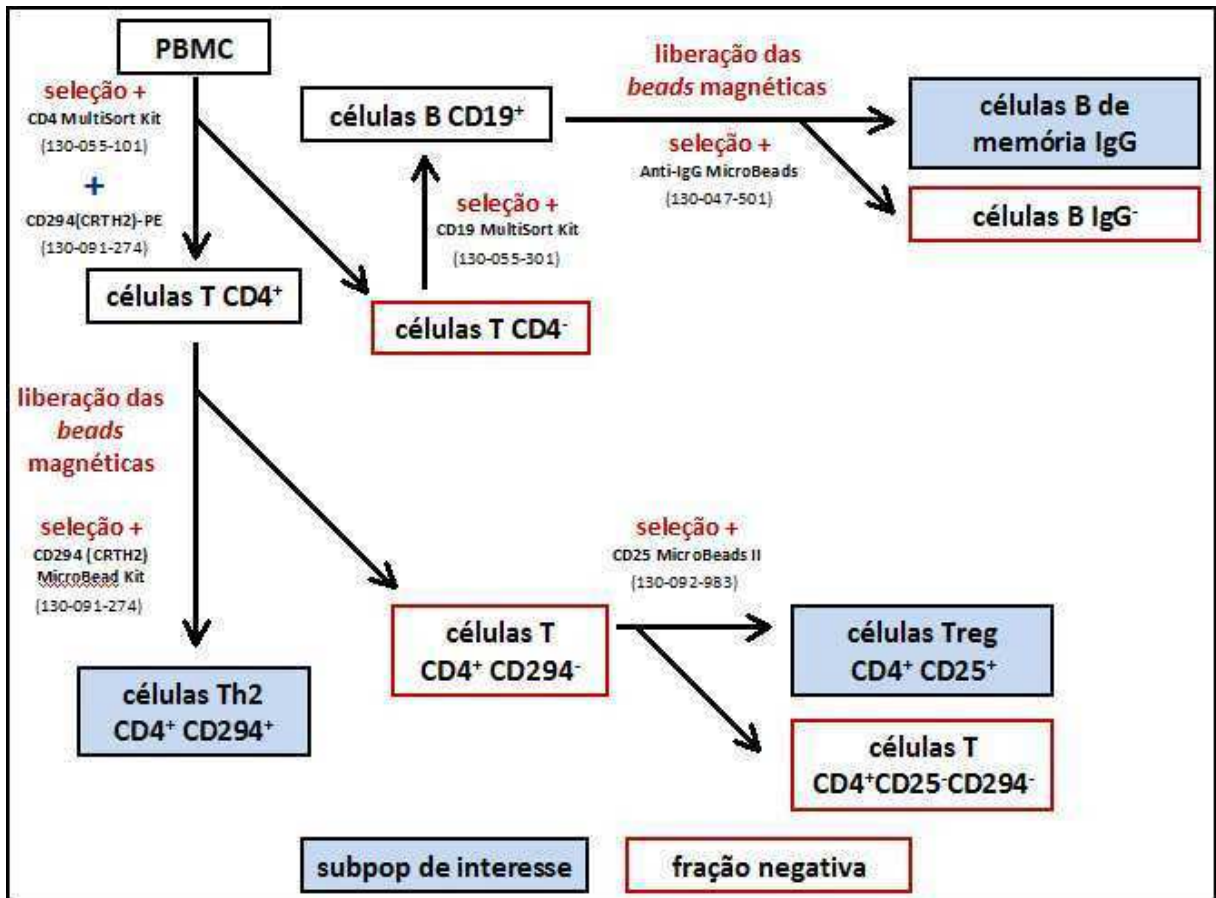


FIGURA 7 – Fluxo de trabalho para isolamento de células B CD19⁺ e de memória IgG, células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e células Th2 CD4⁺CD294⁺.

A pureza de todas as subpopulações celulares obtidas foi determinada por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur (BD Biosciences), a partir de alíquotas separadas após cada separação.

Extração de RNA

O RNA das subpopulações celulares isoladas a partir de PBMC foi extraído com o *mirVana*TM *miRNA Isolation kit* (Ambion, Austin, TX, USA), de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Obteve-se, assim, uma fração enriquecida em RNA inferiores a 200 pares de base, que inclui microRNA. Esta fração foi obtida após

extração do RNA total, reservando-se a fração rica em RNA mensageiro para posterior validação dos resultados.

