

Processo epigenéticos envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla com ênfase na função dos miRNAs

Epigenetic process involved in multiple sclerosis pathophysiology with emphasis in miRNAs function

Mirian Krystel Siqueira¹ ; Liliane Pires²

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa autoimune do sistema nervoso central (SNC). A fisiopatologia caracteriza-se por intensa atividade inflamatória e envolvimento de células do sistema imune (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B); células da glia e uma desregulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Atualmente a sua etiologia permanece desconhecida e acredita-se que os fatores ambientais e uma predisposição genética sejam os responsáveis pela autoimunidade. Discrepâncias em padrões de herança genética da doença, prevalência de gênero e baixa taxa de concordância entre gêmeos homozigotos sugerem a atuação de processos epigenéticos na esclerose múltipla. Os processos epigenéticos são responsáveis pela expressão gênica sem ocasionar uma alteração no código genético e são altamente sensíveis a variações do meio ambiente. Ademais são preservados entre divisões celulares e interferem em diferentes processos biológicos; porém podem ser revertidos. Os três processos mais bem estudados são a metilação de DNA, a acetilação de histonas e o silenciamento gênico por miRNAs. Os miRNAs especificamente vem sendo alvo de pesquisas uma vez que regulam um terço da expressão gênica em mamíferos. Esses pequenos segmentos de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos têm elucidado diversos aspectos da EM e parecem interagir e regular células do sistema imune e do SNC; podendo vir a se tornar valiosos biomarcadores para a mesma.

Palavras chave: MicroRNA. Esclerose múltipla. Regulação gênica. Processos epigenéticos. Autoimunidade.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative autoimmune disease of the central nervous system (CNS). The pathophysiology is characterized by intense inflammatory activity and involvement of immune cells (CD4 +, CD8 + and B cells); glial cells and disrupted permeability of the blood brain barrier (BBB). Currently, its etiology remains unknown; it is believed that environmental factors and genetic predisposition are responsible for the autoimmunity. Discrepancies in genetic inheritance patterns of disease, prevalence of gender and low concordance rate between homozygous twins suggest participation of epigenetic processes in multiple sclerosis. Epigenetic processes are responsible for gene expression without causing changes in the genetic code and are highly sensitive to environmental variations. In addition, they are preserved between cell division and interfere in different biological processes; however, they can be reversed. The three most studied processes are DNA methylation, histone acetylation and gene silencing by miRNAs. miRNAs are specifically being studied since they regulate one third of gene expression in mammals. These small RNA segments of approximately 22 nucleotides have elucidated several aspects of MS and seem to interact and regulate immune system and CNS; they may become valuable biomarkers for that disease.

Keyword: MicroRN. Multiple sclerosis. Gene regulation. Epigenetic process. Autoimmunity.

¹ Biomédica formada pela Universidade Tuiuti do Paraná. E-mail: mks.siqueira@gmail.com

² Mestre em Ciências (Bioquímica) pela Universidade Federal do Paraná. Professora da Universidade Tuiuti do Paraná. E-mail: liliane.acupuntura@gmail.com

Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória e neurodegenerativa crônica que afeta o sistema nervoso central (KOCH; METZ; KOVALCHUK, 2013). Sua etiologia permanece obscura, mas acredita-se que diversos fatores estejam envolvidos, como os genéticos e os ambientais. Dentre os fatores hereditários, os genes codificadores de MHC II, de moléculas do sistema imunológico e os que controlam os sistemas neurobiológicos estão altamente relacionados com o aparecimento desta patologia. Por outro lado, os fatores ambientais como agentes infecciosos (principalmente vírus), dieta e tabagismo mostram-se como importantes agentes etiológicos (MECHELLI *et al.*, 2010).

O atual conhecimento sobre a genética da esclerose múltipla pode explicar apenas 5%-8% do risco que cada indivíduo tem de desenvolver a doença, dependendo da sua etnia e do ambiente em que habita. Essa escassez de informações torna impossível a completa compreensão sobre a etiologia desta patologia. Entretanto, pesquisas recentes sugerem uma função primordial dos processos epigenéticos na etiologia da esclerose múltipla (ZHOU *et al.*, 2014).

Processos epigenéticos são modificações hereditárias que alteram a expressão gênica sem causar alterações na sequência do DNA. Essas modificações podem explicar diversas observações médicas que confrontam a genética tradicional (URDINGUIO *et al.*, 2009). Os processos epigenéticos mais conhecidos são a metilação do DNA, as modificações em histonas e o silenciamento gênico mediado por microRNA (miRNA).

Os miRNAs são notavelmente os mais estudados uma vez que possuem centenas de genes de RNA mensageiro (RNAm) como alvos. Além disso, são responsáveis pela regulação de um terço dos genes em mamíferos. Essas moléculas são fitas simples de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. Possuem como função a inibição da tradução dos RNAm ou a sua degradação,

dependendo de como se ligam no mesmo. Atualmente são conhecidos pela sua função na manutenção da tolerância imune e também no controle de função das células do sistema nervoso central (JUNKER, 2011). Ademais os miRNAs estão envolvidos na expressão gênica de diversos processos biológicos como crescimento, desenvolvimento e metabolismo celular (PIERCE, 2014).

