INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Regulação da expressão génica da diferenciação de linfócitos T CD4+ na autoimunidade

FILIPE XAVIER RIBEIRO PINTO

Tese realizada sob a orientação da Professora Doutora Anita Raquel Quintal Gomes

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Regulação da expressão génica da diferenciação de linfócitos T CD4+ na autoimunidade

FILIPE XAVIER RIBEIRO PINTO

Tese realizada sob a orientação da Professora Doutora Anita Raquel Quintal Gomes

JURI

Doutora Joana Carolina Marinho Cunha
Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes

Doutora Luisa Maria Carvalho Veiga
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

(Esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2021

Agradecimentos

O presente trabalho reflete todo o esforço e dedicação prestados ao longo de todo o meu percurso académico no Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde.

Agradeço a todo o corpo docente da ESTeSL que me instruiu e contribuiu para o desenvolvimento de competências que me serão bastante úteis para a minha futura carreira profissional.

Gostaria de agradecer a todos os elementos do conselho de Mestrado, pela oportunidade de aprofundar os meus estudos e por toda a ajuda que me dispuseram.

À minha orientadora a Professora Doutora Anita Raquel Quintal Gomes, pelo seu apoio e dedicação.

Ao Professor Doutor Jorge Fonseca, Médico especialista em Gastroenterologia, por me fazer reconhecer as minhas capacidades e ter aconselhado a investir vivamente nelas.

Por fim, não menos importante, agradeço ao meus Pais que me acompanharam em todos os momentos, incluindo os mais difíceis, do meu percurso académico.

A todos gostaria de deixar os meus sinceros

Agradecimentos

Índice Geral

Agradecimentos III

Índice de Tabelas VII

Índice de Figuras IX

Abreviaturas X

Resumo XI

1. Introdução 1

1.1 Sistema imunitário 1

1.2 Diferenciação das Células T CD4+ 2

1.3 Doenças Autoimunes 9

1.4 miRNAs e a sua função na regulação da diferenciação das células T CD4+ 14

1.5 Dados Preliminares 17

2. Objetivos 21

3. Metodologia de Pesquisa Bibliográfica 22

3.1 Seleção de fatores reguladores em condições basais 24

3.2 Seleção de fatores reguladores no LES 25

3.3 Seleção de fatores reguladores na AR 26

3.4 Seleção de fatores reguladores na Ps 27

3.5 Seleção de fatores reguladores na DCr 28

3.6 Seleção de fatores reguladores na EM 29

4. Resultados 30

4.1 Identificação de fatores de regulação envolvidos na diferenciação das células T CD4+ 30

4.1.1 Fatores de transcrição, recetores e citocinas envolvidos na regulação da diferenciação das células T CD4+ 31

4.1.2 miRNAs envolvidos na regulação da diferenciação das células T CD4+ 33

4.2. Caracterização dos fatores que regulam a diferenciação das células T CD4+ na autoimunidade 35

4.2.1. Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) 36

4.2.2. Artrite Reumatoide (AR) 38

4.2.3 Psoríase (Ps) 40

4.2.4 Doença de Crohn (DCr) 41

4.2.5 Esclerose Múltipla (EM) 44

4.3. Identificação de miRNAs como possíveis biomarcadores de doenças autoimunes 48

4.4. Análise do perfil de expressão dos miRNAs identificados na literatura, em células Th1, Th17 e Treg, de doenças autoimunes num modelo experimental de Esclerose Múltipla 51

5. Discussão 54

6. Referências Bibliográficas 61

7. Anexo 77

7.1. Descrição das técnicas de identificação e quantificação dos fatores reguladores da diferenciação de células T CD4+ 77

7.1.1 RT-qPCR 77

7.1.2 ChIP-seq 77

7.1.3 Sequenciação de mRNA e “small-RNA” em larga escala 79

7.1.4 Citometria de Fluxo 81

7.1.5 ELISA 82

7.1.6 Western Blot 82

7.1.7 Ensaio Luciferase 83

7.1.8 HITS-CLIP 83

7.1.9 Referências Bibliográficas dos Métodos 84

Índice de Tabelas

Tabela 1- Citocinas, recetores e fatores de transcrição envolvidos na expressão génica das células Th1, Th17 e Treg 32

Tabela 2- miRNAs envolvidos na expressão génica das células T CD4+ em condições basais 34

Tabela 3- miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ no LES 38

Tabela 4- miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na AR 39

Tabela 5- miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na Ps 41

Tabela 6- miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na DCr 43

Tabela 7- miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na EAE e EM 47

Tabela 8- Possíveis biomarcadores propostos para o diagnóstico complementar das doenças autoimunes abordadas 50

Tabela 9- Perfil de expressão na EAE dos miRNAs selecionados, a partir da pesquisa bibliográfica 52

Tabela 10- Perfil de expressão na EAE dos genes alvo dos miRNA diferencialmente expressos 54

Índice de Figuras

Figura 1- Diferenciação das células Th1 2

Figura 2- Produção de IFN-*γ* induzida por IL-12, IL-18 e o TCR 3

Figura 3- Principais funções atribuídas às células Th17 4

Figura 4- Reguladores transcricionais da expressão de IL-17 5

Figura 5- Modelo proposto para a imunossupressão mediada pelas células T reguladoras 6

Figura 6- Fatores que contribuem para a estabilidade funcional das células Treg 7

Figura 7- Transdiferenciação das células Th17 8

Figura 8- Diferenciação das células T Naive em células Th1, Th2, Th17 e Treg 9

Figura 9- Funções atribuídas às citocinas das células Th17 na artrite reumatóide 10

Figura 10- Resposta imunitária na DCr 12

Figura 11- Células T efetoras na EM 13

Figura 12- Via de biogénese de um miRNA 15

Figura 13- MicroRNAs envolvidos na diferenciação das células T CD4+ 16

Figura 14- Estabelecimento de um modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) no modelo triplo repórter Foxp3hCD2.IfngYFP.Il17aGFP 18

Figura 15- Isolamento de células Treg, Th1 e Th17 a partir de ratinhos repórter triplos *Foxp3hCD2.IfngYFP.Il17aGFP* na fase plateu de EAE 19

Figura 16- "Heatmap" associado à variância da expressão dos miRNAs analisados no modelo EAE 20

Abreviaturas

APC- Células Apresentadoras de Antigénios

IL- Interleucina

MHC- Complexo Principal de Gistocompatibilidade

TCR- Recetor de células T

Treg- Células T Reguladoras

Teff- Células T Efetoras

Th- Células T Auxiliares

IFN-*γ*- Interferão Gama

STAT- *Signaling Transducer and Activator of Transcription*

IRF- Fator de Transcrição Regulador de Interferão

PPAR*γ* - Recetor proliferador ativado por peroxissoma *γ*

LES- Lúpus eritematoso sistémico

AR- Artrite Reumatoide

VEGF -fator de crescimento endotelial vascular

NF-κB- Fator de transcrição nuclear κB

DCr- Doença de *Crohn*

Ps -Psoríase

EM- Esclerose Múltipla

miRNA- MicroRNA

EAE- Encefalomielite Autoimune Experimental

MOG- Péptido da glicoproteína Oligodendrocítica de Mielina

C- Citocina

R- Recetor

TF- Fator de Transcrição

CPM- *Counts per Million*

FD- *Fold Change*

FDR- *False Discovery Rate*

Resumo

O sistema imunitário é constituído por um conjunto de células com capacidade de se diferenciar, convertendo estímulos externos em complexas redes regulatórias intracelulares. Os linfócitos T CD4+ podem diferenciar-se em células efetoras (Teff), entre as quais as células Th1 e Th17, que produzem as citocinas pró-inflamatórias interferão-*γ* e interleucina-17, respetivamente e em células reguladoras (Treg), que funcionam como inibidoras da ação de células Teff. Se o balanço entre as células Teff e Treg ficar comprometido, haverá um desequilíbrio na resposta imunitária que pode desencadear autoimunidade. Assim, o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação destas células poderá ser crítico na prevenção da autoimunidade. Os microRNAs são RNAs não codificantes que atuam como reguladores negativos da expressão da maioria dos genes, estando envolvidos na regulação da diferenciação de células Th1, Th17 e Treg.

Neste trabalho de revisão de literatura foi feita uma pesquisa sobre o perfil de expressão de microRNAs em doenças autoimunes. Foram identificados microRNAs funcionalmente importantes na regulação da expressão de genes envolvidos na diferenciação de Th1, Th17 e Treg no lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn e esclerose múltipla em modelos animais e em amostras humanas, tendo-se observado que alguns miRNAs se encontram desregulados em várias doenças autoimunes. Foi também analisada a expressão dos microRNAs selecionados num modelo experimental de esclerose múltipla, tendo-se identificado seis diferencialmente expressos.

Conclui-se que os microRNAs constituem fatores reguladores cruciais na diferenciação das células T CD4+ que poderão ser usados como potenciais biomarcadores ou como alvos terapêuticos de doenças autoimunes.

Palavras-chave: Autoimunidade, miRNA, Células T CD4+, Treg, Th1, Th17

Abstract

The immune system is composed by a complex network of cells with differentiating potential, which can convert external stimuli into complex intracellular regulatory networks. CD4+T lymphocytes, in particular, can differentiate into effector T cells, incluing Th1 and Th17 cells that produce, respectively, the pro-inflammatory cytokines interferon-□ and interleukin-17, and regulatory T cells (Treg) that inhibit Teff action. If the balance between Teff and Treg is compromised, namely if Teff override Tregs, autoimmunity may rise. Thus, studying the molecular mechanisms involved in T cell differentiation might be critical to prevent autoimmunity microRNAs are non-coding RNAs that act as negative regulators of the expression of most genes and have been shown to regulate the differentiation of Th1, Th17 and Treg cells.

In this literature review work, a search was made based on the expression profile of microRNAs, specifically in autoimmune diseases. Functionally important miRNAs for regulating the expression of genes involved in Th1, Th17 and Treg differentiation in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriasis, Crohn's disease and multiple sclerosis have been identified, in both animal models and human samples. Importantly, some of the miRNAs were commonly deregualted in several autoimmune diseases. Finally, the expression of selected miRNAs was analysed in an experimental model of multiple sclerosis, and six were differentially expressed within T cell populations.

We conclude that miRNAs are crucial regulatory factors in the differentiation of CD4+ T cells that can be used as potential biomarkers or therapeutic targets of autoimmune diseases.

Key-words: Autoimunity, miRNA, CD4 + T cells, Treg, Th1, Th17

Introdução

1.1 O Sistema Imunitário

O sistema imunitário é um sistema complexo de defesa do organismo sendo constituído por dois subsistemas principais: o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido. O primeiro consiste na primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, que pode ser de origem física, química ou celular. Desencadeia uma resposta generalizada para todas as substâncias estranhas. Age de forma imediata, de forma a impedir a propagação dos agentes patogénicos para que sejam destruídos no próprio local onde se encontram. Caso estes agentes sobrevivam são confrontados com o sistema imunitário adquirido que produz uma resposta mais lenta e que está dependente do antigénio presente. Neste intervêm as células B e T. A imunidade mediada pela produção de anticorpos, a partir das células B é classificada como humoral, enquanto a imunidade mediada por células T (ou células com atividade fagocitária), é designada por imunidade celular, levando à destruição de células infetadas ou que são consideradas estranhas ao organismo. Os antigénios destas são geralmente expressos na superfície celular, ou na membrana de células apresentadoras dos mesmos (APC)[1].

A molécula CD4, *Cluster of Differentiation* 4, é uma glicoproteína membranar que possui uma série de funções cruciais na tolerância e resposta do sistema imunitário. Encontra-se associada a vias de sinalização que permitem o reconhecimento de antigénios e a componentes da resposta imunitária inata. Desempenha um papel crucial na diferenciação dos linfócitos T e é expressa em mais de 50% destas células no sangue periférico. Pode estar também presente em outras células do sistema imunitário como macrófagos, células B e células da microglia[1,2].

As células T $CD4^+$ são um tipo de linfócitos T que desempenha um papel importante na manutenção da defesa do organismo. Contribuem para a otimização da resposta imunitária contra microrganismos que iniciam a infeção e contra células cancerígenas, sendo também responsáveis por regular a ação de outras células do sistema imunitário, através da libertação de citocinas, designadas interleucinas (IL) que promovem o recrutamento de células de tecido linfoide secundário para o local de infeção, a ação citotóxica sobre outras células, entre outros exemplos. A sua função encontra-se dependente do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que irá determinar a tolerância destas às estruturas do organismo, e o reconhecimento de agentes estranhos ao mesmo. Possuem ainda um recetor específico designado TCR que revela importante para a sua ativação e proliferação[2].

1.2 Diferenciação das células T CD4+

As células T CD4+ Naive são geradas após um processo de seleção e maturação no Timo, consistindo em células precursoras com potencial para se diferenciarem em células reguladoras (Treg) ou efetoras (Teff), das quais se destacam as células axiliares (Th), dependendo dos sinais químicos recebidos. Esta diferenciação é determinada em grande parte pelo perfil de expressão relativo de fatores de transcrição, recetores e citocinas presentes[3].

A diferenciação das células CD4+ Naive em células Th1 surge pela necessidade de eliminação de parasitas intracelulares, nos quais se incluem vírus e certas bactérias. São importantes na imunidade mediada por células, através da produção interferão *γ* (IFN-*γ*) e IL-2, possuem um papel fundamental ativação e migração de macrófagos para o local da inflamação, sendo responsáveis pela indução de respostas de hipersensibilidade retardada[4]. Sabe-se que o IFN-*γ* é responsável pelo desenvolvimento das células Th1. Este interferão, também designado por tipo II, consiste numa citocina solúvel dimerizada que interfere com a replicação de microrganismos intracelulares. É produzido pelas células Th1 quando estimuladas pelas citocinas IL-12 e IL-27 (Figura 1)[5].

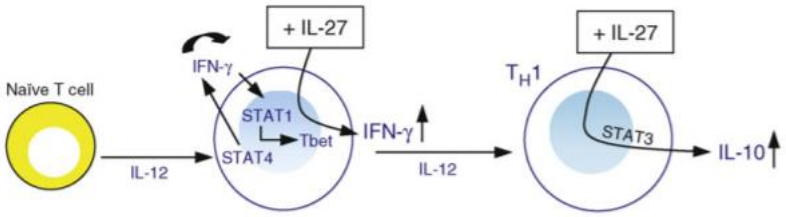


Figura 1 - **Diferenciação das células Th1**. As citocinas IL-12 e IL-27 promovem a diferenciação das células Th1 ativando os fatores STAT1, STAT4 que por sua vez ativam o factor de transcrição T-bet que induz a expressão de IFN-*γ*, sendo que a citocina IL-27 também promove a expressão de STAT3, o que conduz à produção de IL-10[6].

As proteínas STAT (*Signaling Transducer and Activator of Transcription*) são fatores ativadores da transcrição que desempenham um papel crítico na diferenciação e proliferação das células T $CD4^+$. O STAT1 quando fosforilado induz a expressão do fator T-bet, que promove a expressão do IFN-*γ*. O STAT4 é ativado pela IL-12 e promove a expressão da subunidade do seu recetor IL-12R*β*2[7]. O T-bet promove a expressão do gene IFNG que codifica o IFN-*γ*, inibindo o fator GATA3 que

promove a diferenciação das Th2. Existem outros fatores envolvidos na diferenciação das células Th1 que são ativados pelas citocinas IL-12, IL-18 e pelo TCR que mediam várias vias de sinalização intracelular que conduzem à expressão do IFN-*γ*, como representado na figura 2[8].