Para verificar a pureza e quantidade da fração enriquecida em microRNA, foi medida a densidade óptica por absorbância no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). Foram consideradas amostras suficientemente puras aquelas cuja razão entre os valores para a densidade óptica a 260 e 280 nm foi de no mínimo 1,6, indicando baixa contaminação por proteínas. A razão média 260/280 nm de todas as amostras utilizadas foi de 1,65. As medidas de quantidade de material, dadas em ng/ μ L, foram usadas para produzir soluções uso a 1 ng/ μ L.

Para verificar a qualidade em termos de integridade da fração enriquecida em microRNA, 10 ng de cada amostra foi aplicada e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, seguindo as condições estabelecidas pelo fabricante do *mirVana*TM *miRNA Isolation kit* (Ambion).

Quantificação por PCR-RT em tempo real

Para a análise de expressão dos 6 miRNA já citados, fez-se uso dos *TaqMan*[®] *MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que, juntamente com *TaqMan*[®] *MicroRNA Reverse Transcription Kit* e *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems), permitem a transcrição reversa do microRNA em cDNA e a quantificação por PCR em tempo real (qPCR-RT). Para a transcrição reversa, foi usado 2,5 ng da fração enriquecida em miRNA. As concentrações de reagentes e condições de ciclagem para transcrição reversa e amplificação foram as mesmas que aquelas sugeridas pelo fabricante.

Para normalização das diferenças dos níveis de microRNA, foi utilizado RNU44, um RNA nuclear pequeno amplamente utilizado como controle endógeno para análises de expressão de microRNA.

Todas as reações foram feitas em duplicatas (Mastercycler Realplex 2S, Eppendorf), constando em uma única placa de PCR toda a amostra para quantificação de um microRNA e do controle endógeno para uma subpopulação celular (ANEXO IV).

Análise estatística

O ciclo de limiar (ou Ct, do inglês *cycle threshold*), correspondente ao ciclo de PCR em que a emissão de fluorescência atinge um limite acima da emissão de fundo, foi determinado automaticamente na fase exponencial de amplificação e utilizado para calcular a média aritmética dos Ct de cada duplicata ($Ct_{\text{médio}}$). Para determinar os níveis de expressão relativa dos miRNA, utilizaram-se os $Ct_{\text{médio}}$ e o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que compara a emissão de fluorescência de PCR de um transcrito alvo de uma amostra de paciente, por exemplo, com aquela de uma amostra controle (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para a análise estatística dos dados, os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram usados para comparar todas as amostras juntas e as amostras tomadas duas a duas, respectivamente. As análises foram feitas por meio do programa GraphPad Prism versão 5.04. O valor de $P = 0,05$ foi considerado como o limite de significância. Todas as análises estatísticas foram feitas considerando distribuições bilaterais, com exceção dos testes para miR-155, que foi considerado *a priori* como superexpresso em PF, como descrito em outras doenças autoimunes quando diferencialmente expresso (LENG *et al.*, 2011). Neste caso presumiu-se uma distribuição unilateral.

ANEXO I

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	Nº DO PRONTUÁRIO	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

1) IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)

(2) casado(a) (5) Outros: _____

(3) viúvo(a)

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Município: _____ UF: ____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____

Município: _____ UF: ____ Próximo a: _____

Nome, telefone e endereço de pessoa para contato: _____

Municípios onde residiu:

Município	Tempo de residência	Exposição a (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	Obs.

Código: (1) Animais, (2) Insetos, (3) Rios, (4) Lavouras

Grupo étnico:

(1) Branco	(5) Negro	Obs.: _____ _____ _____
(2) Mulato-claro	(6) Indígena	
(3) Mulato-médio	(7) Oriental	
(4) Mulato-escuro	(8) Branco brasileiro	

Escolaridade: _____ anos completos de estudo

Grau de instrução: (1) Analfabeto (5) Médio completo
 (2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto
 (3) Fundamental completo (7) Superior completo
 (4) Médio incompleto (8) Pós-graduação

História ocupacional:

Emprego/Ocupação	Período	Obs.

2) EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

Agente	Período	Frequência (vezes por semana)	Obs.