Considerando que a esclerose múltipla é uma doença multifatorial, os processos epigenéticos são primordiais para esclarecer como a genética e os fatores ambientais estariam interligados, assim alterações no ambiente estariam influenciando diretamente a expressão gênica. Os miRNAs em especial parecem ter uma importante função na evolução da fisiopatologia dessa doença, controlando por exemplo a diferenciação celular das células imunológicas. A elucidação desses processos contribuirá assim para o conhecimento da etiologia da esclerose múltipla, bem como auxiliará na produção de novas formas de diagnóstico e de tratamentos.

Metodologia

O presente trabalho é uma revisão dos últimos cinco anos da literatura científica através de busca no Pubmed, Scielo e Science Direct, utilizando os termos *epigenetic process*, *pathophysiology of multiple sclerosis* e *miRNA*. Foram selecionados todos os artigos que possuíam estudos relacionando a fisiopatologia da doença com os processos epigenéticos, especificamente com os miRNA. Foram ainda selecionados alguns outros artigos a partir de uma busca mais genérica na qual foram utilizados os mesmos termos.

Discussão

Fisiopatogênese e Etiologia

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa que afeta cerca de 2,5 milhões de indivíduos em todo o mundo, e cuja causa

permanece desconhecida (BONEFFIL *et al.*, 2008). Caracterizada por dano axonal, desmielinização, e inflamação crônica, sendo a principal doença autoimune do sistema nervoso central (SNC) (SHAPSHAK, 2013). O início da doença ocorre tipicamente entre 20 e 40 anos e as mulheres são duas vezes mais afetadas que os homens. Segundo a classificação de Lublin e Reingold são descritos quatro cursos da doença: EM recorrente-remitente; EM progressiva primária, EM progressiva secundária, e EM progressiva recorrente (KACPERSKA *et al.*, 2014).

Desde meados de 1800 a esclerose múltipla é considerada um distúrbio neurológico caracterizado por desenvolvimento de lesões discretas ou placas com degradação da mielina no SNC, porém com preservação relativa dos axônios. Atualmente novas evidências sugerem um envolvimento generalizado do SNC, com lesões nos axônios, que podem ser o evento inicial desta patologia. Além de elucidar os mecanismos que causam a perda da tolerância e o início da EM, novas pesquisas buscam, hoje, caracterizar os mecanismos de neuroproteção e reparo (MURRAY, 2006).

Segundo Hemmer *et al.*, (2006) o mecanismo da imunopatogenia na esclerose múltipla envolve uma perda da *self-tolerance*, com implicação das células TCD4+ e linfócitos B principalmente. O processo patogênico em humanos é descrito como *molecular mimicry*, onde um indivíduo geneticamente susceptível após sensibilização por um fator ambiental (infecção viral ou bacteriana), irá apresentar linfócitos T reativos que reconhecem uma proteína endógena (mielina) como uma proteína patogênica. Após a sensibilização no sangue periférico os linfócitos T reativos migram para o sistema nervoso central (SNC) e atravessam a barreira hematoencefálica através de interação entre a molécula VLA-4 (*very late antigen 4*) com a molécula de adesão celular-vascular VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). No SNC, os linfócitos são reativados pela apresentação de peptídeos autoantigênicos (MHC II), pelas

células residentes (células dendríticas, macrófagos, linfócitos B), desencadeando uma cascata inflamatória com liberação de citocinas, quimiocinas, ativação das células da glia e infiltração de outros linfócitos periféricos. Esse mecanismo leva a uma intensa destruição da mielina.

O modelo experimental para o estudo da esclerose múltipla segundo Garg e Smith (2015) é baseado em uma inflamação neuronal induzida, que desenvolve a encefalomielite autoimune, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE). Os animais (camundongos) são sensibilizados com proteínas da mielina e desenvolvem um processo similar a EM. A partir de evidências obtidas utilizando-se este modelo muitos dos processos imunopatológicos da EM são hoje conhecidos. Assim admite-se que a principal célula no processo patológico da esclerose múltipla é o linfócito CD4+ T-helper 1 (T_h1), responsável pela liberação de citocinas proinflamatórias como interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); seguido do T_h17 com liberação de IL-17; e T_h2 secretando IL-4, 5 e 10. As células TCD8+ estão envolvidas pois interagem com os receptores MHC I expressos pelo oligodendrócitos e neurônios. Por fim, os linfócitos B secretam autoanticorpos que irão facilitar a fagocitose e também são apresentadores de antígenos.

Essa intensa atividade inflamatória leva a formação de lesões (placas). Sendo estas classificadas em ativas, crônicas ou remielinizadas. As lesões ativas são comuns em pacientes diagnosticados na fase recorrente-remitente e são caracterizadas pela degradação da mielina (com relativa preservação axonal), infiltração de macrófagos e inflamação perivascular. As lesões crônicas ou inativas são observadas mais frequentemente em pacientes com doença progressiva e estão associados com extensa desmielinização, frequentemente com depleção axonal, perda de oligodendrócitos e ausência de inflamação ativa. As placas remielinizadas são

evidenciadas à margem das placas ativas e contêm axônios mielinizados e um número aumentado de precursores dos oligodendrócitos. A detecção das lesões é de extrema importância para confirmar o diagnóstico que segundo o critério de McDonald é baseado na detecção de duas áreas ou mais afetadas, em dois episódios distintos (GARG, SMITH, 2015; MURRAY, 2006).