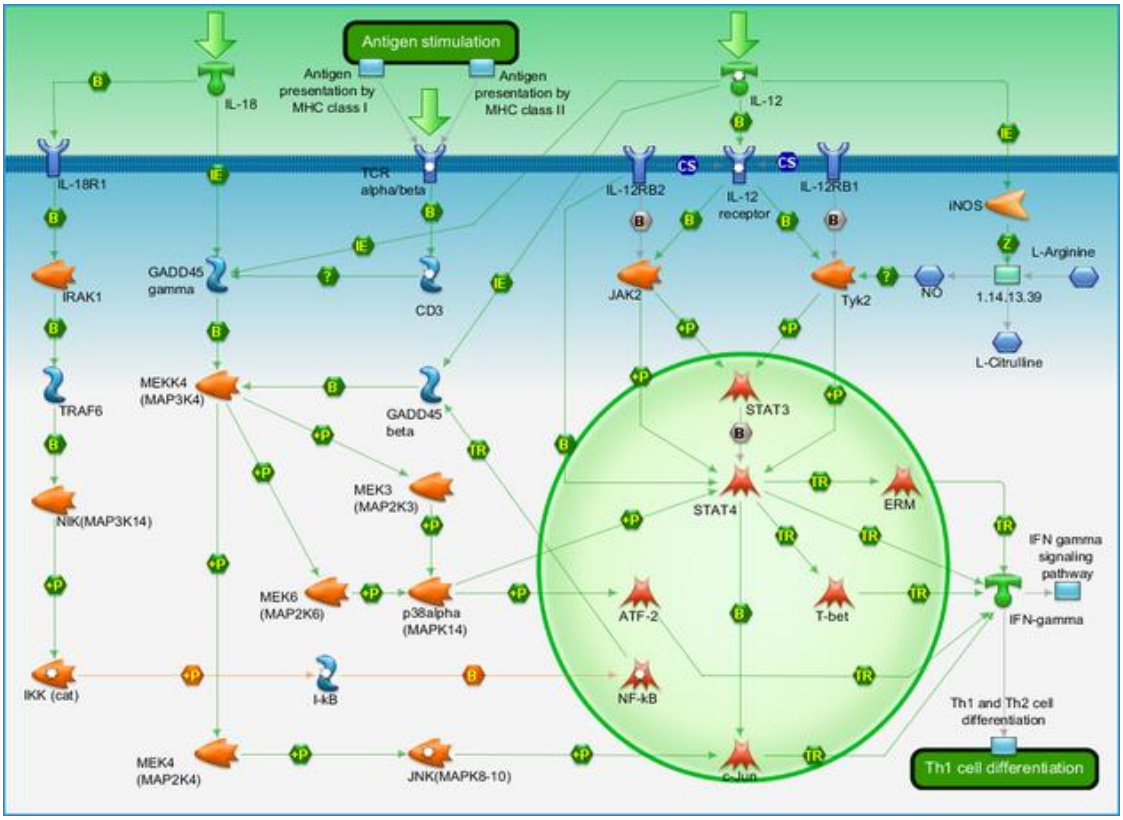


Figura 2 - **Produção de IFN- *γ* induzida por IL-12, IL-18 e o TCR**. Após a ligação ao seu recetor, a IL-12 ativa as cinases da família Janus, Tyk2 e Jak2. O IL-12RB1 liga-se à Tyk2, enquanto o IL-12RB2 se associa à Jak2, levando à fosforilação de resíduos de tirosina da STAT3 e STAT4. Essas fosforilações são responsáveis pela formação de homodímeros (STAT4 / STAT4) e heterodímeros (STAT3 / STAT4). Estes migram para o núcleo, ligando-se ao promotor do gene IFN-*γ*. Após a ação da IL-12, a STAT4 induz a transcrição de ERM e T-bet, que também promovem a transcrição do mesmo gene. Juntamente com a IL-18 e o TCR*αβ* é induzida a ativação de GADD45 beta e GADD45*γ* que levam à ativação de Jnk, que fosforila a proteína c-Jun que consiste noutro fator de transcrição que se liga ao promotor do gene IFN-*γ*[9].

As células T CD4$^+$ podem também diferenciar-se em células Th17 que promovem a inflamação dos tecidos e o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação (Figura 3). Desempenham um papel importante na eliminação de agentes

patogénicos que sobrevivem à ação das células Th1 e Th2 (outro tipo de células efetoras associada essencialmente à resposta alérgica), como certas bactérias gram-negativas e algumas espécies de fungos[10]. Caracterizam-se pela expressão elevada do gene RORc que codifica o fator de transcrição RORγt, que promove a produção de IL-17[10]. A expressão desta citocina está também dependente do fator STAT3 que é ativado pelas citocinas IL-6, IL-21, e IL-23. Este fator de transcrição inibe a expressão do fator Foxp3, que é crucial para a diferenciação das células Treg (abaixo referenciadas), induz também a ativação do RORγt, e promove a expressão do recetor de IL-23[12].

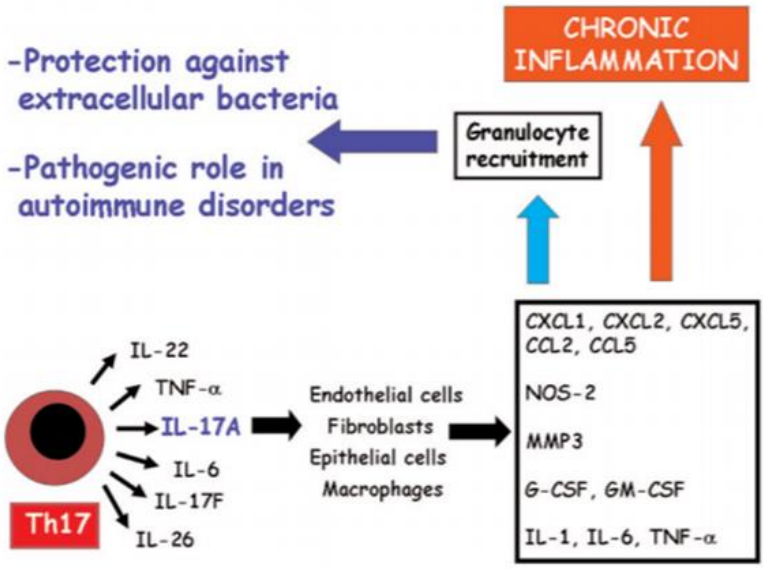


Figura 3- **Principais funções atribuídas às células Th17**. Estas produzem várias citocinas, nomeadamente a IL-17, que ativam vários tipos de células que contribuem para a produção de compostos pro-inflamatórios. Tal resulta no recrutamento de granulócitos e macrófagos, que desempenham um papel na proteção contra bactérias extracelulares e na manutenção da microbiota intestinal, cuja alteração pode resultar no desenvolvimento e doenças autoimunes[13].

A IL-17 é uma citocina inflamatória, composta pelas subunidades p35 e p28, que mobiliza, recruta e ativa diferentes células imunológicas para o processo de inflamação. Possui um papel fundamental na estimulação dos macrófagos e na produção de outras citocinas como a IL-6, a IL-8, e a IL-10[14]. Embora protetora contra

infeções, a sua sobre-expressão está associada a uma maior reatividade do sistema imunitário. Ensaios experimentais usando anticorpos bloqueadores de recetores de IL-17 demonstraram atenuar certas doenças autoimunes. A IL-17A e a IL-17F promovem a inflamação ligando-se aos seus respetivos recetores IL-17RA e IL-17RC que são expressos em células hematopoiéticas e noutras células cuja função também se relaciona com a inflamação. Consequentemente, níveis elevados de IL-17 foram detetados em várias doenças autoimunes. Sabe-se que os linfócitos Th17 promovem a rutura da barreira hematoencefálica, promovendo a inflamação do sistema nervoso central. Sabe-se que a diferenciação das células Th17 está dependente de várias vias de sinalização iniciadas por diferentes fatores como representado na figura 4[15].

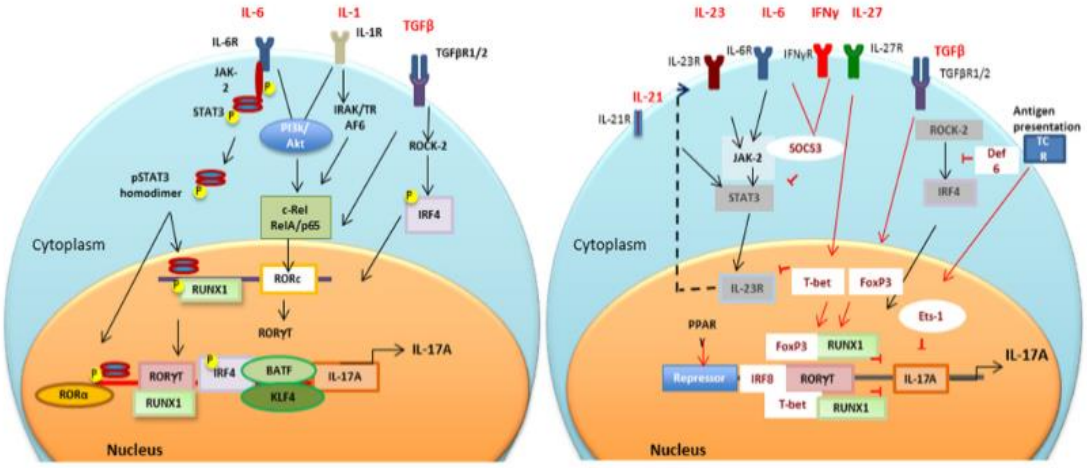


Figura 4 - **Reguladores transcricionais da expressão de IL-17**. Diferentes citocinas desencadeiam diferentes vias de sinalização para a ativação de genes e outros fatores. Para a promoção da IL-17 (do lado esquerdo) encontra-se envolvido o gene RORc que codifica o fator de transcrição RORγ cuja interação com o fator RUNX1 resulta na diferenciação linfocitária em células Th17. Sabe-se que estas não expressam GATA3 nem T-bet, em vez disso expressam RORγ que pode ser induzido pela presença de TGF-β e IL6. Existem também reguladores negativos (setas e linhas vermelhas, do lado direito), como o fator T-bet e a Foxp3 que inibem a interação RORγt-RUNX1, inibindo a expressão de IL-17. A ligação do Def-6 ao IRF (Fator de Transcrição Regulador de Interferão) impede a fosforilação do mesmo, mediada pela ROCK2 provocando o mesmo efeito. Existe ainda o recetor proliferador ativado pelo peroxissoma γ (PPARγ) que funciona como um supressor da sinalização por citocinas[16].

As células $CD4^+$ podem também diferenciar-se em células reguladoras designadas por Treg que contrariam a ação das células efetoras anteriormente apresentadas, evitando assim reações inflamatórias prejudiciais que envolvem a destruição das células do próprio organismo[17]. Em particular as células T CD4+

autorreativas, reconhecem os péptidos (antigénios) existentes na superfície das próprias células do organismo, mas podem ser inativadas por meio de interleucinas que ativam as células Treg que suprimem este tipo de atividade[18]. As células T reguladoras (Treg) podem ser geradas no timo, ou produzidas na periferia, ou ainda induzidas em cultura *in vitro* na presença do TGF-*β*. Estas células expressam citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o próprio TGF-*β* (figura 5). Sabe-se também que a IL-2 promove esta diferenciação, e inibe a diferenciação em células Th17[19].

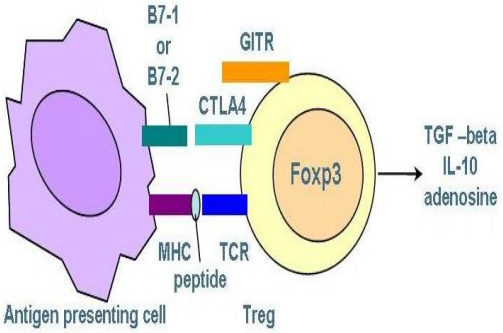


Figura 5- **Modelo proposto para a imunossupressão mediada pelas células T reguladoras**. As células T CD4+ autorreativas, reconhecem os péptidos (antigénios) existentes na superfície das próprias células do organismo. Posteriormente, por meio de interleucinas, as células Treg conseguem suprimir este tipo de atividade[20].

A expressão de Foxp3 é essencial para a diferenciação das células Treg e também para a sua capacidade de supressão. Os fatores de transcrição RUNX1 e NFAT ligam-se à região promotora do gene que codifica o Foxp3, induzindo a sua expressão[21]. A estabilidade das células Treg é assegurada por uma complexa rede de fatores, que regulam direta ou indiretamente a expressão de Foxp3. Estes fatores reguladores podem comprometer a função das células Treg, essencialmente por processos de desfosforilação ou desacetilação que inibem a expressão do Foxp3 ou por ativação de vias de sinalização que promovem o crescimento e proliferação celular[22]. Destacam-se ainda as citocinas ativadoras, recetores celulares específicos e produtos derivados do metabolismo de microrganismos comensais. As citocinas TGF-*β* e IL-2 (através do STAT5) promovem a expressão de Foxp3, induzindo o crescimento das Treg[23]. O TCR e o CD28 são recetores de superfície cruciais na ativação da função reguladora, enquanto o Nrp1 é um recetor que ativa o fator de transcrição PTEN, por sua vez inibe a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, inibidora do Foxp3. Por fim, os ácidos gordos de cadeia curta inibem a ação de enzimas HDAC que acetilam o Foxp3 promovendo a sua ação (figura 6)[24].

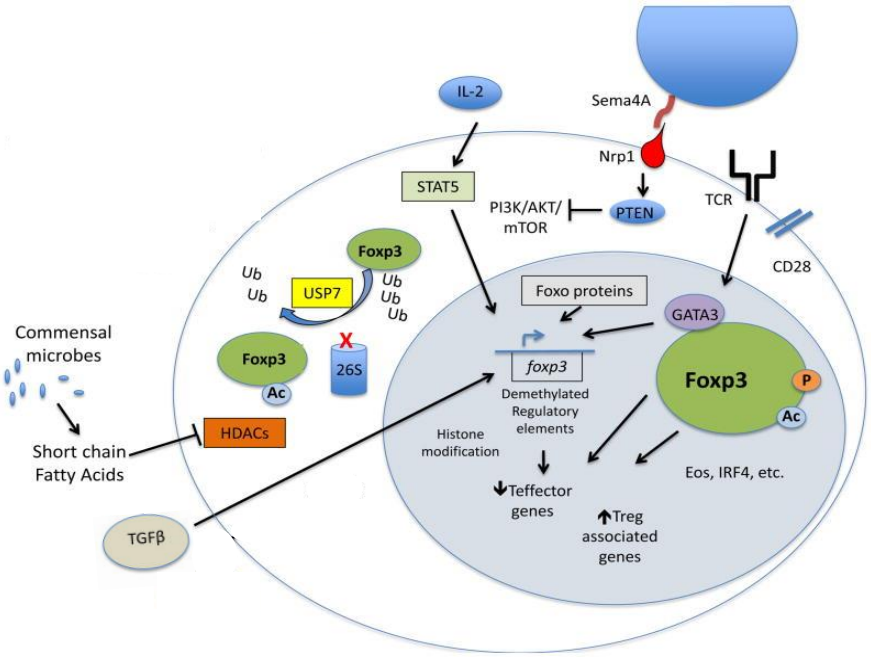


Figura 6- **Fatores que contribuem para a estabilidade funcional das células Treg.** Citocinas ativadoras (TGF-*β* e IL-2), recetores celulares específicos (TCR, CD28, Nrp1) e produtos derivados do metabolismo de microrganismos comensais (*short chain fatty acids*) são alguns dos fatores que regulam a expressão de Foxp3 e consequentemente a atividade das células Treg[25].

Em algumas circunstâncias, através de mecanismos celulares que ainda não são totalmente conhecidos, as células Th17 podem converter-se em células Treg e Th1 pelo processo de transdiferenciação que consiste numa reprogramação celular, em que é alterada a expressão génica (Figura 7). Esta plasticidade pode, por exemplo, conferir funções adicionais às células Th17 em imunidade tumoral. A possibilidade de conversão em células Treg, poderá conferir funções imunosupressoras, ainda não demonstradas. No entanto, já foi provado que a conversão das células Th17 em Th1 leva à produção de IFN-*γ* e TNF-α no tumor, resultando numa diminuição do crescimento tumoral[26].