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: _____

Nº de cômodos: _____

Nº banheiros: _____

Saneamento básico: (1) Sim (2) Não

Energia elétrica: (1) Sim (2) Não

Nº de pessoas que vivem na habitação: _____

3) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Pais consanguíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)

Número de irmãos - total: _____

Número de irmãos vivos: _____

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não

Ordem de nascimento dos irmãos:

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? _____

Quantos filhos nasceram vivos? _____

Quantos filhos nasceram mortos? _____

Algum aborto (perca)? _____

Alguém na família tem a mesma doença? (1) Sim (2) Não

Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)

A doença foi semelhante à sua? (1) Sim (2) Não

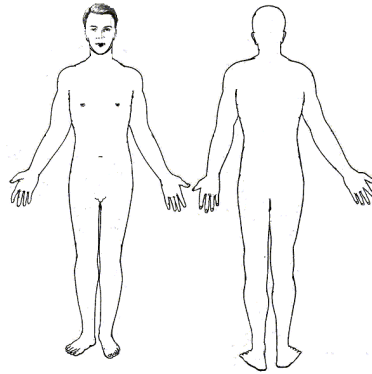
Caso não seja semelhante, especificar abaixo a diferença:

4) ASPECTOS CLÍNICOS

LESÕES

Apresenta lesões no momento da coleta? (1) Sim (2) Não

Região do corpo: marcar os lugares em que há lesões ativas.



EVOLUÇÃO DAS LESÕES

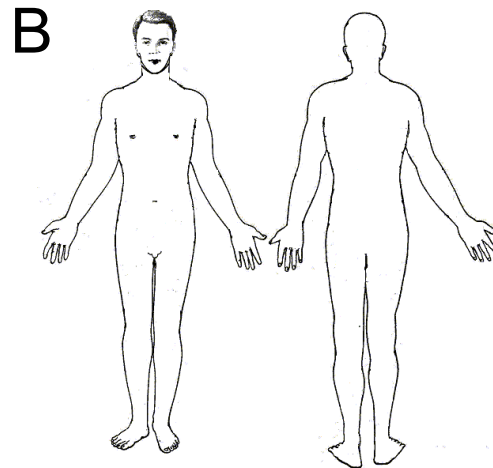
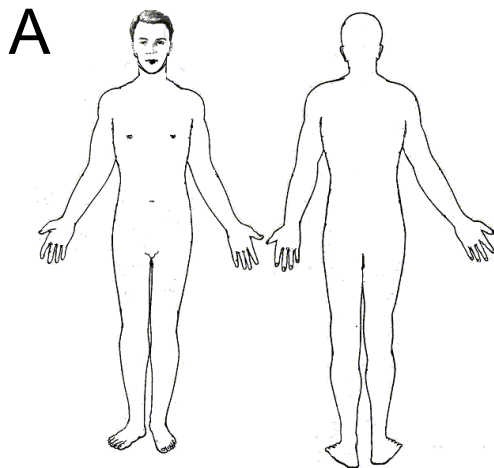
Município em que apareceu a lesão primária: _____

Idade: _____ Ano: _____ Mês do ano em que apareceu: _____

A lesão se disseminou? (1) Sim (2) Não

Utilize os esquemas abaixo para mostrar: **A)** lesão primária; **B)** evolução em ordem crescente (ex: 1 marca o lugar onde surgiram novas lesões, 2 o segundo e assim sucessivamente).

Utilizar a mesma chave numérica na tabela abaixo.



Local (usar número colocado no esquema acima)	Tempo após lesão primária
1	
2	
3	
4	

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Base do diagnóstico: (1) Informações clínicas (2) Histopatológico (3) Imunohistoquímica

Pênfigo Vulgar () Pênfigo Foliáceo ().

Local do diagnóstico - Instiuição: _____ Município: _____ UF: _____

Informações adicionais sobre diagnóstico:

(1) Informações clínicas: _____

(2) Histopatológico: _____

(3) Imunohistoquímica: _____

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

Anticorpo	Data	Título

TRATAMENTO ATUAL DE PÊNFIGO

1- Prednisona _____ Dose _____ Posologia _____ Início _____

2- Azatioprina _____ Dose _____ Posologia _____ Início _____

3- Outro _____ Dose _____ Posologia _____ Início _____

TRATAMENTOS ANTERIORES DE PÊNFIGO

Medicamento	Dose	Via de administração (usar código abaixo)	Posologia	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

Houve interrupção do tratamento? (1) Sim (2) Não

Interrupção no tratamento:

1- Prednisona () Sim () Não Tempo: _____ Motivo: _____

2- Azatioprina () Sim () Não Tempo: _____ Motivo: _____

3- Outro () Sim () Não Tempo: _____ Motivo: _____

OUTROS MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

OUTRAS DOENÇAS:

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

HÁBITOS ALIMENTARES

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

ANEXO II

OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

- 1) Transferir o sangue sem plasma para um tubo falcon;
- 2) Adicionar 2 a 4 vezes de PBS 1X ao volume de sangue (para 20mL de sangue sem plasma, 60mL de PBS 1X);
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Adicionar a solução de sangue + PBS lentamente e com muito cuidado sobre a solução de HISTOPAQUE[®]-1077 aliquotada em tubo falcon (para cada 100mL de sangue + PBS, 20mL de HISTOPAQUE[®]-1077);
- 5) Centrifugar por 30 min a 2000 rpm (corresponde aproximadamente a 400 xg);
Obs.: centrifugação a temperatura ambiente e com freios desligados.
- 6) Retirar a fase correspondente ao plasma diluído a partir da superfície, parando cerca de 0,5 cm antes do anel de PBMC;
- 7) Retirar a fase com plasma diluído (0,5cm) + anel de PBMC com cuidado para não pegar hemácias, transferindo a fase para um tubo falcon novo de 50mL;
- 8) Lavar com solução de enxágue MACS (Miltenyi Biotec), completando até 50mL e homogeneizar bem;
- 9) Centrifugar por 10 min a 1400 rpm (corresponde aproximadamente a 200 xg) para remoção de plaquetas;
Obs.: a partir daqui, refrigerar centrifuga entre 4 e 8°C e religar freios;
- 10) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em volume pequeno de PBS 1X;
- 11) Ressuspender em 20 a 40mL de PBS 1X e retirar uma alíquota para contagem (50µL), uma para verificação de viabilidade (100µL) e 300 mil células para verificação de pureza no citômetro;
- 12) Completar logo em seguida até 50mL para finalizar 2ª lavagem;
- 13) Centrifugar por 10 min a 1700 rpm (corresponde aproximadamente a 300 xg);
- 14) Aspirar sobrenadante e retirar o que restar com auxílio de micropipeta com cuidado para não aspirar células;

- 15) Ressuspender *pellet* em 100µL de beads magnéticos para remoção de células mortas (*Dead Cell Removal Kit*, Miltenyi Biotec) para cada 10^7 células;
- 16) Homogeneizar bem;
- 17) Incubar a temperatura ambiente por 15 min;
- 18) Lavar com 1 a 10mL de tampão de ligação 1X para cada 10^7 células;
Obs.: tampão de ligação 1X preparado em condições estéreis a partir da solução estoque do tampão de ligação 20X (*Dead Cell Removal Kit*, Miltenyi Biotec).
- 19) Posicionar a coluna no magneto;
- 20) Hidratar a coluna com 3mL de tampão de ligação 1X;
- 21) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 22) Quando a amostra terminar de passar, lavar 4 vezes com 3mL de tampão de ligação 1X, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 23) Recuperar efluente (fração de células vivas) e retirar uma alíquota para contagem (50µL) e outra para verificação de viabilidade (100µL) (fator de diluição: 15mL);
- 24) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 25) Aspirar sobrenadante.

ANEXO III

OBTENÇÃO DE CÉLULAS B CD19⁺ E DE MEMÓRIA IgG, T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺ E Th2 CD4⁺CD294⁺ A PARTIR DE PBMC

- 1) Ressuspender *pellet* em 80µL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células em tubo falcon de 14mL;
- 2) Adicionar 20µL de beads magnéticos CD4 MultiSort para cada 10⁷ células;
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Incubar por 5 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 5) Adicionar 20µL do reagente de bloqueio FcR e 10µL de anticorpo CD294(CRTH2)-PE para cada 10⁷ células;
- 6) Homogeneizar bem;
- 7) Incubar por mais 10 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 8) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células;
- 9) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 10) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2 x 10⁸ células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2 x 10⁹ células totais e de até 10⁸ células positivas.