Atualmente a etiologia da esclerose múltipla é desconhecida, porém estudos epidemiológicos descrevem-na como uma doença multifatorial que surge a partir de causas hereditárias e não hereditárias. Dentre os fatores não hereditários, as variações ambientais como a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), a deficiência de vitamina D e o tabagismo aparecem como os principais agravantes (ZHOU *et al.*, 2014). Em relação aos fatores herdáveis, o *human leukocyte antigen* (HLA) locus é o mais associado com a patologia (MECHELLI *et al.*, 2010). Os alelos *HLA-DR1501* e o *HLA-DQ0601* codificam elementos restritos às células T e estão associados com um aumento quatro vezes maior no risco de desenvolver a EM (GARG, SMITH, 2015). Além disso, pesquisas recentes relatam alterações em genes que codificam receptores de citocinas, moléculas de adesão e coestimulação, e genes com envolvimento em canais de transporte e desenvolvimento cerebral (MECHELLI *et al.*, 2010).

Contraditoriamente à evidência genética sugerida por algumas pesquisas Bonnefil *et al.*, (2008) relatam que o risco do desenvolvimento da esclerose múltipla entre gêmeos homozigotos é de apenas 20-30%, o que infere que fatores ambientais estariam modulando a expressão gênica e não somente mutações no DNA. Além disto, Koch, Metz e Kovalchuk (2013) demonstraram que a prevalência em mulheres é duas vezes maior do que em homens e a incidência na prole ocorre mais frequentemente quando o parental afetado é o materno.

Estas evidências, bem como a associação de diversos loci relacionados à EM sem que haja

uma conformidade entre diferentes pacientes sugerem que outro componente esteja envolvido na etiologia da EM (BONNEFIL *et al.*, 2008). Segundo Mechelli *et al.* (2010), é possível que o risco do desenvolvimento da esclerose múltipla seja uma combinação entre susceptibilidade genética e influências provenientes de fatores ambientais.

Processos Epigenéticos e Autoimunidade

O estudo de mecanismos que alteram a expressão gênica sem causar uma alteração na sequência do DNA é conhecido como epigenética (KOCH; METZ; KOVALCHUK, 2013). Essas alterações são estáveis, conservadas através de divisões celulares e até mesmo entre diferentes gerações (PIERCE, 2014).

Esse processo explica, por exemplo, como uma célula com um número limitado de genes (30.000), pode apresentar diferentes fenótipos e como eles são passados para as células-filhas. Por conseguinte, a epigenética é um processo de extrema importância no controle de expressão gênica durante o ciclo celular, no desenvolvimento e na resposta celular frente às modificações ambientais (BROOKS *et al.*, 2010). Embora as mudanças epigenéticas sejam preservadas entre as linhagens germinativas e mantidas entre sucessivas divisões celulares, elas podem ser revertidas e são altamente sensíveis as alterações ambientais (KOCH; METZ; KOVALCHUK, 2013).

Os principais mecanismos descritos nos processos epigenéticos são a metilação de DNA, as modificações de histona e o silenciamento gênico por microRNAs. A metilação da fita de DNA faz parte da estrutura covalente do mesmo e em organismos eucariontes consiste da adição de um grupo metil na posição 5' das citocinas - ilhas CpG (*cytosine-phosphate-guanine sites*). A adição do grupo metil conduz ao silenciamento gênico uma vez que essa região do DNA não será transcrita. As modificações de histona consistem na alteração da acessibilidade do nucleossoma para a transcrição, mediadas por

acetilação, metilação, fosforilação, entre outros mecanismos. Diferentemente da metilação do DNA, a acetilação das histonas favorece a transcrição. Por fim, os miRNAs regulam a expressão gênica através de um mecanismo que altera a estabilidade e tradução dos RNA mensageiros (BABENKO; KOVALCHUK; METZ, 2012).

Recentes evidências demonstram que alterações ambientais desregulam esses processos epigenéticos contribuindo para uma predisposição a doenças autoimunes. A falha no controle da homeostase epigenética leva a uma expressão gênica anômala que causa uma perda de *self tolerance* nas células que desencadeiam uma resposta autoimune. A maioria das doenças autoimunes acomete mulheres e alguns estudos funcionais sugerem que a explicação para tal é decorrente de hormônios femininos, que favorecem a diferenciação celular de linfócitos T em Th1 em níveis exacerbados, contribuindo para o desenvolvimento de reações autoimunes. Outra possível explicação é decorrente da inativação de um dos cromossomos X visto que esse processo é mediado por mecanismos epigenéticos (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009).

De acordo com Zhou *et al.*, 2014 a epigenética contribui para a fisiopatologia da esclerose múltipla explicando a porção de “*missing heritability*” encontrada na etiologia da mesma, assim os fatores ambientais possivelmente alteram os processos epigenéticos normais ocasionando a manifestação da doença. Koch, Metz, e Kovalchuk (2013) relatam brilhantemente o padrão de regulação epigenética relacionada com os fatores de risco da EM. Assim o diferente padrão de herança do gene *HLA-DRB1*15*, está associado com uma regulação por microRNAs; o nível de vitamina D regula a expressão gênica de genes envolvidos nas modificações de histonas; a infecção por EBV altera a regulação das enzimas metiltransferases modificando o padrão de metilação apresentado pela célula e assim alterando a expressão gênica; e o tabagismo por alterar o padrão de metilação, causa modificações em histonas e altera a expressão dos

microRNAs ocasionando uma drástica mudança no padrão de expressão gênica do indivíduo.