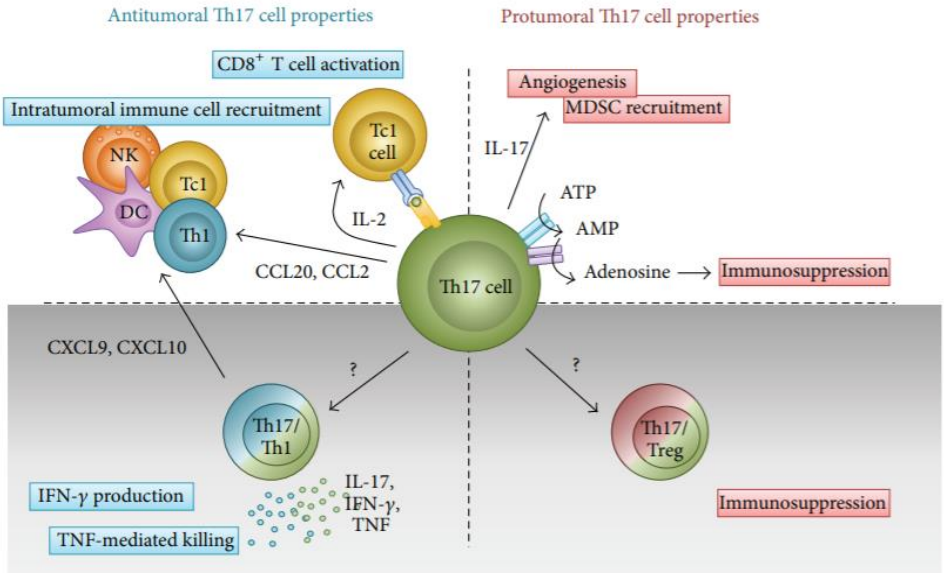


Figura 7 - **Transdiferenciação das células Th17**[27].

Em suma, as células Th1, Th17 e Treg constituem 3 dos 4 tipos principais de células que resultam da diferenciação das células T CD4+. As células Th2, não sendo objeto deste estudo, estão particularmente envolvidas nas respostas alérgicas e a patogénicos extracelulares. Na figura 8 são indicadas as principais citocinas estimulatórias, fatores de transcrição e citocinas produzidas por cada população[28]. O equilíbrio entre as várias populações de linfócitos T é essencial para manter a homeostasia. No contexto da autoimunidade, existe muitas vezes um desequilíbrio na quantidade de células efetoras Th1 e Th17 produtoras de citocinas inflamatórias e células reguladoras, Treg, capazes de suprimir a resposta imunitária, sendo importante que este balanço seja conseguido para controlar a doença[29].

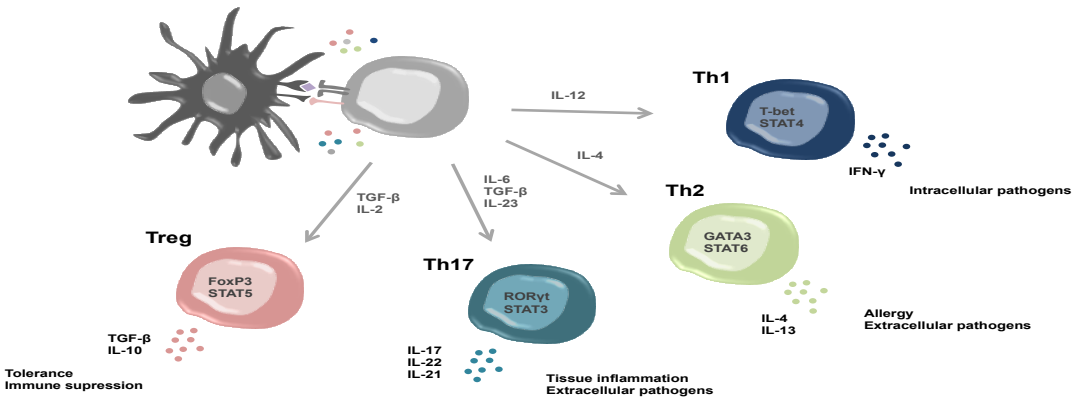


Figura 8 - **Diferenciação das células T *Naive* em células Th1, Th2, Th17 e Treg.** Citocinas, fatores de transcrição e citocinas secretadas por cada subpopulação de células diferenciadas – cedida pelo laboratório de BSS.

1.3 Doenças Autoimunes

A desregulação entre a quantidade de células efetoras Th1 e Th17 e reguladoras Treg está grandemente associada a várias doenças autoimunes. Existem mais de 70 doenças autoimunes diferentes que afetam aproximadamente 5% da população dos países ocidentais. Manifestam uma grande variabilidade em termos de idade, sexo e resposta aos tratamentos imunossupressores. Sabe-se que a origem poderá tratar-se de uma interação complexa de fatores ambientais, cuja maioria ainda está por identificar. De seguida serão mencionadas algumas doenças autoimunes onde a existência de linfócitios Th1, Th17 e Treg é relevante para a resolução/fenótipo da doença[30].Verifica-se que, em algumas destas doenças autoimunes, como as inflamatórias intestinais e a diabetes tipo 1, existe pouco ou nenhum viés sexual associado[31], estando, no entanto, a maioria associada ao sexo feminino.

O lúpus eritematoso sistémico (LES) é um destes exemplos de uma doença autoimune crónica, com um forte viés sexual, numa proporção em que em cada 10 pacientes pelo menos 7 são mulheres. Caracteriza-se por inflamação e dor generalizada, sendo uma doença multifactorial altamente polimórfica. Deve-se a alterações na regulação genética do sistema imunitário que levam à danificação de tecido saudável, existindo maior incidência de sintomas a nível da pele, das articulações, e em múltiplos órgãos internos, dos quais os rins e o coração. É caracterizado pela inflamação de órgãos por células T. Pacientes com LES demonstram um aumento na quantidade de células Th17 e uma diminuição das células Th1 no sangue, assim como da expressão de IFN-γ e IL-2[32]. Vários estudos consideram a hipótese das células Th17 desempenharem um papel fundamental na iniciação e desenvolvimento do LES. Sabe-se que a ação de células T efetoras autorreativas é suprimida pela ação das células Treg. No entanto, permanece bastante controvérsia a respeito da contribuição destas células para a prevenção da doença. Estudos que envolvem a análise de citocinas plasmáticas poderão esclarecer esta questão, assim como o desequilíbrio verificado entre os tipos de células T CD4+. As interleucinas, secretadas por estas células, cada vez mais estão a ser utilizadas como biomarcadores para o diagnóstico complementar da doença[33].

No caso da artrite reumatóide (AR), esta consiste numa doença que se caracteriza pela inflamação crónica das articulações sinoviais, comprometendo a funcionalidade destas, ocorrendo destruição do tecido ósseo e cartilaginoso, assim como a formação

de tecido extra-articular, devido à produção de anticorpos específicos como o fator reumatóide. A doença afeta aproximadamente 1% da população mundial e pensa-se que seja causada por fatores de origem genética. A AR é cerca de três vezes mais comum em mulheres do que em homens, com uma maior incidência em indivíduos com mais de 50 anos. Estudos indicam uma associação entre a AR e polimorfismos de um único nucleótido do grupo de genes TIMP1 codificados pelo cromossoma X, que está envolvido na inibição das MMP da matriz do osso, na inibição da degradação da cartilagem, e no recetor de IL-9[34]. As células T CD4+ possuem um papel muito relevante nesta doença, existindo uma correlação direta entre o aumento de células Th17 no sangue periférico e a atividade da doença. Geralmente, o aumento das células Th1 não é significativo. As interleucinas produzidas pelas células Th17, por sua vez, atuam noutras células do organismo levando à manifestação dos sintomas da AR (Figura 9)[35]. Sabe-se que as células Treg são capazes suprimir a produção de citocinas pelas células T efetoras, no entanto, no contexto da doença, a sua função demonstra-se desregulada, devido à diminuição da expressão do recetor CTLA4[36].

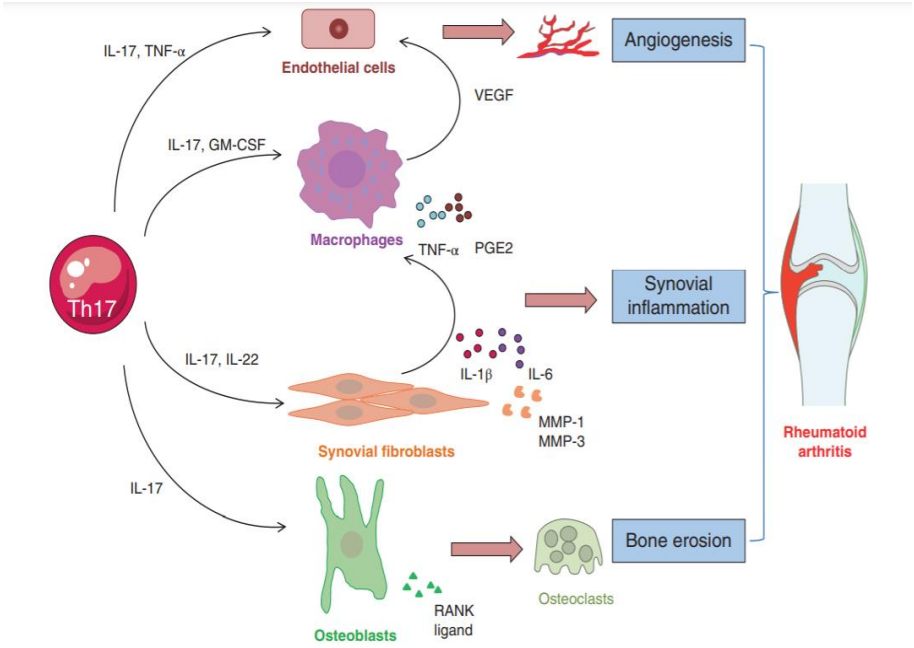


Figura 9- **Funções atribuídas às citocinas das células Th17 na artrite reumatoide**. As citocinas produzidas ativam fibroblastos sinoviais e macrófagos que, por sua vez, produzem outros fatores que agravam a inflamação do líquido sinovial. Para além destes, pode ser induzida a expressão de RANKL em osteoblastos, levando a danos na cartilagem e erosão óssea. Através do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é também promovida a angiogénese[37].

A psoríase (Ps) é uma outra doença inflamatória crónica que afeta a pele e que abrange cerca de 2,5% da população mundial. É caracterizada pela inflamação e hiperproliferação epidérmica, que levam ao surgimento de placas vermelhas escamosas. Atualmente, a causa da doença ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que possui um forte componente hereditário. A maioria dos genes conhecidos que promovem a predisposição estão relacionados com o sistema imunitário, particularmente o complexo principal de histocompatibilidade e as células imunológicas[38]. A IL-23 é uma citocina a ser destacada na patogénese da doença. Esta estimula a diferenciação, proliferação e sobrevivência das células Th17 que promovem a produção de IL-17A que por sua vez agrava as principais manifestações da doença. Estas iniciam-se à medida que as células Th1, ao serem ativadas, produzem citocinas, das quais a IL-2, o TNF-α e o IFN-*γ* que estimulam o recrutamento de várias células inflamatórias e, consequentemente as alterações epidérmicas. Estas citocinas ativam o fator de transcrição fator nuclear κB (NF-κB), que perpetua ainda mais a reação inflamatória[39]. Verifica-se que na doença a quantidade de células Treg se mantém constante, no entanto estas, possuem a sua função comprometida, sendo este um fator crucial na sua patogénese, tal deve-se a uma estimulação contínua do recetor TCR das mesmas[40].

Outra doença crónica, em que se destaca a função das células T, consiste na doença de Crohn (DCr). Esta consiste na inflamação de qualquer parte do trato gastrointestinal. É desencadeada por um conjunto de diversos agentes genéticos e externos, dos quais se destacam os microbianos, que interagem com o sistema imunitário, levando à produção das mesmas citocinas descritas na Ps, a IL-2, o TNF-α e o IFN-*γ*, juntamente com outras, em que os respetivos recetores são encontrados na mucosa intestinal. Frequentemente estão associadas infeções por micobactérias e fungos que provocam um desequilíbrio na microbiota intestinal que persiste, mesmo após o tratamento das mesmas. Juntamente com a predisposição genética é provocado um efeito sinérgico[41]. As células T efetoras (Th1 e Th17) são essenciais para defesa contra agentes patogénicos, que interferem com a microbiota. Sabe-se que no contexto da doença ocorre o aumento da produção de IL-17 e de IFN-*γ*, promovendo a proliferação e a hiperatividade das células T efetoras, em relação às células T reguladoras, ocorrendo a inflamação intestinal e a disfunção da barreira intestinal (figura 10)[42].

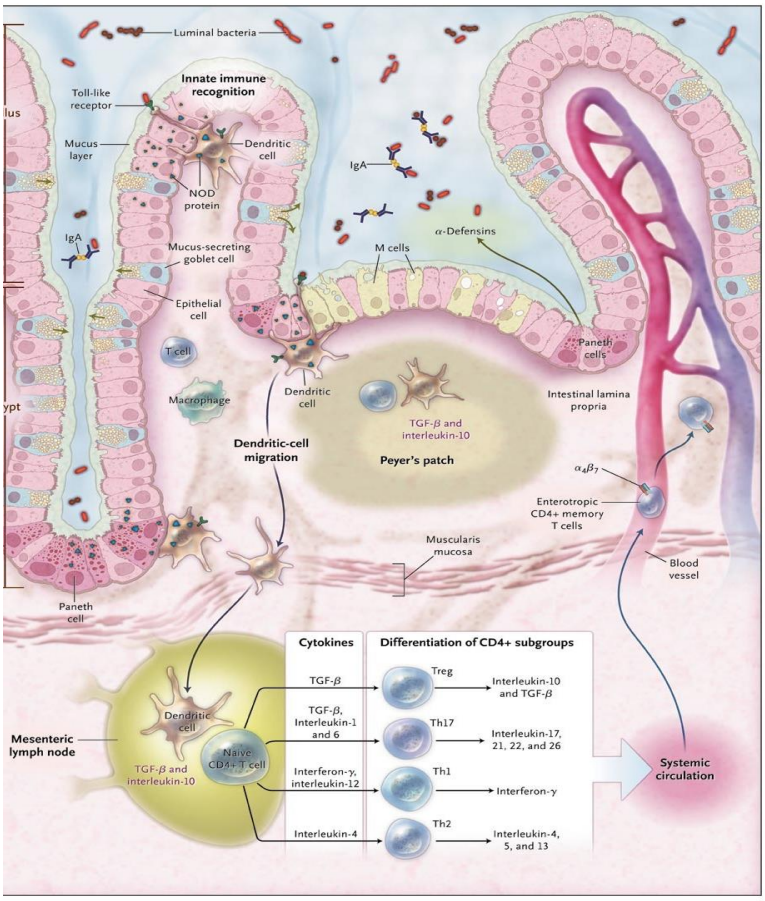


Figura 10- **Resposta imunitária na DCr**. Num indivíduo saudável, as células caliciformes secretam uma camada de muco que limita a exposição das células epiteliais intestinais às bactérias da mesma. A expressão de péptidos antimicrobianos (por exemplo, α-defensinas) pelas células *Paneth* fornece proteção adicional. As células dendríticas apresentam antigénios às células T CD4 + em órgãos linfóides secundários (Placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos), onde citocinas (TGF-*β* e IL-10) modulam a sua diferenciação e ao serem ativadas entram então em circulação no intestino, em que as suas respetivas funções conduzem à doença[42].