- 11) Posicionar a coluna no magneto;
- 12) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 13) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 14) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 15) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 16) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 17) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

- 18) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 19) Retirar uma alíquota de 50µL para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 200 mil células CD4⁺ para verificação de pureza da separação;
- 20) Reservar (ou processar em paralelo) a fração negativa (CD4⁻) para obtenção de células B CD19⁺IgG de memória (passo 64);
- 21) Centrifugar a fração positiva (CD4⁺) por 5 min a 2500 rpm;
- 22) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 1mL de solução de enxágue MACS;
- 23) Adicionar 20µL do reagente de liberação MultiSort para cada mL de células;
- 24) Incubar por 10 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 25) Passar amostra numa coluna LS nova para remover células ainda marcadas com as *beads* e recuperar efluente (pode-se recuperar também as células retidas na coluna LS e adicioná-las a alíquota de células CD4⁺ para extração de DNA/RNA para o projeto de análise de metilação);
- 26) Centrifugar efluente por 5 min a 2500 rpm;
- 27) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 50µL de solução de enxágue MACS;
- 28) Adicionar 30µL do reagente de parada MultiSort para cada 10⁷ células;
- 29) Homogeneizar bem;
- 30) Adicionar 20µL de *beads* magnéticos Anti-PE (CD294(CRTH2) MicroBead Kit) para cada 10⁷ células;
- 31) Homogeneizar bem;
- 32) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 33) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células;
- 34) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 35) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2 x 10⁸ células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

- 36) Posicionar a coluna no magneto;
- 37) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 38) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 39) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 40) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 41) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 42) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

- 43) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 44) Retirar uma alíquota de 50 μ L para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 100 mil células CD4⁺CD294⁺ para verificação de pureza da separação;
- 45) Reservar a fração positiva (CD4⁺CD294⁺) para posterior lise (homogeneização para extração de RNA) e continuar processando a fração negativa para obtenção de células CD4⁺CD294⁻CD25⁺;
- 46) Centrifugar a fração negativa (CD4⁺CD294⁻) por 5 min a 2500 rpm;
- 47) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 90 μ L de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 48) Adicionar 10 μ L de beads magnéticos CD25 MicroBeads II para cada 10^7 células;
- 49) Homogeneizar bem;
- 50) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 51) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 52) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;

53) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2×10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

54) Posicionar a coluna no magneto;

55) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;

56) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;

57) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;

58) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;

59) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;

60) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

61) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;

62) Retirar uma alíquota de 50 μ L para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 100 mil células CD4⁺ CD294⁻CD25⁺ para verificação de pureza da separação;

63) Reservar as frações positiva (CD4⁺CD294⁻CD25⁺) e negativa (CD4⁺CD294⁻CD25⁻) para posterior lise (homogeneização para extração de RNA) e recuperar a fração negativa CD4⁻ para obtenção de células B CD19⁺IgG de memória;

64) Centrifugar a fração negativa (CD4⁻) por 5 min a 2500 rpm;

65) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 80 μ L de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;

66) Adicionar 20 μ L de beads magnéticos CD19 MultiSort para cada 10^7 células;

67) Homogeneizar bem;

68) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);

69) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;

70) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;

71) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2×10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

72) Posicionar a coluna no magneto;

73) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;

74) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;

75) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;

76) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;

77) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;

78) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

79) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;

80) Retirar uma alíquota de 50 μ L para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 200 mil células CD19⁺ para verificação de pureza da separação;

81) Congelar a -20°C a fração negativa (CD19⁻) para extração de DNA;

82) Centrifugar a fração positiva (CD19⁺) por 5 min a 2500 rpm;

83) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 1mL de solução de enxágue MACS;

84) Adicionar 20 μ L do reagente de liberação MultiSort para cada mL de células;

85) Incubar por 10 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);

86) Passar amostra numa coluna LS nova para remover células ainda marcadas com as *beads* e recuperar efluente;

87) Centrifugar efluente por 5 min a 2500 rpm;

- 88) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 1mL de tampão acetato de sódio, pH 3,5, para remover receptor Fc ligado a IgG;
- 89) Incubar a temperatura ambiente por 3 min;
- 90) Lavar com 1mL de solução de enxágue MACS;
- 91) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 92) Aspirar sobrenadante e lavar novamente com 1mL de solução de enxágue MACS;
- 93) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 94) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 50µL de solução de enxágue MACS;
- 95) Adicionar 30µL do reagente de parada MultiSort para cada 10^7 células;
- 96) Homogeneizar bem;
- 97) Adicionar 20µL de beads magnéticos Anti-IgG humana para cada 10^7 células;
- 98) Homogeneizar bem;
- 99) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 100) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 101) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 102) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2×10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

- 103) Posicionar a coluna no magneto;
- 104) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 105) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 106) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 107) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 108) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 109) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

110) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;

111) Retirar uma alíquota de 50 μ L para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 100 mil células B CD19⁺IgG de memória para verificação de pureza da separação;

112) Reservar as frações positiva (CD19⁺IgG de memória) e negativa (CD19⁺IgG⁻) para posterior lise (homogeneização para extração de RNA).