Os miRNAs são considerados primordiais na área da epigenética uma vez que eles controlam diversos processos biológicos desde desenvolvimento celular até oncogêneses (AMERES; ZAMORE, 2013). Através de análises genômicas e transcriptômicas foram descritas suas funções em diferenciação celular, morte celular, controle do metabolismo, proteção anti-viral e silenciamento de *transposon* (KIM; HAN; SIOMI, 2009).

Expressão e Função dos miRNAs NA EM

De acordo com Kiselev *et al.*, (2015), os miRNAs são pequenas sequências de RNA de fita simples com tamanho entre 19-24 nucleotídeos. Atualmente estão depositadas no miRBase (<http://www.mirbase.org/>) mais de 1800 miRNAs humanos que foram descobertos. Os miRNAs podem ser complementares à sequência do RNAm ou terem um pareamento incompleto. Possuem como função a inibição ou degradação da fita de RNAm, sendo conhecida a sua atuação na regulação de diversos processos biológicos, principalmente o sistema imunológico.

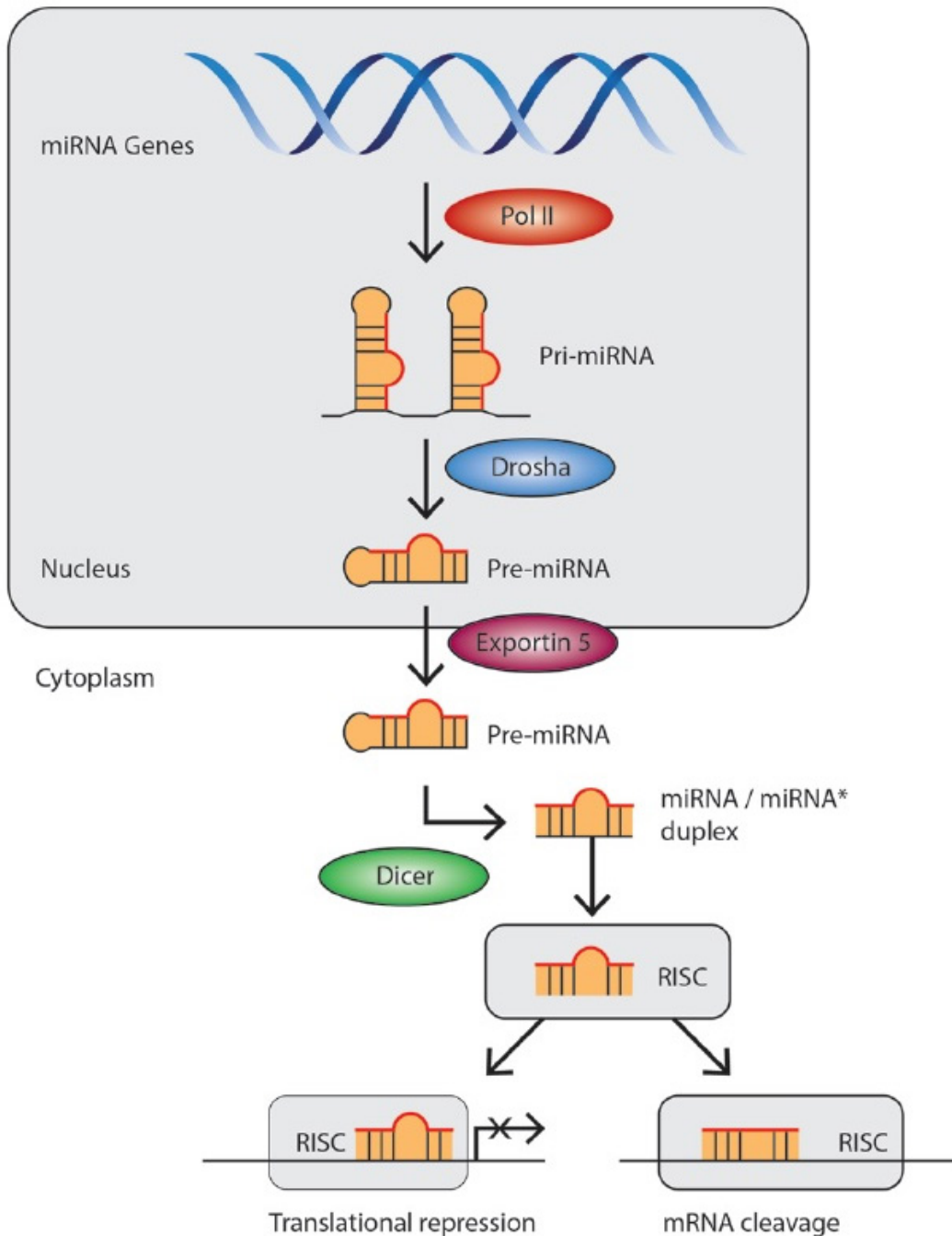
A biogênese dos miRNAs representado na figura 1, ocorre separadamente à transcrição gênica convencional. Eles são transcritos de regiões não codificadoras do DNA ou de *introns* de outros genes (PIERCE, 2014). Primeiramente os miRNAs são transcritos em uma fita longa de RNA, chamada pri-miRNA (*primary miRNA*), pela enzima *polimerase II*. Em seguida o pri-miRNA é clivado pela enzima nuclear Droscha em moléculas menores que são caracterizados pela presença de *hairpin* e com uma extensão de aproximadamente 70 nucleotídeos, essa nova molécula é então chamada pre-miRNA (*precursor miRNA*). Este é exportado do núcleo celular com o auxílio da *exportina 5*. No citoplasma, a enzima Dicer se liga ao *hairpin* e remove o *loop* terminal do pre-miRNA, que passa a ser constituído de uma fita