A esclerose múltipla (EM) é uma doença que se caracteriza pela inflamação do sistema nervoso central. Um distúrbio que afeta um em cada 400 indivíduos, sendo 4 vezes mais comum em mulheres, e constitui a causa mais comum de incapacidade neurológica dos jovens adultos[43]. Resulta de uma interação entre fatores ambientais não identificados e alterações génicas que promovem a suscetibilidade. Estes fatores geram uma reação em cadeia, envolvendo o sistema imunitário, causando lesões inflamatórias nos axónios, levando à perda da bainha de mielina e, consequentemente, à neurodegeneração[44].

Para além dos neurónios, existem as células gliais presentes numa proporção semelhante que se dividem em microglia, que abrange um conjunto de macrófagos especializados que são ativados pelas células T através do IFN-*γ*, e em macroglia que inclui células cujas funções proporcionam a sobrevivência dos neurónios, das quais os oligodendrócitos que constituem o principal alvo da resposta imunológica. Estes sintetizam mielina, na região central do sistema nervoso que se concentra em torno dos axónios para criar um isolamento do potencial de ação que promove a sua propagação. A bainha de mielina é segmentada de forma a gerar uma condução axonal saltatória[45]. Quando esta é comprometida, ocorre latência dos potenciais evocados visuais, auditivos e somatossensitivos. Numa fase primária da doença, ocorrem episódios de disfunção neuronal e de recuperação tecidual, em que ocorre o desaparecimento dos sintomas que, por sua vez, voltam a surgir. Numa fase secundária, estes demonstram-se persistentes causando danos permanentes no sistema nervoso. Resultados obtidos de amostras de pacientes com EM e de modelos animais com a doença revelam que as células Th1 e Th17 contribuem para a patogénese da doença (como representado na figura 11), enquanto que as células Treg conferem proteção à mesma[46]. O tratamento atual da EM consiste no alívio sintomático e em retardar o surgimento dos efeitos duradouros, evitando a incapacidade. A compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da diferenciação dos linfócitos T CD4+ diretamente envolvidos na patogénese e/ou proteção da doença será muito importante para desenvolver novas terapias[48].

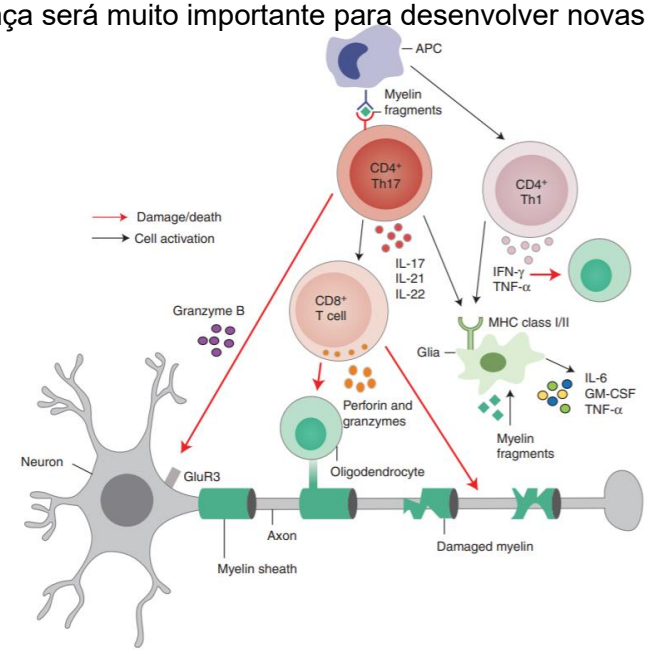


Figura 11- **Células T efetoras na EM**. Nesta doença é mantido um estado inflamatório constante no sistema nervoso central que contribui para a morte de oligodendrócitos, e

consequentemente a morte de neurónio. As células secretoras de IL-17 (Th17) e IFN-γ (Th1) ativam localmente células da glia e células APCs, através do MHC. As citocinas pro-inflamatórias produzidas pelas células Th17 (IL-17, IL-21 e IL-22) podem ativar as células T CD8+ levando à produção de perforinas e granzimas que, em conjunto com a granzima B produzida pelas próprias e o IFN-γ produzido pelas células Th1 podem levar à destruição direta dos oligodendrócitos[48].

1.4 miRNAs e a sua função na regulação da diferenciação das células T CD4+

Os microRNAs (miRNAs) constituem uma grande família de RNAs não codificantes essenciais à regulação pós-transcricional, promovendo a degradação ou impedindo a tradução dos respetivos RNAs mensageiros[49]. Regulam múltiplos processos celulares, incluindo a proliferação e diferenciação celular e também a própria função e diferenciação dos linfócitos T CD4+ [50].

Os miRNAs correspondem a RNAs de curta dimensão com comprimento entre 19 e 24 nucleotídeos que se ligam à extremidade 3' UTR dos genes alvo, induzindo a inibição ou degradação do RNA mensageiro alvo. Em animais, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II a partir de DNA não codificante, originando um ácido nucleico com um comprimento mais longo designado por "'pri-miRNA'' (Figura 12)[51]. Uma vez transcrito, a cadeia gerada dobra sobre si mesmo e é clivada formando um pré-miRNA, com o auxílio do complexo Drosha-DGCR8. Este transcrito é clivado pela proteína Dicer depois de abandonar o núcleo por meio de uma exportina, gerando o miRNA maduro. Apenas uma das cadeias deste miRNA é utilizada nos passos subsequentes, sendo que várias são as teorias que propõem o método de seleção[52]. A cadeia de miRNA é associada à proteína AGO ou Argonauta, e juntas formam o complexo de silenciamento de genes. Alternativamente, os miRNAs podem derivar de intrões (não codificantes) de pré-mRNAs, sendo processados por um mecanismo semelhante ao referido anteriormente (Figura 12, esquema da direita)[53].

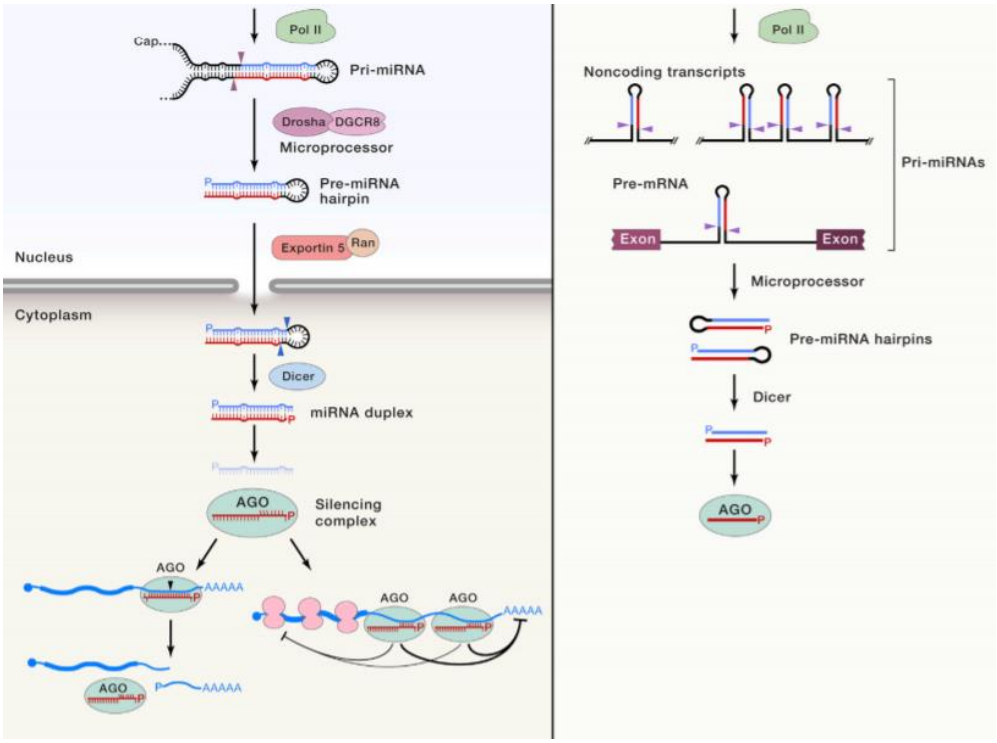


Figura 12- **Via de biogénese de um miRNA**[53].

Alguns pri-miRNAs não requerem a ação da Drosha durante a sua biogénese. Em contraste com os miRNAs canónicos, os miRNAs não canónicos, como é o caso do pri-miR-451, são demasiado curtos para serem processados pela Drosha, sendo clivados por um microprocessor e por uma exonuclease designada por PARN, que gera um miRNA maduro. Estes miRNAs, ao contrário dos canónicos, são pouco conservados filogeneticamente e são pouco expressos, carecendo de funções reguladoras[54].

Os miRNAs geralmente regulam vários mRNAs alvo, sendo a identificação destes extremamente importante para a compreensão do seu mecanismo de ação. Vários estudos demonstraram que os miRNAs são reguladores essenciais da diferenciação de linfócitos T CD4+[55]. Observou-se que a depleção de todos os miRNAs especificamente em células T provoca uma redução da proliferação e sobrevivência destas células, e um aumento da produção das citocinas inflamatórias IFN-*γ* e IL-17A, pelas células T CD4+, bem como inflamação espontânea e autoimunidade *in vivo*[56].

Existem também miRNAs específicos que foram identificados como reguladores da diferenciação de células T efetoras e de células T reguladoras (Figura 13). O miR-29, por exemplo, reprime a expressão do IFN-*γ* através da degradação do

T-bet e Eomes, reguladores transcricionais da expressão de IFN-γ[57]. Por outro lado, os membros do cluster miR-106~363 influenciam a diferenciação das células Th17 por degradação do fator de transcrição associado a Th17, ROR-γ, levando à diminuição da produção de IL-17A[58]. O miR-125a por sua vez, promove a atividade das células T reguladoras através da supressão de fatores ligados às células efetoras, tal como o STAT3 e o IFN-γ[59].

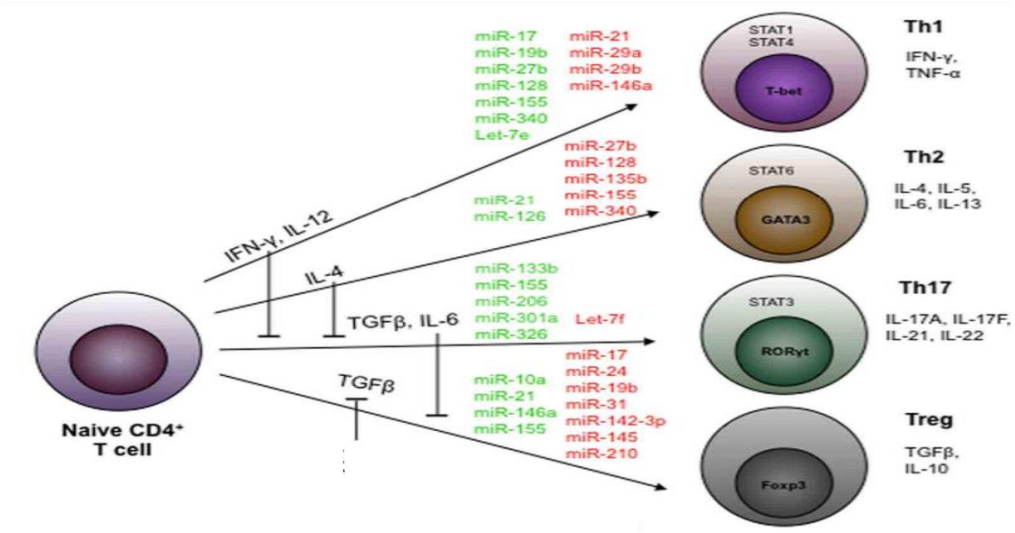


Figura 13- MicroRNAs envolvidos na diferenciação das células T CD4+. A vermelho, os microRNAs que inibem a diferenciação celular. A verde, os microRNAs promovem a diferenciação celular (adaptado)[60].

Dados recentes mostram que miRNAs específicos participam também na modulação da diferenciação de linfócitos T numa grande variedade de doenças autoimunes, incluindo a EM. Por exemplo, a sobre-expressão do miR-326 estimula a produção de IL-17 em células Th17 através da inibição da expressão de Ets-1, aumentando a patogénese da EM[61]. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da diferenciação dos linfócitos T, mediada por miRNAs pode assim contribuir para uma melhor compreensão da patofisioloiga associada a doenças autoimunes. Este conhecimento permitirá, por um lado, a identificação de biomarcadores associados a diferentes estádios de progressão da doença, auxiliando no diagnóstico e prognóstico da mesma e, por outro lado, a descoberta de novos alvos terapêuticos.

Este estudo visa assim fazer uma revisão da literatura com um foco especial nos miRNAs que se encontram associados à diferenciação de linfócitos T CD4+ em

várias doenças autoimunes, incluindo a LES, Ps, AR, Doença de Crohn e EM bem como na identificação dos seus alvos moleculares. Pretende-se identificar mecanismos comuns e específicos a estas doenças com uma validação final dos resultados num modelo experimental de EM.

1.5 Dados Preliminares

No âmbito do projeto CoG-646701 ERC foi gerado e validado um modelo animal de ratinho triplo reporter para o IFN-γ (YFP+), IL-17a (GFP+) e Foxp3 (hCD2+), Foxp3-hCD2.Ifnγ-YFP.Il17a-GFP, como indicado na figura 14 A. Este modelo animal foi sujeito a encefalomielite autoimune experimental (EAE) após injeção de 100 µg do péptido da glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) emulsificada numa solução de CFA, tendo-se adminstrado 200 ng da toxina pertussis via endovenosa no dia da imunização e dois dias depois da mesma. A progressão da doença foi monitorizada pela análise do grau clínico da doença, que é semelhante em ratinhos wt (C57BL/6) e em ratinhos reporters triplos (Figura 14 B e C). As três populações Th1, Th17 e Treg foram isoladas a partir do baço e nódulos linfáticos na fase plateau (figura 15 A) de acodo com a estratégia de "*gating*" indicada na figura 15 B.

O RNA total extraído a partir destas células foi sujeito a RNA-seq e small-RNA-seq, tendo-se observado, por RNA-seq, uma segregação clara entre as populações de Th1, Th17 e Treg, encontrando-se os "genes-assinatura" de cada população, como por exemplo, o IFN-γ, o IL-17 e o Foxp3, respetivamente, entre outros, enriquecidos nas populações respetivas (dados não apresentados). Os dados de miRNA-seq permitiram a identificação de 110 miRNAs diferencialmente expressos entre as populações Teff e Treg *in vivo* (figura 16), tendo-se identicado também cerca de 4000 mRNAs diferencialmente expressos entre essas populações (dados não incluídos neste trabalho).

Estes resultados foram obtidos por análise bioinformática dos miRNAs/mRNAs sequenciados, tendo as "*reads*" obtidas através de miRNA-seq sido processadas usando a "*pipeline*" CAP-miRSeq[62]. Mais concretamente, as "*reads*" foram filtradas, tendo os adaptadores sido removidos usando o "*cutadapt*". As reads filtradas foram alinhadas com o genoma de ratinho (GRCm38) usando o programa bowtie[63]. A previsão e quantificação dos miRNAs foi feita com o programa miRDeep2[64], tendo os miRNAs conhecidos sido obtidos através da mirbase (versão 21)[65]. No caso do RNA-seq, as "*reads*" sequenciadas foram filtradas tendo os adaptadores sido removidos

através do uso do cutadapt. As reads filtradas foram alinhads com o genoma de ratinho (GRCm38) usando o Hisat2[66]. As tabelas de contagens de genes foram obtidas com o featureCounts[67] contra modelos de genéticos de ratinhos (gencode M16). Em ambos os casos, a análise de expressão diferencial foi efetuada com o pacote R, designado por edgeR[68]. Os dados das contagens foram normalizados através da normalização TMM[69], tendo sido aplicada estatística baesiana moderada para obtenção de genes diferencialmente expressos entre as várias condições[70].