ANEXO IV

ANATOMIA DAS PLACAS DE qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTR 1	CTR 2	C-qPCR 1	C-qPCR 2								
B	CTL 1 miR-146a Th2 I	CTL 1 miR-146a Th2 II	CTL 2 miR-146a Th2 I	CTL 2 miR-146a Th2 II	CTL 3 miR-146a Th2 I	CTL 3 miR-146a Th2 II	CTL 4 miR-146a Th2 I	CTL 4 miR-146a Th2 II	CTL 5 miR-146a Th2 I	CTL 5 miR-146a Th2 II		
C	CTL 1 RNU6B Th2 I	CTL 1 RNU6B Th2 II	CTL 2 RNU6B Th2 I	CTL 2 RNU6B Th2 II	CTL 3 RNU6B Th2 I	CTL 3 RNU6B Th2 II	CTL 4 RNU6B Th2 I	CTL 4 RNU6B Th2 II	CTL 5 RNU6B Th2 I	CTL 5 RNU6B Th2 II		
D	PF/LAT 1 miR-146a Th2 I	PF/LAT 1 miR-146a Th2 II	PF/LAT 2 miR-146a Th2 I	PF/LAT 2 miR-146a Th2 II	PF/LAT 3 miR-146a Th2 I	PF/LAT 3 miR-146a Th2 II	PF/LAT 4 miR-146a Th2 I	PF/LAT 4 miR-146a Th2 II	PF/LAT 5 miR-146a Th2 I	PF/LAT 5 miR-146a Th2 II	PF/LAT 6 miR-146a Th2 I	PF/LAT 6 miR-146a Th2 II
E	PF/LAT 1 RNU6B Th2 I	PF/LAT 1 RNU6B Th2 II	PF/LAT 2 RNU6B Th2 I	PF/LAT 2 RNU6B Th2 II	PF/LAT 3 RNU6B Th2 I	PF/LAT 3 RNU6B Th2 II	PF/LAT 4 RNU6B Th2 I	PF/LAT 4 RNU6B Th2 II	PF/LAT 5 RNU6B Th2 I	PF/LAT 5 RNU6B Th2 II	PF/LAT 6 RNU6B Th2 I	PF/LAT 6 RNU6B Th2 II
F	PF/SLT 1 miR-146a Th2 I	PF/SLT 1 miR-146a Th2 II	PF/SLT 2 miR-146a Th2 I	PF/SLT 2 miR-146a Th2 II	PF/SLT 3 miR-146a Th2 I	PF/SLT 3 miR-146a Th2 II	PF/SLT 4 miR-146a Th2 I	PF/SLT 4 miR-146a Th2 II	CTR 3	Subamost. microRNA Subpo.cel.	Subamost. microRNA Subpo.cel.	Controle de Transc. Reversa 3
G	PF/SLT 1 RNU6B Th2 I	PF/SLT 1 RNU6B Th2 II	PF/SLT 2 RNU6B Th2 I	PF/SLT 2 RNU6B Th2 II	PF/SLT 3 RNU6B Th2 I	PF/SLT 3 RNU6B Th2 II	PF/SLT 4 RNU6B Th2 I	PF/SLT 4 RNU6B Th2 II	C-qPCR 3	Subamost. cont. end. Subpo.cel.	Subamost. cont. end. Subpo.cel.	Controle. Negativo de qPCR 3
H	PF/REM 1 miR-146a Th2 I	PF/REM 1 miR-146a Th2 II	PF/REM 2 miR-146a Th2 I	PF/REM 2 miR-146a Th2 II	PF/REM 3 miR-146a Th2 I	PF/REM 3 miR-146a Th2 II	PF/REM 1 RNU6B Th2 I	PF/REM 1 RNU6B Th2 II	PF/REM 2 RNU6B Th2 I	PF/REM 2 RNU6B Th2 II	PF/REM 3 RNU6B Th2 I	PF/REM 3 RNU6B Th2 II

→ duplicata I

→ duplicata II