simples (aproximadamente 21-22 nt) de RNA que se liga ao grupo de proteínas RISC. O complexo miRISC é capaz de se ligar ao seu alvo, no RNAm. Essa ligação pode ser por pareamento completo

ou incompleto. Quando completo ocasionará a degradação do RNAm e quando incompleto irá inibir a tradução da fita de RNAm (HARDIN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014).

Figura 1- Biogênese dos MicroRNA (miRNA)

MicroRNAs



Fonte: (ZHOU *et al.*, 2014).

A expressão anômala de miRNAs pode induzir a desregulação dos RNAm, assim como mutações no RNAm podem afetar a capacidade de ligação do miRNAs ocasionado a formação de novos sítios de ligação (XU *et al.*, 2013). Na EM a expressão dos miRNAs podem ser classificados em três grupos distintos: 1) miRNAs específicos em lesões do SNC; 2) miRNAs específicos na regulação do sistema imunológico; 3) miRNAs circulantes. Os miRNAs circulantes foram detectados em diferentes fluidos corpóreos como urina, saliva, soro ou plasma. Algumas hipóteses sugerem que os miRNAs circulantes sejam produtos de células necróticas ou apoptóticas. Diversas alterações de miRNAs são relatadas no sangue periférico de pacientes com EM sugerindo a sua função na regulação das PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) (SHAHABADI *et al.*, 2013).

Segundo Kiselev *et al.* (2015) a presença de diferentes miRNAs foi demonstrada de forma

alterada em pacientes com esclerose múltipla. Foram encontradas alterações no sangue periférico, no fluido cérebro espinhal e em lesões cerebrais. Essas alterações podem resultar em modificações da expressão gênica e em uma desordem do sistema imunológico. Segundo Picascia *et al.*, (2015), os miRNAs possuem uma função dinâmica na regulação da imunidade inata e adaptativa, salientando assim a sua função no processo da autoimunidade.

Os principais miRNAs envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla estão descritos na tabela 1, bem como a sua função e o sítio no qual foram isolados. Eles foram agrupados em dois principais grupos: miRNAs encontrados no SNC e miRNAs envolvidos na regulação do sistema imune, uma vez que a maioria dos miRNAs circulantes estão envolvidos na função das células imunológicas.

Tabela 1 - Principais miRNAs envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla

	miRNA	Expressão Paciente	Sítio	Função	Referência	
	miR-125a-5p	down-regulated	*	BHE	regulação da permeabilidade e efluxo	MA <i>et al.</i> , 2014; REIJERKERK <i>et al.</i> , 2013
miRNAs SNC	miR-155	up-regulated	EMRR	lesões ativas	inibem CD47	KOCH <i>et al.</i> , 2013; JUNKER, 2011 ; RAMIREZ <i>et al.</i> , 2014
	miR-219	down-regulated	EAE	lesões crônicas inativas	diferenciação e proliferação dos oligodendrócitos	JUNKER, 2011 ; EMERY, 2010
	miR-326	up-regulated	EMRR	lesões ativas	diferenciação celular Th17	KOCH <i>et al.</i> , 2013; JUNKER, 2011
	hsa-miR-155	up-regulated	EMRR	PBMCs	diferenciação celular Th1 e Th17	KOCH <i>et al.</i> , 2013 ZHANG <i>et al.</i> , 2014
miRNAs SI	miR-132	up-regulated	EMRR	*	elevada secreção de citocinas por linfócitos B	MIYAZAKI <i>et al.</i> , 2014
	hsa-miR-146a	up-regulated	EMRR	PBMCs	regulação da ativação dos linfócitos	KOCH <i>et al.</i> , 2013
	hsa-miR-142-3p	up-regulated	EMRR	PBMCs	modulador imunológico	KOCH <i>et al.</i> , 2013
	hsa-miR-326	up-regulated	EMRR	PBMCs	diferenciação celular Th17	KOCH <i>et al.</i> , 2013

Legenda: down-regulated= diminuída; up-regulated= aumentada; EMRR= esclerose múltipla recorrente-remitente; BHE= barreira hematoencefálica; PBMC = *periferic blood mononuclear cells*; SNC= sistema nervoso central; SI= sistema imune.

Fonte: Autor

MicroRNAs e SNC

De acordo com Ma *et al.*, (2014) a disfunção da barreira hematoencefálica é associada com a patogênese da EM. A *down regulation* do miR-125a-5p está envolvida na regulação do efluxo de células imunológicas e na permeabilidade das células endoteliais na barreira hematoencefálica, sugerindo assim que o miR-125a-5p pode desempenhar um papel fundamental na fisiopatogênese da esclerose múltipla. Segundo a pesquisa realizada por Reijerkerk *et al.*, (2013) a expressão do miR-125a-5p é regulada pela exposição a fatores liberados pelos astrócitos como angiopoietina I e II e TGF β , que por sua vez alteram a permeabilidade das células.