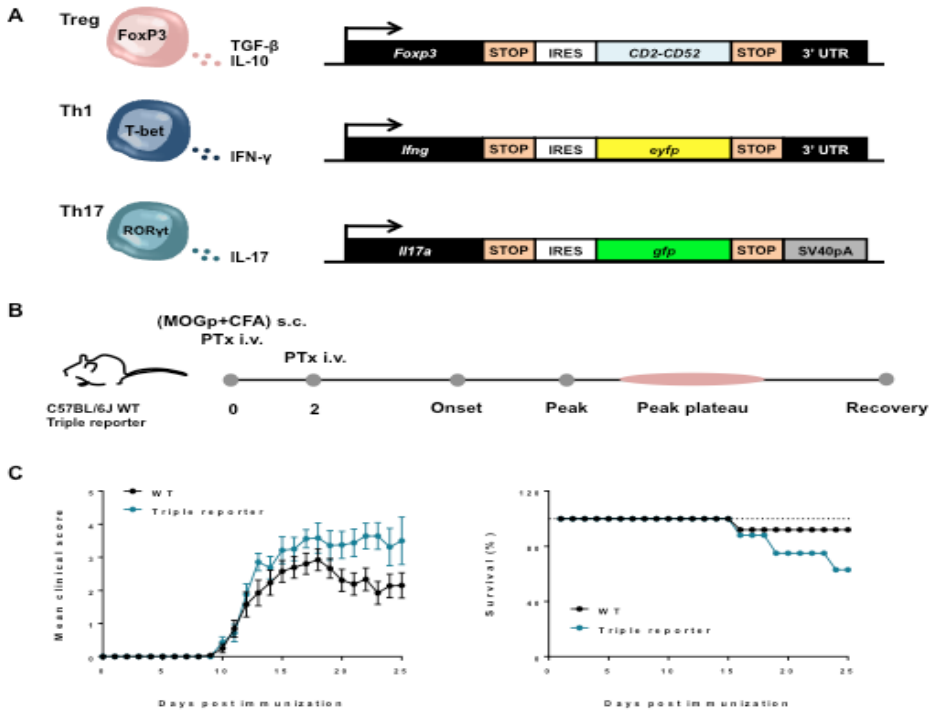


Figura 14- **Estabelecimento de um modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) no modelo triplo repórter *Foxp3-hCD2.Ifng-YFP.Il17a-GFP***. (A) A representação esquemática das alterações genómicas introduzidas no ratinho triplo repórter *Foxp3-hCD2.Ifng-YFP.Il17a-GFP* com a respetiva população de células T CD4+. Nos loci de cada gene repórter foi inserida a jusante do codão stop endógeno, a sequência de uma proteína repórter que será traduzida de forma independente (B) *Set up* experimental. (C) Comparação da progressão da doença de EAE e sobrevivência entre ratinhos WT e repórteres triplos *Foxp3-hCD2.Ifng-YFP.Il17a-GFP*. Os ratinhos foram pesados diariamente, tendo-se avaliado os sintomas clínicos de EAE.

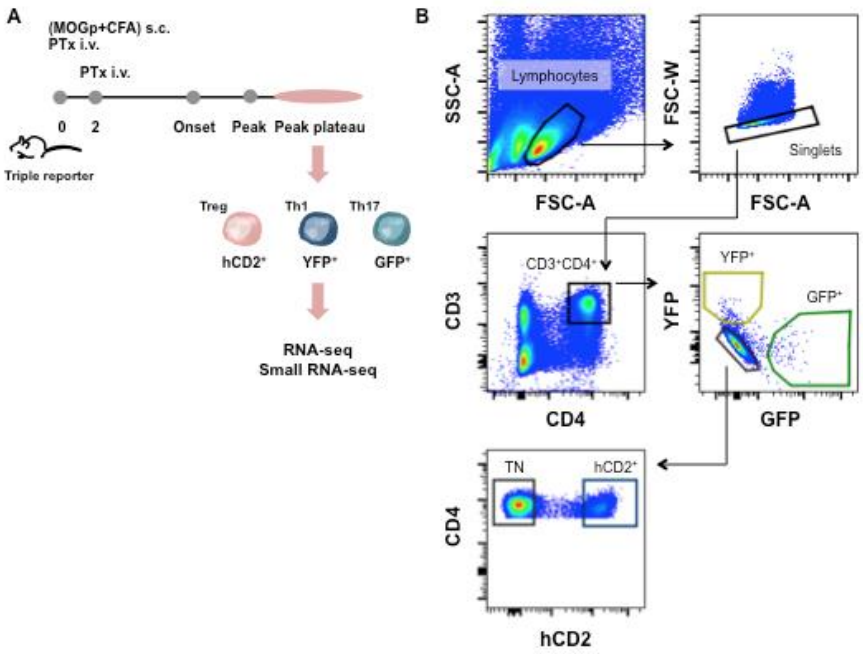


Figura 15- **Isolamento de células Treg, Th1 e Th17 a partir de ratinhos repórter triplos *Foxp3-hCD2.Ifng- YFP.Il17a-GFP* na fase plateu de EAE.** (A) As células Treg, Th1 and Th17 foram isoladas do baço e nódulos linfáticos de ratinhos repórter triplos *Foxp3-hCD2.Ifng-YFP.Il17a-GFP* na fase de plateau de acordo com o seu gene repórter, tendo o RNA isolado a partir das mesmas sido sujeito a RNA- e small RNA-seq. (B) Estratégia de definição das três populações de linfócitos (YFP+ - Th1, GFP+- Th17 e hCD2+ -Treg) por FACS.

Figura 16- **"*Heatmap*" associado à variância da expressão dos miRNAs analisados no modelo EAE.** Consideram-se diferencialmente expressos (sombreado), os miRNAS que apresentam um "*fold change"* superior a 2 (canto superior direito). Lateralmente, encontram-se os miRNAs analisados. Na base do gráfico encontram-se as amostras utilizadas para cada população celular. A- Amostra: A1-3 (Th1); A4-6 (Th17); A7-9 (Treg).

2. Objetivos

A descodificação dos mecanismos de diferenciação de linfócitos T poderá ter um grande impacto no tratamento de doenças autoimunes e em patologias crónicas e recorrentes dominadas por uma resposta imunitária exacerbada e pró-inflamatória. A função dos linfócitos T, e mais especificamente os linfócitos T CD4+, no contexto da autoimunidade, depende do balanço entre a sua capacidade de produzir citocinas inflamatórias, tais como o IFN-γ (células Th1) e a IL-17 (células Th17) por células ditas "efetoras"; e a sua atividade de supressão da resposta imune, característica de células T reguladoras (Treg). Deste modo, a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do balanço entre as subpopulações de células Teff e Treg pode contribuir para a translação do conhecimento para a terapêutica das doenças autoimunes.

A regulação desta diferenciação de linfócitos T poderá ocorrer ao nível transcricional, pós-transcricional ou a nível de sinais extracelulares. Desta forma, pretende-se com esta revisão bibliográfica:

- Identificar os principais reguladores transcricionais, pós-transcricionais e extracelulares da diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$, com especial enfase para os miRNAs, pequenos RNAs não codificantes que atuam como reguladores negativos da expressão de genes no contexto das doenças autoimunes.

Como objetivos específicos, pretende-se:

- Identificar fatores de transcrição, miRNAs (e respetivos RNAs alvo) e citocinas que estejam envolvidos na regulação da diferenciação de linfócitos T CD4+ em condições basais;
- Identificar miRNAs e os seus genes alvo que regulam a diferenciação de linfócitos T CD4+ no contexto das doenças autoimunes LES, Ps, AR, DCr e EM;
- Analisar o perfil de miRNAs identificados no contexto do modelo animal de EM;

3. Metodologia de Pesquisa Bibliográfica

A identificação de fatores reguladores envolvidos na diferenciação das células T CD4+ foi feita através da seleção de artigos científicos que fazem referência aos mesmos. Após a leitura destes, a sua informação é inserida em tabelas. As duas primeiras dizem respeito à regulação genética das células T CD4+ em condições basais. A primeira tabela resume a informação encontrada sobre genes codificantes. A segunda resume a informação relativa a miRNAs. As restantes tabelas incluem a informação encontrada sobre o perfil de expressão de diferentes miRNAs em doenças autoimunes bem como os seus genes alvo. Foi utilizada a base de dados Pubmed que consiste num motor de busca que reúne uma ampla quantidade de referências bibliográficas, relativas à área da saúde.

Para facilitar a seleção, foram utilizados filtros disponibilizados pela própria plataforma que possibilitam uma análise rápida. Na pesquisa de artigos está sempre presente o filtro "*in the last 10 years"* que proporciona a obtenção de artigos científicos com a informação mais recente. Para a construção das duas primeiras tabelas, anteriormente referidas, aplica-se adicionalmente o filtro "*Review",* pelo facto de este reduzir o número total de artigos, possibilitando uma análise eficiente. Para a construção das restantes tabelas, é removido este filtro, visto que a quantidade de artigos encontrados não justifica a sua utilização. Para além da possibilidade de o mesmo remover artigos cruciais a serem integrados nas mesmas.

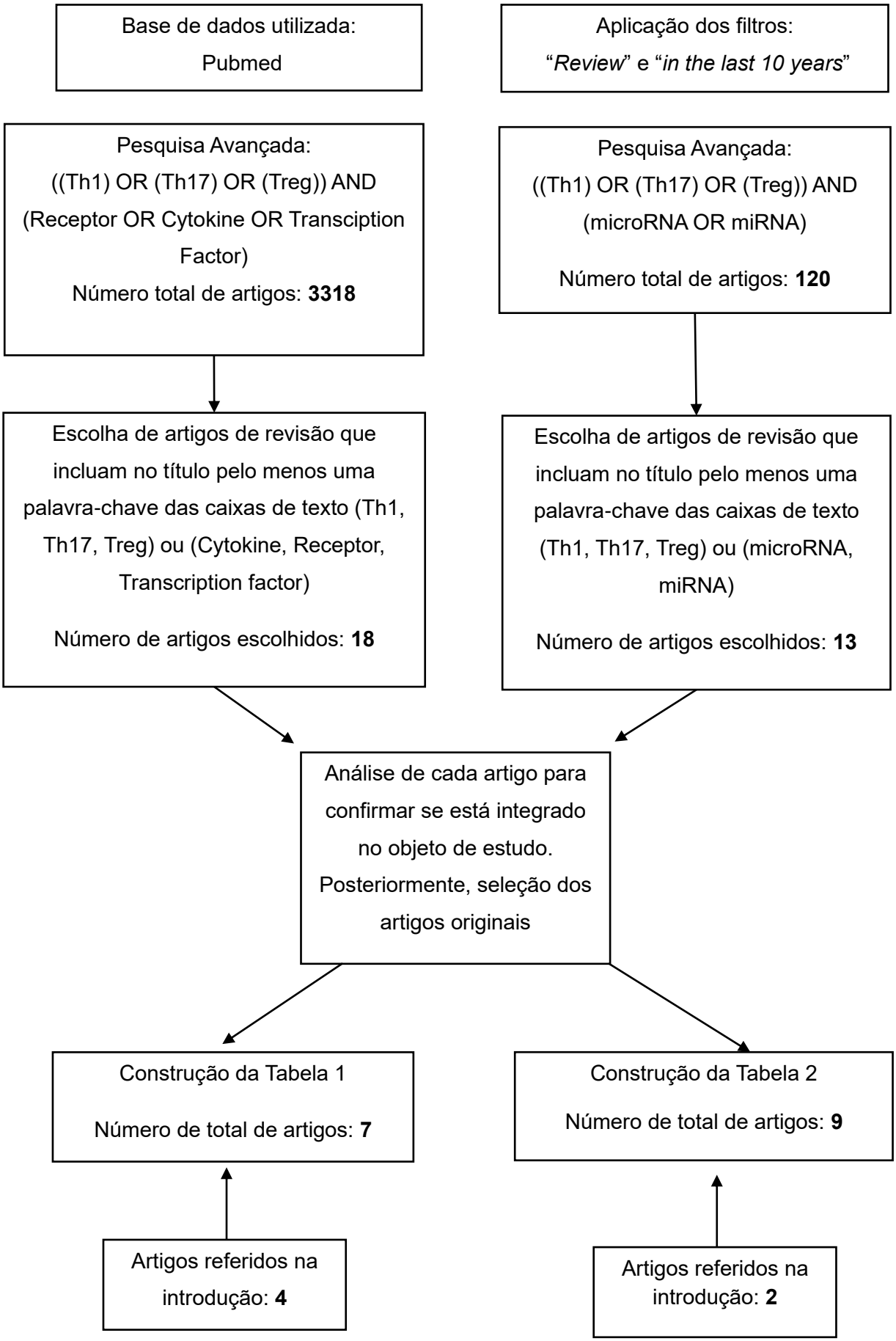
Foi necessário determinar quais os termos que melhor se ajustam na obtenção do máximo número de artigos relativos ao objeto de estudo. A plataforma Pubmed permite a realização de uma pesquisa avançada que consiste na inserção de palavras-chave em diferentes caixas de texto, conduzindo à obtenção de artigos com informação de cada uma delas. A primeira caixa de texto inclui sempre os termos "Th1", "Th17" e "Treg". Foi considerado o uso do termo "T cell", no entanto este gerava uma elevada quantidade de artigos relativos a células que não constituem o objeto de estudo. Como tal, esse termo foi excluído. A segunda caixa de texto inclui os termos *"microRNA"* e "*miRNA"*. Nas tabelas relativas às doenças autoimunes, é adicionada uma terceira caixa de texto, em que se insere o nome da doença autoimune e a sua sigla.

Durante a escolha dos artigos, são excluídos aqueles cujo título não refere nenhum dos termos mencionados anteriormente. São incluídos artigos que possuam pelo menos um dos termos das duas caixas de texto, ou seja cada título refere um dos

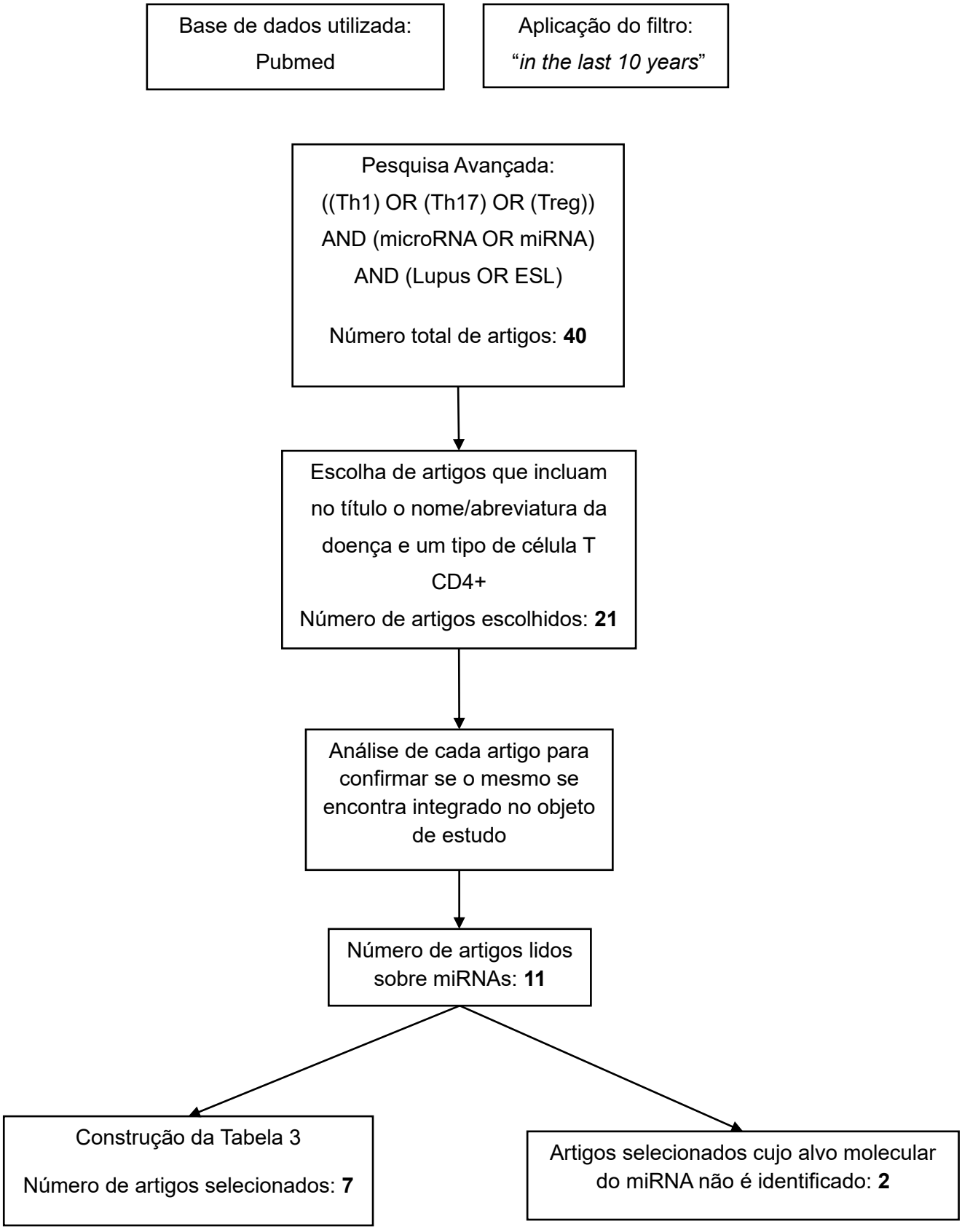
três tipos de células T CD4+ ou identifica um fator regulador específico, correspondente a um microRNA (ou um gene codificante, no caso da tabela 1). Torna-se relevante destacar que relativamente às tabelas 1 e 2 foram incluídos fatores reguladores referidos na introdução. Esta metodologia não se aplica às restantes tabelas. Nas pesquisas relativas às doenças autoimunes, torna-se obrigatório referir o nome da doença ou a sua abreviatura no título do artigo. Existe a possibilidade de surgir uma sigla que corresponde a um conjunto de doenças que abrange a mesma que se pretende estudar. Para esse caso, o artigo também é incluído para análise. Verifica-se que alguns artigos mencionam os termos inseridos, mas que posteriormente nada inferem sobre a regulação da diferenciação das células T CD4+, ou que abordam a mesma, em condições diferentes da fisiológica e da autoimunidade, não sendo incluídos, por esse motivo.