Altos níveis de miR-219 conduzem à diferenciação de células precursoras de oligodendrócitos. De acordo com estudos realizados o miR-219 é responsável pela diferenciação destas células e sua ausência não afeta a produção dos precursores, salientando assim a sua função na produção de células maduras capazes de produzir mielina (JUNKER, 2011). Essas evidências apontam para uma função primordial dos miRNAs no controle da mielinização do SNC (EMERY, 2010). De acordo com Junker (2011) em lesões crônicas desmielinizadas de pacientes afetados pela EM foi demonstrada uma *down regulation* de miR-219, essa diminuição da expressão resulta em uma falha de remielinização das lesões.

A presença de outros microRNAs foi descrita no SNC, como os miRNAs 155 e 326, que segundo Koch, Metz e Kovalchuk (2013) estão presentes em lesões ativas e possuem uma expressão aumentada ao contrário dos outros miRNAs citados acima. O miR-326 está envolvido na diferenciação celular de células T em T_h17. O miRNA-155 possui como alvo a proteína de superfície CD47. Esta por sua vez apresenta-se com uma expressão diminuída em lesões ativas. Sua função é descrita como inibitória para fagocitose em macrófagos e para a produção de citocinas pelas células dendríticas. A proteína CD47

possui como principal característica a função de reconhecimento do *self*, impedindo assim reações autoimunes. Devido à alta expressão do miRNA-155 em lesões, o mesmo reduz a expressão da proteína CD47 consequentemente ativando macrófagos e favorecendo a fagocitose da mielina (JUNKER, 2011). Além disto, segundo Ramirez *et al.*, (2014) o miR-155 possui função na regulação da barreira hematoencefálica favorecendo a passagem das células imunológicas para o SNC.

Segundo Shahabadi *et al.*, (2013) outros miRNAs parecem ter relação com as células do sistema nervoso central. MiRNAs 338, 23, e 9 estão envolvidos com a diferenciação dos oligodendrócitos; miR-124 está expresso em células da migróglia e diversos outros miRNAs estariam envolvidos com a regulação dos astrócitos, porém mais estudos precisam ser realizados para descrever de forma mais precisa as suas funções nos processos biológicos.

MicroRNAs e Células Imunológicas

Os miRNAs possuem um alto nível de expressão em células do sistema imune e estão envolvidos em numerosos mecanismos do sistema imunológico, tanto na via adaptativa quanto na inata. A análise transcricional das células T apresentou distintos resultados entre células imaturas, efectoras, reguladoras e de memória sugerindo assim que os miRNAs são essenciais para a diferenciação celular (JERNAS *et al.*, 2013).

Embora não se conheça o exato mecanismo de ação do processo patológico da esclerose múltipla, sabe-se que as TCD4⁺ são as mais importantes células causadoras do processo inflamatório autoimune. IFN- γ estimula a diferenciação de células TCD4 imaturas em T_h1, estas por sua vez são descritas como importantes agentes tanto na EM quanto no modelo murino (EAE). Pesquisas recentes demonstraram que T_h17 é uma importante célula encontrada em lesões crônicas e que auxilia a ativação e a manutenção da atividade inflamatória. A sua inibição resulta em

uma amenização da patologia na encefalomielite autoimune experimental (ZHANG *et al.*, 2014).

Corroborando com esta pesquisa, Irizar *et al.*, (2015) salienta que as lesões observadas em pacientes com esclerose múltipla são provocadas principalmente pela atuação de plasmócitos, células T_h17, células T_h1 e macrófagos.

Analisando lesões e sangue periférico de pacientes Zhang *et al.* (2014), demonstrou a presença em nível elevado do miR-155. Sua função está relacionada com a diferenciação celular de linfócitos TCD4+ em T_h1 e T_h17, apresentando assim um papel fundamental no desenvolvimento do processo patológico. Além disso, a depleção do gene que codifica esse miRNA no modelo murino (EAE) demonstrou diminuição da inflamação e alívio dos sintomas.

Um outro estudo realizado por Miyazaki *et al.* (2014) demonstrou a expressão anormal de miR-132 em linfócitos B. Essa elevação causa a produção anômala de citocinas pró-inflamatórias (TNF α), o que contribui para a exacerbação na ativação de linfócitos T. Esse estudo salienta a participação das células B no processo patogênico da EM, bem como a participação dos miRNAs na sua regulação.

Diversos miRNAs foram descritos pela sua expressão anômala em pacientes com EM. Kock, Metz e Kovalchuk (2013) relatam o aparecimento de 4 miRNAs em nível elevado em pacientes na fase recorrente-remitente, são eles: hsa-miR-326, hsa-miR-155, hsa-miR146a e hsa-miR-142-3p. Quando analisados individualmente estes miRNAs apresentam baixa especificidade e baixa sensibilidade, porém a combinação dos miRNAs 155, 146a e 142-3p pôde distinguir pacientes saudáveis de pacientes recorrente-remitente com 77,8% de sensibilidade e 88% de especificidade. Os hsa-miR-326 e o hsa-miR-155 estão associados com diferenciação celular como exibido na tabela 1 e a possuem função na regulação do sistema imune. Recentes estudos sugerem que o hsa-

miR146a possui função regulatória na ativação de células T e o hsa-miR-142-3p foi descrito com uma atividade aumentada em transplante renal, sugerindo função imunoregulatória.

Em um levantamento realizado por Ma *et al.* (2014), foi descrito o mecanismo de ação dos miRNAs que estão desregulados em pacientes com esclerose múltipla, segundo estes os miRNAs possuem como função principal a regulação gênica de forma negativa. De acordo com esse estudo, diferentes microRNAs estariam interferindo na diferenciação dos linfócitos TCD4. O miR-27b, miR-128 e miR-340 inibem a expressão de IL-4, suprimem o desenvolvimento Th2 e induzem uma mudança de Th2 para Th1, levando à patogênese da EM. Além disso, o miR-21, miR-155 e let-7e promovem o desenvolvimento de Th1 e Th17. Além dessa função o miRNA-21 ainda é responsável pelo aumento da expressão de IFN- γ e IL-17.

Contribuindo para a patogênese da EM temos o miR-146a que aumenta a expressão de IL-17, o miR-326 que promove o desenvolvimento de Th17, ambos contribuindo para a atividade inflamatória e o miR-142-3p que inibe a expressão de IL-10, impedindo a atuação das células T reguladoras. Por fim, como inibidor do processo patogênico da esclerose múltipla temos o miR-23b que suprime a expressão de IL-17, diminuindo a reação imunológica.

Estudos referentes à expressão, regulação e função dos miRNAs em pacientes com esclerose múltipla são de extrema importância pois irão elucidar os miRNAs específicos alterados no decorrer da patologia, que poderão ser utilizados como marcadores de diagnóstico e ferramenta terapêutica. Além disto, essas moléculas são excepcionalmente estáveis em fluidos biológicos, sugerindo uma exportação das mesmas em exossomos, os quais previnem uma degradação dos miRNAs por RNases. Reforçando assim o seu potencial como um futuro biomarcador para a esclerose múltipla (MA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2013).

Considerações Finais

A expressão dos miRNAs está intimamente ligada com a fisiopatologia da esclerose múltipla de acordo com inúmeros estudos que vem demonstrando a sua desregulação em pacientes quando comparados com a indivíduos saudáveis. Assim um padrão característico para cada fase da doença poderá ser estabelecido.

Salienta-se o grande potencial dessa molécula como possível biomarcador no diagnóstico da esclerose múltipla que atualmente baseia-se primordialmente em exames de imagem e evolução clínica do paciente. Um marcador de lesão inicial que apresente uma alteração poderia conduzir a um diagnóstico precoce. Segundo dados relatados no decorrer do trabalho os miRNAs miR-155 e miR-326 parecem estar intimamente ligados com o curso da patologia e possuem uma função bem estabelecida. Porém mais estudos precisam ser realizados principalmente avaliando-se longitudinalmente pacientes para confirmar o potencial dessas moléculas.

Estudos utilizando os miRNAs como alvos terapêuticos vêm apresentando resultados promissores em modelos murinos e possivelmente serão utilizados na clínica, pois regulariam a expressão gênica nos pacientes acometidos pela esclerose múltipla, que parece ser a principal causa da patologia. Por fim, os miRNAs estão atualmente elucidando diversos mecanismos alterados de expressão gênica na esclerose múltipla e espera-se que os mesmos, em breve, ajudem a caracterizar melhor essa doença que ainda hoje permanece obscura.

Referências

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews*, Vienna, v. 14, p. 475-488, 2013.

BABENKO, O.; KOVALCHUK, I.; METZ, G. A. Epigenetic programming of neurodegenerative diseases by an adverse environment. *Brain Research*, Alberta, v. 1444, p. 96-111, 2012.

BONNEFIL, P. C.; PANDOZY, G.; MASTRONARDI, F. Evaluating epigenetic landmarks in the brain of multiple sclerosis patients: A contribution to the current debate on disease pathogenesis. *Progress in Neurobiology*, New York, v. 86, p. 368-378, 2008.

BROOKS, W. H.; DANTEC, C. L.; PERS, J. O.; YOUINOU, P.; RENAUDINEAU, Y. Epigenetics and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, Tampa, v. 34, p. 207-219, 2010.

EMERY, B. Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Science*, Carlton South, v. 330, p. 779-782, 2010.

GARG, N.; SMITH, T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*, Massachusetts, v. 10, p. 1-13, 2015.

HARDIN, J.; BERTONI, G.; KLEINSMITH, L. *J. Becker's: world of the cell*. 8. ed. San Francisco: Pearson, 2012.

HEMER, B.; NESSLER, S.; ZHOU, D.; KIESEIER, B.; HARTUNG, H. P. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*, Dusseldorf, v. 2, n. 4, p. 201-211, 2006.

HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *Journal of Auto Immunity*, Ann Arbor, v. 33, p. 3-11, 2009.

IRIZAR, H.; CULLA, M. M.; CUESTA, M. S.; QUEREJETA, I. O.; SEPÚLVEDA, L.; TRIVIÑO, T. C.; PRADA, A.; MUNAIN, A. L.; OLASCOAGA, J.; OTAEGUI, D. Identification of ncRNAs as potential therapeutic targets in multiple sclerosis through differential ncRNA – mRNA network analysis. *BMC Genomics*, San Sebastián, v. 16, p. 1-15, 2015.