Por fim, para a seleção dos artigos, inicialmente é verificado o resumo dos mesmos para determinar se estes fazem referência à regulação da diferenciação, devendo, ou não, serem inteiramente analisados. Durante a leitura, procura-se a informação relativa ao tipo de célula e ao efeito gerado na regulação da diferenciação. É somente destacado o efeito expresso em células T CD4+ (Th1, Th17 ou Treg), e o fenótipo observado na doença, sendo também realçado o alvo molecular de cada miRNA. No caso dos artigos que não possuem a informação sobre os alvos moleculares, os miRNAs identificados são designados como potenciais biomarcadores e inseridos numa tabela final.

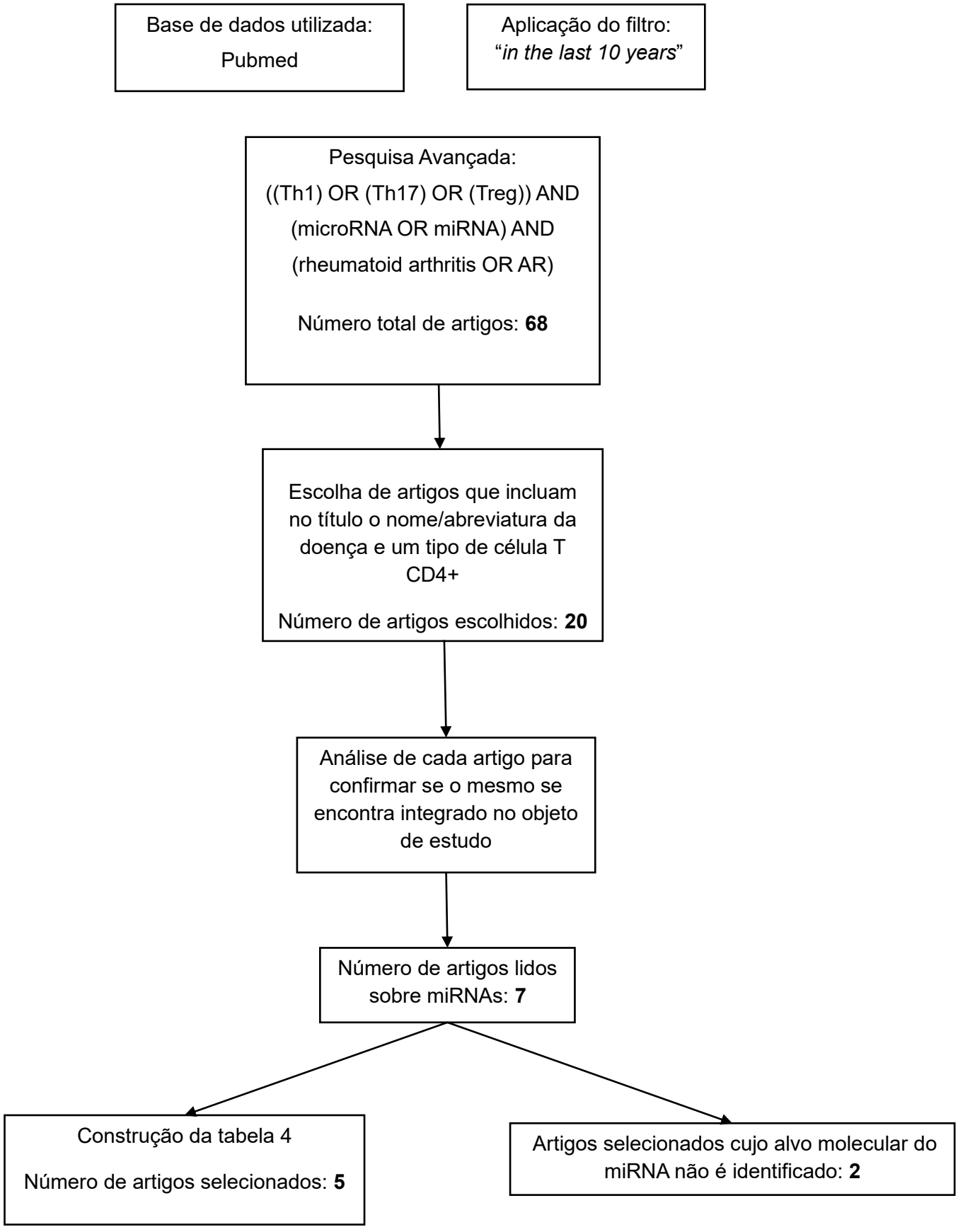
3.1 Seleção de fatores reguladores em condições basais



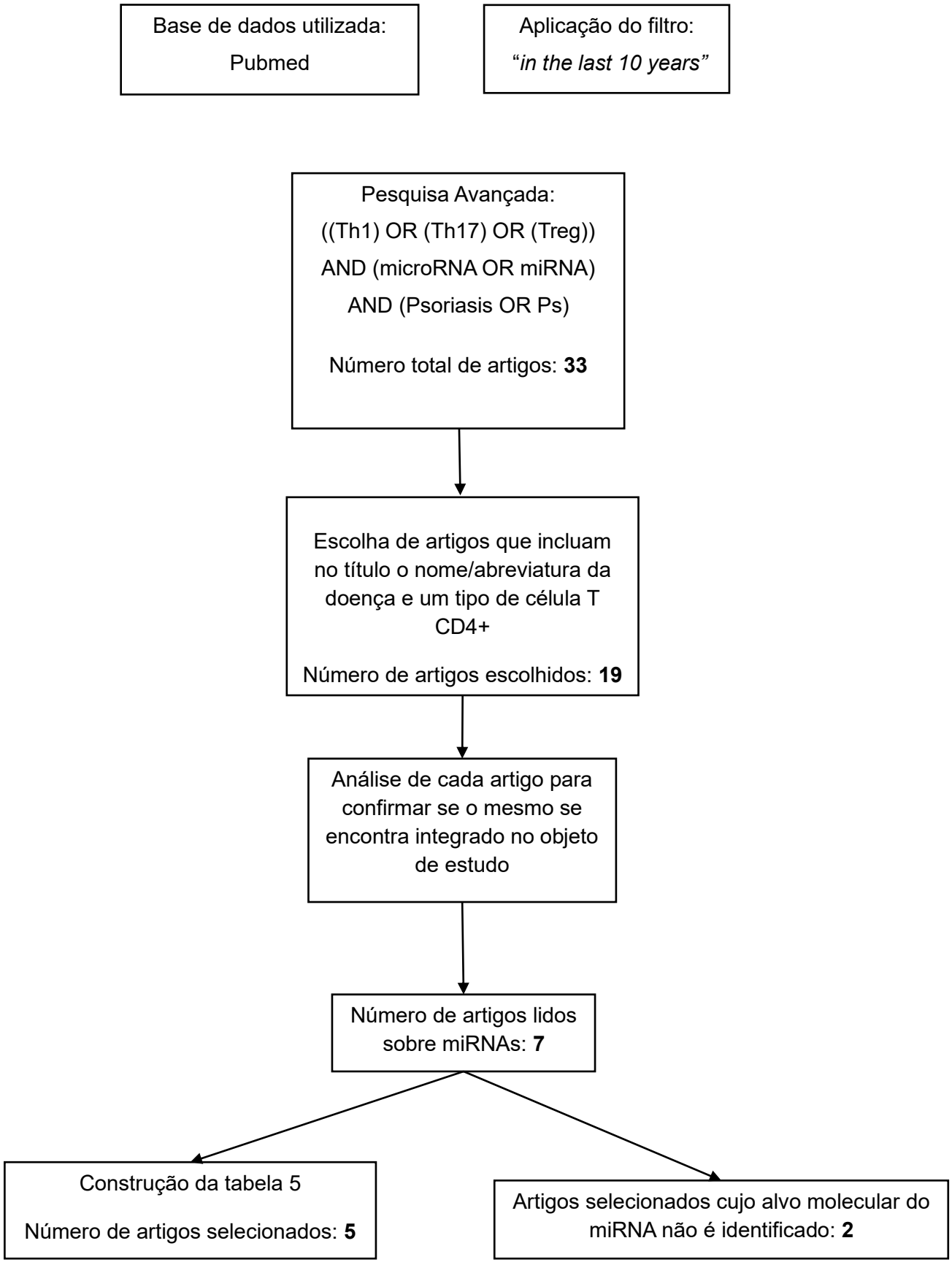
3.2 Seleção de fatores reguladores no LES



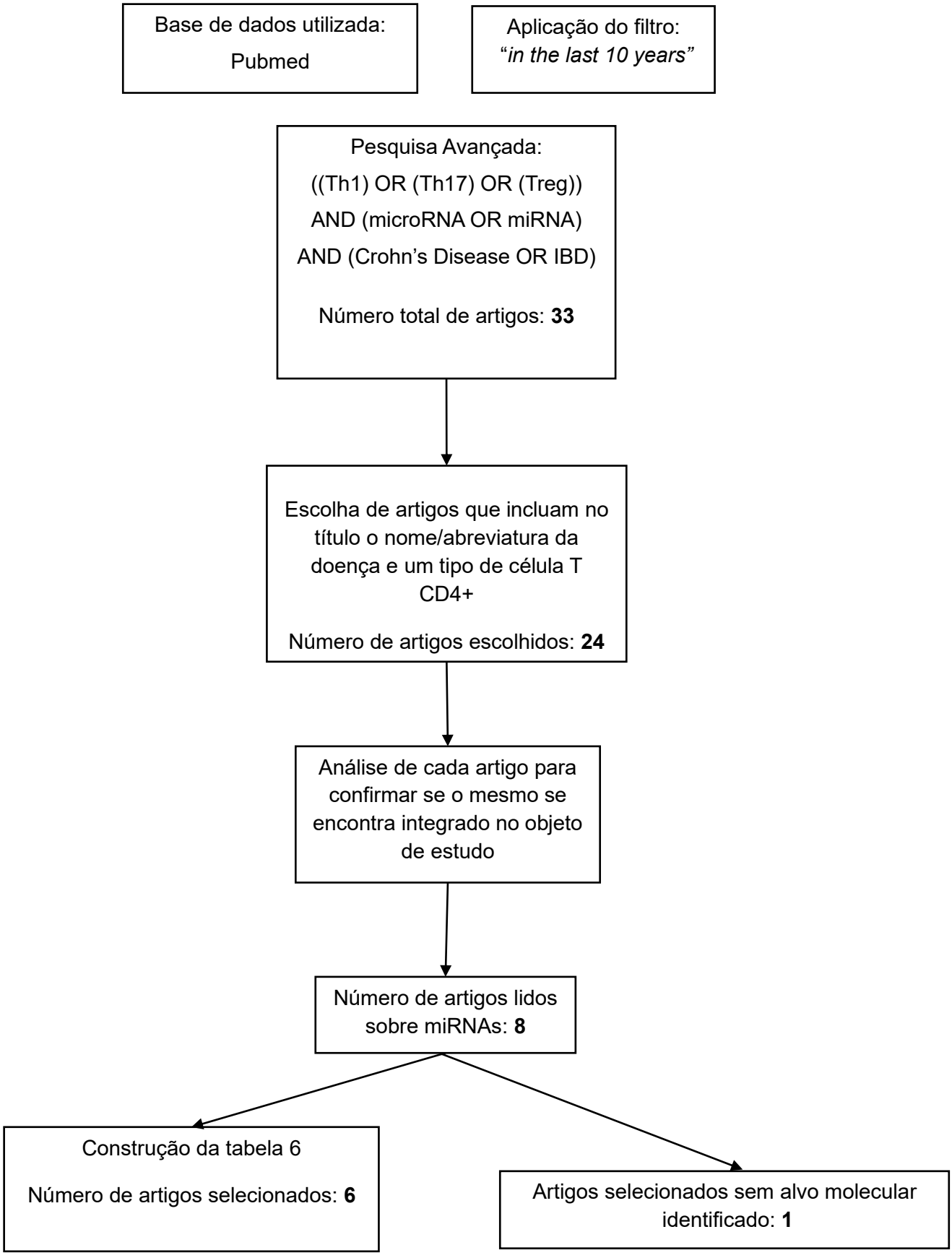
3.3 Seleção de fatores reguladores na AR