JERNAS, M.; MALMESTROM, C.; AXELSSON, M.; NOOKAEW, I.; WADENVIK, H.; LYCKE, J.; OLSSON, B. MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis. *BMC Immunology*, Sweden, v. 14, n. 32, p. 1-11, 2013.

- JUNKER, A. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, Gottingen, v. 585, p. 3738-3746, 2011.
- KACPERSKA, M. J.; JASTRZEBSKI, K.; TOMASIK, B.; WALANECZAK, J.; KROL, M. K.; GLABINSKI, A. Selected extracellular microRNA as potential biomarkers of multiple sclerosis activity: preliminary study. *Journal of Molecular Neuroscience*, Boston, v. 56, n. 1, p. 154-163, 2014.
- KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews*, Seoul, v. 10, p. 126-139, 2009.
- KISELEV, I.; BASHINSKAYA, V.; KULAKOVA, O.; BAULINA, N.; POPOVA, E.; BOYKO, A.; FAVOROVA, O. Variants of MicroRNA Genes: Gender-Specific Associations with Multiple Sclerosis Risk and Severity. *International Journal of Molecular Sciences*, Moscow, v. 16, p. 20067-20081, 2015.
- KOCH, M. W.; METZ, L. M.; KOVALCHUK, O. Epigenetics and miRNAs in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, Calgary, v. 19, p. 23-30, 2013.
- KOCH, M.W.; METZ, L. M.; KOVALCHUK, O. Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews*, Calgary, v. 9, p. 35-43, 2013.
- MA, X.; ZHOU, J.; ZHONG, Y.; JIANG, L.; MU, P.; LI, Y.; SINGH, N.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Expression, regulation and function of MicroRNAs in multiple sclerosis. *International Journal of Medical Sciences*, [Australia], v. 11, n. 8, p. 810-818, 2014.
- MECHELLI, R.; ANNIBALI, V.; RISTORI, G.; VITTORI, D.; COARELLI, G.; SALVETTI, M. Multiple sclerosis etiology: behind genes and environment. *Expert Reviews*, Rome, v. 6, n. 3, p. 481-490, 2010.
- MIYAZAKI, Y.; LI, R.; REZK, A.; MISIRLIYAN, H.; MOORE, C.; FAROOQI, N.; SOLIS, M.; GOIRY, L.G.; JUNIOR, O.F.; DANG, V.D.; COLMAN, D.; DHAUNCHAK, A.S.; ANTEL, J.; GOMMERMAN, J.; PRAT, A.; FILLATREAU, S.; BAR-OR, A. A novel microRNA-132-Sirtuin-1 axis underlies aberrant b-cell cytokine regulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Plos One*, Quebec, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2014.
- MURRAY, T.J. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ: British Medical Journal*, London, v. 332, p. 525-527, 2006.
- PICASCIA, A.; GRIMALDI, V.; PIGNALOSA, O.; PASCALE, M. R. D.; SCHIANO, C.; NAPOLI, C. Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clinical Immunology*, Orlando, v. 157, n. 1, p. 1-15, 2015.
- PIERCE, B.A. *Genetics: a conceptual approach*. 5. ed. New York: Freeman, 2014.
- RAMIREZ, M. A. L.; WU, D.; PRYCE, G.; SIMPSON, J. E.; REIJERKERK, A.; ROBSON, J. K.; KAY, O.; VRIES, H. E.; HIRST, M. C.; SHARRACK, B.; BAKER, D.; MALE, D. K.; MICHAEL, G. J.; ROMERO, I. A. MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation. *The FASEB Journal*, New Haven, v. 28, p. 2551-2565, 2014.
- REIJERKERK, A.; RAMIREZ, M. A. L.; HOF, B. V. H.; DREXHAGE, J. A. R.; KAMPHUIS, W. W.; KOOIJ, G.; VOS, J. B.; KRAAN, T. C. T. M. V. D. P.; ZONNEVELD, A. J. V.; HORREVOETS, A. J.; PRAT, A.; ROMERO, I. A.; VRIES, H. E. MicroRNAs regulate human brain endothelial cell-barrier function in inflammation: implications for multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, Quebec, v. 33, n. 16, p. 6857-6863, 2013.
- SHAHABADI, A.Z.; RENAUDINEAU, Y.; REZAEI, N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from physiopathology toward therapy. *Expert Opinion*, Tehran, v. 17, p. 1497-1507, 2013.
- SHAPSHAK, P. Molecule of the month: miRNA and Multiple Sclerosis. *Biomedical Informatics*, Flórida, v. 9, n. 17, p. 847-848, 2013.
- URDINGUIO, R. G.; MUT, J. V. S.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*, Barcelona, v. 8, p. 1056-1072, 2009.

ZHANG, J.; CHENG, Y.; CUI, W.; LI, M.; LI, B.; GUO, L. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, Amsterdam, v. 266, n. 1-2, p. 56-63, 2013.

ZHOU, Y.; SIMPSON, S.; HOLLOWAY, A. F.; CHARLESWORTH, J.; MEI, I.; TAYLOR, B. The potential role of epigenetic modifications in the heritability of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, Hobart, v. 20, n. 2, p. 135-140, 2014.

Recebido em: 3 maio 2016
Aceito em: 11 nov. 2016.