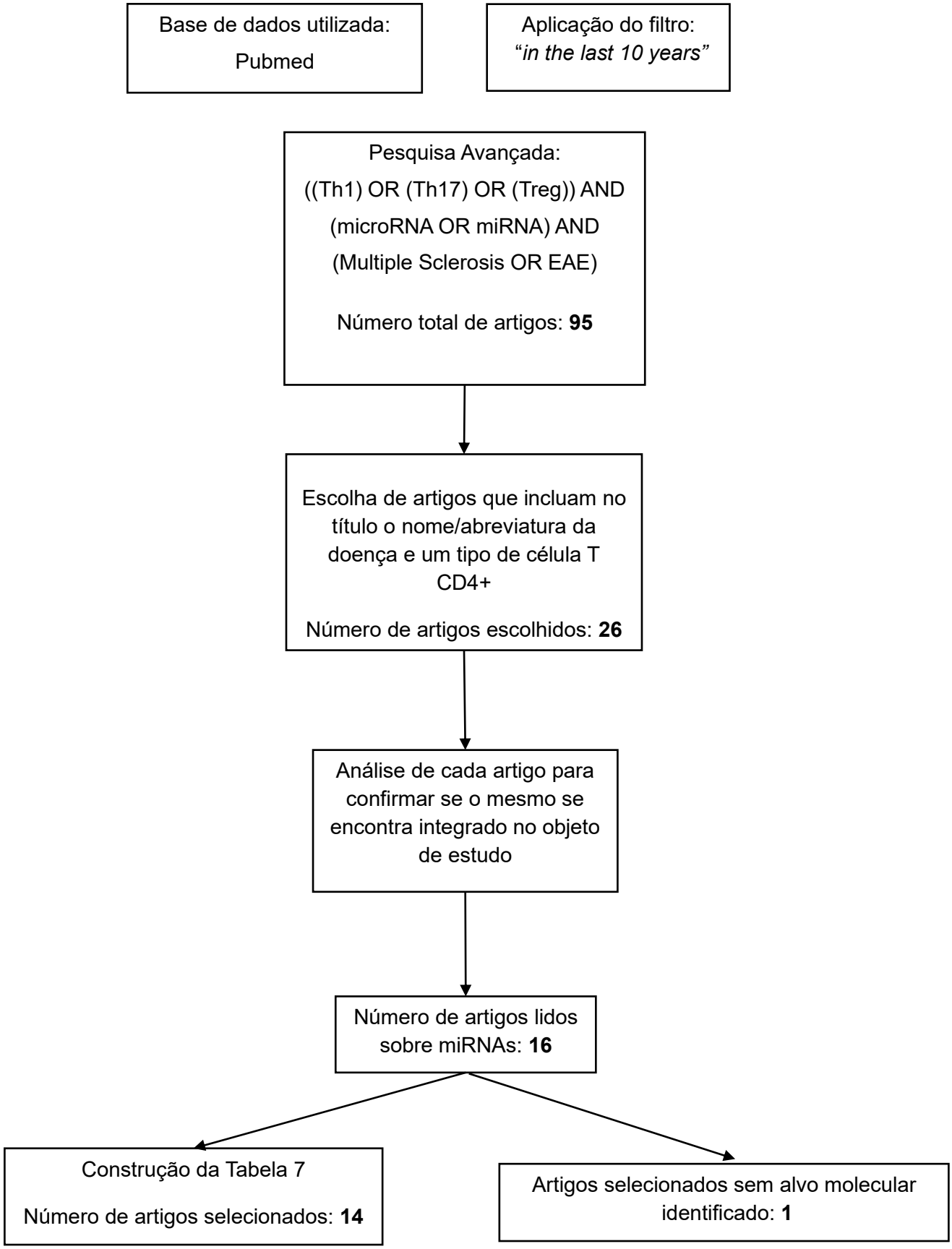
3.4 Seleção de fatores reguladores na Ps



3.5 Seleção de fatores reguladores na DCr



3.6 Seleção de fatores reguladores na EM



4. Resultados

4.1 Identificação de fatores de regulação envolvidos na diferenciação das células T CD4+

Existem vários níveis de regulação da diferenciação dos linfócitos T CD4+, dos quais se destacam, neste trabalho, a regulação transcricional mediada por fatores de transcrição, a regulação pós-transcricional, mediada por miRNAs, os fatores extracelulares, nomeadamente as citocinas, e ainda os respetivos recetores[71]. Destes reforça-se o papel regulatório recentemente atribuído aos miRNAs, um grupo de RNAs não codificantes com funções relevantes na função de linfócitos T CD4+ em condições basais e patogénicas[72].

A análise e compreensão destes mecanismos de regulação é extremamente importante uma vez que determina o balanço final entre populações de células T CD4+ efetoras como as Th1 e Th17 e reguladoras, como as Treg cujo equilíbrio é essencial para manter a homeostasia.

Como mencionado anteriormente, as citocinas são críticas para a diferenciação dos linfócitos T CD4+, em subpopulações efetoras versus reguladoras. As citocinas induzem vias de sinalização, mediadas por proteínas recetoras à superfície das células, e que incluem várias redes de fatores de transcrição que, por sua vez, regulam a expressão de genes codificantes e não codificantes, incluindo microRNAs, essenciais ao funcionamento de cada subpopulação. Para além dos recetores ativados pelas citocinas, existem outros recetores de superfície que possuem como função a ativação das células T CD4+ e o desencadeamento de vias de sinalização, envolvidas na produção de citocinas endógenas, ou no crescimento e proliferação celular. Os microRNAs, por sua vez, podem ligar-se, por complementaridade às regiões 3'UTR dos transcritos dos fatores reguladores anteriormente referidos regulando assim a sua expressão em vários contextos celulares, podendo alterar a sua diferenciação[73]. Esta constitui a base da pesquisa dentro de cada artigo referido nas tabelas.

Começou-se então por fazer uma análise detalhada e atualizada dos fatores proteícos incluindo citocinas, recetores de superfície e fatores de transcrição envolvidos na regulação da diferenciação das subpopulações de linfócitos T efetores Th1 e Th17 e re-guladores Treg, bem como dos miRNAs que regulam estes processos e correspondente identificação dos respetivos alvos moleculares. Seguidamente focou-se na análise dos miRNAs envolvidos na regulação da diferenciação de Th1,

Th17 e Treg em várias doenças autoimunes, nomeadamente o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), a Artrite Reumatoide (AR), a Psoríase (Ps), a doença de Crohn (DCr) e a Esclerose Múltipla (EM) com vista à identificação de reguladores específicos de cada doença, que possam ser usados como biomarcadores ou potenciais alvos terapêuticos. Finalmente, os miRNAs identificados nas várias doenças autoimunes, bem como os genes alvo foram analisados num modelo animal de esclerose múltipla estabelecido no laboratório de acolhimento.

Os artigos selecionados basearam-se em estudos feitos em modelos animais ou em amostras de humanos, tendo-se recorrido a diversas metodologias para a quantificação e estudo dos vários reguladores moleculares a partir das células CD4+ isoladas em diferentes tecidos. O RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) foi usado essencialmente para detetar e quantificar os níveis de miRNAs e mRNAs de recetores e fatores de transcrição, tendo a produção de citocinas sido analisadas essencialmente pela técnica de citometria de fluxo e por ELISA. Alternativamente as proteínas foram quantificadas recorrendo à técnica de western blot. Finalmente vários resultados descritos provêm da análise de técnicas de análise mais global de expressão de genes, as ditas abordagens "ómicas", incluindo-se neste conjunto as tecnologias de RNA-seq para analisar o transcriptoma, small-RNA-seq para analisar o miRNoma e ChiP-seq para identificar proteínas que se ligam a fatores de transcrição. No anexo, encontra-se uma descrição breve de cada técnica referida.

4.1.1 Fatores de transcrição, recetores e citocinas envolvidos na regulação da diferenciação

A tabela 1, elaborada a partir dos artigos selecionados através do fluxograma da secção 3.1, resume a informação recolhida relativa às citocinas, recetores e fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células efetoras Th1 e Th17 bem como Treg em humanos ou em modelos animais. É também incluído o seu efeito a nível molecular bem como o seu efeito global na diferenciação de células T CD4+.

Após a pesquisa, confirmou-se o papel do fator de transcrição T-bet, codificado pelo gene TBX21, na promoção da expressão de IFN-*γ* em células Th1, contribuindo assim para a sua diferenciação. A ativação deste fator encontra-se dependente da fosforilação do STAT1 que é induzida pelo próprio IFN-*γ* e por outras citocinas inflamatórias presentes no meio extracelular, como é o caso da IL-12 e da IL-33, sendo que a expressão dos respetivos recetores à superfície celular, encontra-se

aumentada no contexto da infeção[7]. A citocina IL-12, em particular possui um papel importante na ativação dos fatores Jak2 e Tyk2, através da sinalização intracelular que levam à fosforilação do fator STAT4 que, ao ser ativado, liga-se à região promotora do IFN-*γ*, ativando a sua expressão[8]. Os fatores Aml1 e Runx1 geram o mesmo efeito, ligando-se à região promotora de IL-2 e de IFN-*γ*. O mesmo estudo verifica que o Foxp3 reprime a expressão destes, promovendo assim diferenciação das células Treg[21].

Relativamente às células Th17, sabe-se que o fator de transcrição Batf é muito expresso neste tipo de células, estando diretamente relacionado com o aumento da expressão de IL-17A pois promove a expressão do fator de transcrição RORγt que se liga à zona promotora do gene que codifica essa citocina[11]. Outro fator consiste no fator Blimp-1, codificado pelo gene PRDM1, que possui como função reprimir a produção de citocinas associadas à população Th17, através da sua ligação ao gene que codifica a IL-17A, inibindo assim a sua difenciação[74].

Relativamente às células Treg, sabe-se que o recetor Ctla4 é essencial para a sua função supressora de respostas imunitárias, e que o mesmo promove a expressão do fator Foxp3, necessário para a sua diferenciação[75]. O mesmo ocorre, através do fator Foxo1 que se liga à sua região promotora. Por outro lado, o fator Akt constitui um regulador central da função das células Treg, ao inibir a expressão de Foxp3, através da via de sinalização MAPK/mTOR[76].

Tabela 1- **Citocinas, receptores e fatores de transcrição envolvidos na expressão génica das células Th1, Th17 e Treg**

Tipo de Célula	Fator de regulação	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th1	TBX21 (TF*)	Promoção da expressão de IFN-*γ*	Murina (Baço e Nódulos Linfáticos)	Promovida	7
	STAT1 (TF*)	Promoção da expressão de T-bet e de IL-12R*β*1			
	IL12R*β*1 (R*)	Promoção da expressão de Jak2, Tyk2	Murina (Nódulos Linfáticos)		8
	AML1 (TF*)	Promoção da expressão de IL-2 e de IFN-*γ*	Humana (Sangue Periférico)		21
	RUNX1 (TF*)				
	BATF (TF*)	Promoção da expressão de RORγt e IL-17A	Murina	Promovida	11

Th17	Blimp-1 (TF*)	Inibição da expressão de IL-17A	(Baço e Nódulos Linfáticos)	Inibida	74
Treg	CTLA4 (R*)	Promoção da expressão de Foxp3	Murina (Baço e Nódulos Linfáticos)	Promovida	75
	FOXO1 (TF*)				76
	AKT (TF*)	Inibição da expressão de Foxp3		Inibida	

*TF-Fator de Transcrição; R-Recetor;

4.1.2 miRNAs envolvidos na regulação da diferenciação das células T CD4+

A partir da pesquisa indicada no fluxograma da secção 3.1., construiu-se a Tabela 2 que resume a informação sobre os miRNAs responsáveis pela inibição ou promoção da diferenciação de células Th1, Th17 e Treg, identificando-se o respetivo alvo molecular, e a consequência a nível celular. Como referido anteriormente, os miRNAs são reguladores negativos da expressão genética[77]. No caso dos linfócitos T $CD4^+$, os miRNAs podem ligar-se a fatores reguladores da sua diferenciação (identificados na tabela 1 e descritos na introdução), modulando este processo, quer através de alterações a nível da proliferação destas células ou da diferenciação propriamente dita. O perfil de expressão de cada miRNA poderá condicionar o surgimento de doenças autoimunes, conforme referido na secção seguinte[78].

Relativamente às células Th1, como foi referido anteriormente, o miR-125a-3p/5p inibe a produção de IFN-*γ*, dado que o seu alvo molecular consiste no fator de transcrição STAT3, indutor da expressão de citocinas inflamatórias[59]. Sabe-se também que o miR-29-3p inibe a produção de IFN-*γ*, pela sua ligação a diferentes fatores que regulam esta citocina[57]. Através da pesquisa confirmou-se que este se liga diretamente à região 3' UTR do mRNA codificado pelo gene IFNG[79]. A diferenciação das células Th1 é também inibida pelo miR-146a-3p, devido à sua ligação ao gene que codifica o fator PRKCε, responsável pela fosforilação do STAT4, promotor da produção de IFN-*γ* por este tipo de células. Estes resultados corroboram efeitos anteriormente verificados na inibição da diferenciação de células Th1 por parte do miR-146a, mediados por outras vias intracelulares, nomeadamente através dos alvos de mRNA Traf6 e Irak1, que o identificam como um potente "travão" da autoimunidade[80]. Sabe-se também que a produção citocinas, características da população Th1, incluindo a IL-2 e o IFN-*γ* é promovida pelo miR-9-5p através da inibição do gene PRDM1, que codifica o fator Blimp-1[81]. Tal como referido na secção

anterior este fator também inibe a expressão de IL-17, atuando, de modo geral, na inibição de citocinas pro-inflamatórias[74]. Verificou-se que o miR-148 possui vários genes alvo, entre os quais o fator de transcrição Bim que é pro-apoptótico. Desta forma é promovida a sobrevivência das células Th1 e consequentemente a sua diferenciação[82].

Quanto às células Th17, sabe-se que o mir-323-3p tem como alvo molecular genes envolvidos na via de sinalização desencadeada pelo TGF-*β*. Entre estes, destacam-se os que codificam as proteínas Smad (2 e 5) que são transdutores de sinal cruciais para a proliferação das células Th17, por promoverem a expressão da produção de IL-17 e a IL-22. Assim, o miR-323-3p atua como regulador negativo da diferenciação das células Th17. Outro alvo molecular deste miRNA corresponde ao gene CDKN1B que codifica a proteína p27 que inibe a proliferação celular, ao interromper a progressão do ciclo celular na fase G1. Esta consiste numa proteína inibidora da cinase dependente de ciclina, ou Cdk. Como tal, a inibição desta proteína irá promover a proliferação celular, potenciando a diferenciação das células Th17[83]. Identificou-se também o mir-155-3p/5p que promove a diferenciação das células Th17, induzindo a expressão de IL-17. Tal deve-se ao facto do miR-155 ligar-se à região 3'UTR do gene que codifica a proteína Socs1, inibidora da expressão de citocinas inflamatórias através da regulação negativa da via de sinalização de JAK/STAT[84].

Quanto às células Treg, a pesquisa revelou que o miR-126-3p/5p promove a proliferação das mesmas. Este miRNA liga-se à subunidade p85b do fator Pi3k, cuja via encontra-se envolvida no crescimento e sobrevivência celular. A inibição da p85b resulta também na promoção da produção de IL-10 e do recetor Ctla-4, que constituem fatores ativadores da diferenciação das células Treg[85].

Tabela 2- **miRNAs envolvidos na expressão génica das células Th1, Th17 e Treg.**

Tipo de Célula	Fator de Regulação	Molécula Alvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th1	miR-125a-3p/5p	STAT3 (TF)	Inibição da síntese de IFN-*γ*	Humana (Sangue Periférico)	Inibida	59
	miR-29-3p	IFNG (C*)	Inibição da síntese de IFN-*γ* e supressão da resposta à infeção por agentes patogénicos intracelulares	Murina (Baço)		57, 79
	miR-146a-3p	PRKCε (K*)	Inibição da ativação de STAT4	Humana		80

	miR-9-3p/5p	PRDM1 (TF)	Promoção da expressão de IL-2 e de IFN-*γ*	(Sangue Periférico)	Promovida	81
	miR-148a-3p/5p	BIM (TF*)	Promoção da proliferação celular	Murina (Baço)		82
Th17	miR-323-3p	SMAD 2/5 (TF*)	Inibição da expressão de IL-22 e de IL-17	Humana (Sangue Periférico)	Inibida	83
		CDKN1B (TF*)	Promoção da diferenciação das células Th17		Promovida	
	miR-155-3p/5p	SOCS1 (TF*)	Promoção da expressão de RORγt e da expressão de IL-17	Murina (Baço)		84
Treg	miR-126-3p/5p	P85B (TF*)	Promoção da expressão de IL-10 e da expressão do recetor CTLA-4	Murina (Baço)	Promovida	85

*TF-Fator de Transcrição; R-Recetor; C-Citocina; K-Cinase;

4.2. Caracterização dos fatores que regulam a diferenciação das células T CD4+ na autoimunidade

Como referido anteriormente, as células T CD4$^+$ estão envolvidas na patogénese de doenças autoimunes, existindo diferentes fatores reguladores que modulam a sua diferenciação. A diferenciação das células CD4+ em Th1 ou Th17 com a correspondente produção das citocinas inflamatórias IFN-*γ* e IL-17, respetivamente, está fortemente associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crónicas e autoimunes. Esta função é, contudo, contrariada pelas células T reguladoras, com função supressora anti-inflamatória, bloqueadora da ação das células efetoras Th1 e Th17. Tal é demonstrado através das manifestações severas de autoimunidade em doentes e modelos animais com níveis deficientes de células Treg[86].

Assim, a autoimunidade caracteriza-se, pela desregulação do balanço entre a capacidade das células CD4$^+$ produzirem citocinas inflamatórias pelas células efetoras e a sua atividade de supressão da resposta imunitária, característica de células T reguladoras. Deste modo, a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do balanço entre as subpopulações de células Teff e Treg pode contribuir para a translação do conhecimento para a terapêutica das doenças autoimunes[87].

Sabe-se que, apesar de possuírem funções opostas, a diferenciação das células Th17 e Treg a partir das células T CD4+ *naive*, requer um fator comum, o TGF-

β. Como tal, a identificação dos mecanismos moleculares, que afetam a diferenciação celular, e o equilíbrio entre a quantidade de células das três populações é fundamental para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à autoimunidade[88]. Estando os miRNAs fortemente associados à diferenciação destes tipos de células, foi feita, de seguida uma análise exaustiva dos miRNAs que regulam a diferenciação destas células em várias doenças autoimunes.

A partir da informação obtida nos artigos selecionados de acordo com os critérios dos fluxogramas das secções 3.2 a 3.6, foram construídas tabelas que resumem a informação obtida sobre a regulação, mediada por miRNAs, da diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ no contexto da autoimunidade, nomeadamente nas doenças autoimunes LES, AR, Ps, DCr e EM, de seguida apresentadas.

4.2.1. Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)

As manifestações clínicas no LES devem-se a uma desregulação entre as respostas inflamatórias promovidas por células e efetoras e a manutenção da tolerância pelas células T reguladoras que resultam em lesões de tecido saudável sobretudo a nível da pele, articulações e órgãos internos, como o coração e os pulmões. Ao longo dos anos, vários estudos têm demonstrado uma associação entre a diminuição da diferenciação das células Treg e o aumento da doença[89]. Contudo, o aumento da diferenciação das células Th17 também está fortemente associado à patogénese da doença, como indicado anteriormente[30]. Um estudo verifica que o tratamento com corticosteroides aumenta a proporção de células Treg em relação às células Th17 em pacientes, contribuindo assim para um alívio dos sintomas[90]. Assim, o balanço entre as células Th17 e Treg é relevante para a resolução do LES. Sabendo que os miRNAs regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação destes dois tipos de células, fez-se uma pesquisa sobre os miRNAs que regulam a diferenciação das células Teff e Treg no contexto do LES. Para os termos de pesquisa empregues na secção 3.2, verificou-se que o perfil de expressão de miRNAs encontra-se apenas alterado nas populações Th17 e Treg, havendo um maior número de miRNAs com expressão alterada em células Th17. Confirma-se assim a prevalência desta diferenciação no LES. A Tabela 3 resume a informação obtida, através da pesquisa feita de acordo com o fluxograma da secção referida. Nesta estão incluídos os miRNAs cuja expressão está desregulada no LES, bem como os mRNAs alvos, o

efeito molecular, a origem da amostra e a contribuição para a diferenciação de cada subtipo de célula T $CD4^+$.

Nas células Th17 de ratinhos sujeitos a LES, verifica-se o aumento da expressão do miR-451a-3p/5p, sendo que este possui como alvo molecular o fator IRF8, envolvido na regulação da produção de interferões. Apesar de não ter sido demonstrada a relação com a produção de citocinas efetoras, foi observado um aumento da expressão das citocinas IL-17A e IL-4, existindo assim um aumento da diferenciação de células Th17[91]. A expressão do miR-873-3p/5p também se encontra aumentada em pacientes com LES. Sendo o Foxo1, um alvo molecular deste miRNA que atua como regulador negativo da produção de IL-17. Assim, a diminuição de Foxo1 nestes pacientes, está diretamente associada a um aumento da expressão do IL-17 e, consequentemente da diferenciação das células Th17[92]. Nestes pacientes, verifica-se ainda a diminuição do miR-101-3p que possui como alvo o mRNA que codifica a enzima HDAC9 que catalisa a desacetilação de diversos fatores de transcrição, resultando num aumento da expressão de IL-17A[93]. Verifica-se também a diminuição do Let-7f-3p/5p que possui como alvo o gene que codifica a IL-6. Esta promove a expressão dos fatores STAT3 e RORγt, que constituem assinaturas moleculares das células Th17, que promovem a expressão de IL-17 por parte das mesmas[94]. O aumento do miR-322-5p observado em pacientes com LES está relacionado com a promoção da via desencadeada pelo recetor de TGF-*β*, essencial para a diferenciação das células Th17. Entre os diferentes alvos propostos para este miRNA, destacam-se as proteínas Smad3 que inibem a ação do fator STAT3, regulador positivo da expressão de IL-17[95].

As células Treg, responsáveis pela manutenção da homeostasia estão comprometidas em pacientes com LES. Vários miRNAs contribuem para a inibição da sua produção através da regulação de alvos moleculares diretamente envolvidos na sua diferenciação. Assim, os miRNAs miR-34a-3p/5p e miR-148a-3p/5p possuem a sua expressão aumentada em pacientes com LES, verificando-se, no caso do miR-34a-3p/5p uma ligação direta à região 3'UTR do mRNA do Foxp3, com consequente diminuição da diferenciação de Tregs, diretamente associada à progressão da doença, evidenciada pelo aumento da inflamação das articulações, nomeadamente nos membros superiores e inferiores[96]. O miR-148a-3p/5p possui como alvo o transcrito que codifica a enzima DNMT1, que consiste numa DNA metiltransferase que promove a inibição da expressão de genes, entre os quais, se destacam os fatores de

transcrição envolvidos na via de sinalização MAPK/mTOR que promove a repressão da expressão de Foxp3[97].

Tabela 3- **miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ no LES.**

Tipo de Célula	Fator de Regulação	Molécula Alvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th17	↑miR-451a-3p/5p	↓IRF8 (R*)	↑Expressão de IL-17A	Murina (Baço)	Promovida	91
	↓miR-101-3p	↑HDAC9 (D*)		Humana (Sangue Periférico)		92
	↑miR-873-3p/5p	↓FOXO1 (TF*)				93
	↓Let-7f-3p/5p	↑IL6 (C*)	↑Expressão de STAT3			94
	↑miR-322-5p	↓SMAD3 (TF*)				95
Treg	↑miR-34a-3p/5p	↓FOXP3 (TF*)	↓Diferenciação de células Treg	Murina e Humana (Sangue Periférico)	Inibida	96
	↑miR-148-3p/5p	↓DNMT1 (M*)	↑Promoção da Via MAPK/mTOR			97

*TF-Fator de Transcrição; R-Recetor; C-Citocina; D- Desacetilase; M-Metilase;
Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso;

4.2.2 Artrite Reumatoide (AR)

A AR é uma doença autoimune crónica caracterizada pela destruição do tecido articular, por reações inflamatórias do sistema imunitário, desempenhando as células T CD4+ um papel crucial no seu desenvolvimento[88]. Torna-se necessário desenvolver novas abordagens moleculares que permitam determinar, de forma mais precisa, o perfil de expressão de moléculas desreguladas em AR em diferentes fluídos biológicos e, mais especificamente, em diferentes tipos de células T presentes nesses fluídos, de forma a gerar uma melhor compreensão da regulação da diferenciação destas, cuja produção de citocinas está diretamente ligada à progressão da doença[98].

Através da análise do sangue periférico verificou-se que o aumento das células Th17 é uma das principais características associadas à patogénese desta doença, sendo a citocina IL-17 a principal citocina pro-inflamatória produzida nesta doença. A tabela 4 resume a informação obtida relativamente aos miRNAs que se encontram desregulados em pacientes com AR, sendo diretamente responsáveis pelo aumento

da produção de células T17. Também são apresentados alguns miRNAs, cujos níveis alterados vão inibir a diferenciação de células Treg, resultando contribuindo para a promoção da doença. Relativamente às células Th1, como verificado anteriormente no LES, a pesquisa não revelou artigos que relacionassem o perfil de expressão de miRNAs com essa população celular no contexto da doença (secção 3.3), apesar de se observarem artigos que reportam o aumento da produção de citocinas características, como o IFN-*γ* e a IL-2[39].

O aumento da expressão dos níveis de miR-301a-3p observado em pacientes com AR está diretamente relacionado com o aumento da proliferação das células Th17, uma vez que este miRNA tem como alvo molecular o gene PIAS3 que codifica um fator de transcrição inibidor do STAT3, que regula a produção de IL-17, na sua forma ativa[99]. Destacam-se ainda os níveis aumentados do miR-128-3p que tem como alvo molecular o gene que codifica o fator Tnfaip3, cuja função consiste na inibição da proliferação celular. A repressão da expressão deste fator de transcrição pela ação do miRNA-128-3p promove a via de sinalização dependente de NF-κB, que induz a produção de IL-17A[100]. Por outro lado, os níveis diminuidos do miR-498-3p/5p observados nas células de sangue periférico de pacientes com AR, que se liga à região 3'UTR do STAT3, vão resultar num nível aumentado da expressão deste gene, provocando o aumento da expressão de IL-17A[101].

Quanto às células Treg, verifica-se que níveis aumentados do miR-17-3p/5p em exosomas isolados do sangue periférico de pacientes com AR são responsáveis pela inibição do recetor de TGF-*β*, codificado pelo gene TGFBRII, que impede a diferenciação as células Treg[102]. Sabe-se ainda que o miR-34a, referido anteriormente na secção relativa ao LES, possui também a sua expressão aumentada em pacientes com AR. O mesmo estudo evidencia a ligação direta à região 3'UTR do mRNA do Foxp3 que constitui uma assinatura molecular deste tipo celular, verificando-se uma associação com a progressão da doença[96].

Tabela 4- **miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na AR.**

Tipo de Célula	Fator de Regulação	Molécula Alvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
	↑miR-301a-3p	↓PIAS3 (TF*)	↑Expressão de RORγt e STAT3			99

Th17	↑miR-128-3p	↓TNFAIP3 (TF*)	↑Promoção da via dependente de NF-κB	Humana (Sangue Periférico)	Promovida	100
	↓miR-498-3p/5p	↑STAT3 (TF*)	↑Produção de IL-17A			101
Treg	↑miR-17-3p/5p	↓TGFBRII (R*)	↓Diferenciação de células Treg	Humana (Sangue Periférico)	Inibida	102
	↑miR-34a-3p/5p	↓FOXP3 (TF*)		Murina e Humana (Sangue Periférico)		96

*TF- Fator de Transcrição; R-Recetor;

Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso

4.2. Psoríase (Ps)

A psoríase é uma doença crónica da pele que se caracteriza por lesões avermelhadas com placas escamosas, possuindo diferentes etiologias. Ocorrem alterações no sistema imunitário que estão diretamente relacionadas com a sua patogénese. Em vários artigos, é salientado o papel das citocinas pro-inflamatórias e a sua importância na progressão da doença[103]

Durante a pesquisa verificou-se que a maior parte dos estudos existentes em psoríase baseiam-se na análise de células que não correspondem ao objeto de estudo, nomeadamente os queratinócitos e as células dendriticas. Segundo uma revisão por Ni, X., & Lai, Y a causa da psoríase centra-se na desregulação destas duas populações[104]. Os queratinócitos constituem as principais células da epiderme. Estes iniciam reações inflamatórias, essencialmente através das citocinas IL-36 e IL-37 que modulam a ação das células dendriticas. Estas, por sua vez, produzem citocinas que desencadeiam a resposta inflamatória mediada por células Th1 e Th17, através da IL-12 e IL-23, respetivamente. Ambas as populações de células sustentam a formação de placas psoriáticas e encontram-se em maior quantidade em biópsias de pele com lesões características da doença, comparativamente com biópsias de pele saudável[104].Analisou-se a relevância do perfil de expressão de miRNAs em células Th1 e Th17, uma vez que foi observado um aumento da proliferação destas populações na psoríase, sendo diretamente responsáveis pelo desencadeamento das respostas inflamatórias que sustentam as lesões observadas nesta doença. A tabela 5 resume a informação obtida dos artigos selecionados.

Nas células Th1 de pacientes com psoríase encontra-se diminuída a expressão do miR-138-5p que possui como alvo o gene que codifica o fator de transcrição Runx3 que promove a produção de IFN-γ. Assim, a diminuição deste miRNA induz um aumento da expressão do Runx3 e consequentemente do IFN-γ diretamente relacionados com um aumento da suscetibilidade à doença[105]. O Let-7a-5p consiste noutro miRNA, cuja expressão se encontra aumentada, sendo que o seu alvo corresponde ao gene que codifica o STAT3 que promove a expressão de citocinas inflamatórias, como é o caso do IFN-γ que corresponde a uma assinatura molecular da população Th1[106].

Destaca-se ainda o miR-210-3p/5p, cuja expressão se encontra aumentada no sangue de pacientes com psoríase promovendo a formação de lesões na pele características da doença pois possui como alvo os genes que codificam os fatores STAT6 e o LYN que inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estando assim os níveis de IFN-γ e IL-17A aumentados nestes pacientes e promovendo, desta forma, a diferenciação das células Th1 e Th17, respetivamente[107]. A diminuição dos níveis de expressão do miR-340-3p/5p também se encontra associada à severidade da doença, tendo-se identificado o gene IL17A como seu alvo molecular, o que resulta num aumento da diferenciação das células Th17 fortemente associado à inflamação característica desta doença[108].

Tabela 5- **miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na Ps.**

Tipo de Célula	Fator de Regulação	Molécula Alvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th1	↓miR-138-5p	↑RUNX3 (TF*)	↑Produção de IFN-γ	Humana (Sangue Periférico)	Promovida	105
	↑Let-7a-5p	↓STAT3 (TF*)				106
	↑miR-210-3p/5p	↓STAT6 (TF*)				107
Th17	↑miR-210-3p/5p	↓LYN (K*)	↑Produção de IL-17A	Humana (Sangue Periférico)	Promovida	107
	↓miR-340-3p/5p	↑IL17A (C*)		Murina (Baço e Nódulos Linfáticos)		108

*TF-Fator de Transcrição; C-Citocina; K-Cinase;

Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso;

4.2.4. Doença de Crohn (DCr)

A doença de Crohn, é uma doença intestinal que se caracteriza por uma inflamação crónica destrutiva do tecido entérico que pode afetar qualquer segmento do trato intestinal. Investigações feitas para determinar a sua etiologia identificam causas genéticas, ambientais e microbianas como estando subjacentes à sua patogénese. É uma doença também fortemente associada ao sistema imunitário adquirido, nomeadamente as células que o constituem que interagem entre si, desencadeando respostas inflamatórias que promovem a progressão da doença[109]. Uma revisão feita por Geremia, A *et al* em 2014 salienta a ação das células T CD4+ que promovem a produção de citocinas pro-inflamatórias, nomeadamente o IFN-*γ* e a IL-17, invariavelmente aumentadas em pacientes com Doença de Crohn[110]. Quanto às células Treg, sabe-se que estas possuem um papel crucial na manutenção da homeostasia da mucosa intestinal, suprimindo respostas imunitárias que destroem microrganismos comensais e impedindo a ativação de células T efetoras[110], como referido na seção 1.3 da introdução.

Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares, nomeadamente ao nível da regulação pós-transcricional, envolvidos na diferenciação destes três tipos de células no contexto da doença de Chron pode permitir identificar não só potenciais biomarcadores como alvos terapêuticos para este tipo de doença.

Vários estudos identificaram um conjunto de miRNAs cuja expressão se encontra alteraa em amostras biológicas de pacientes com doença de Chron, nomeadamente no sangue periférico e em biopsias de tecido entérico. A tabela 6 resume a informação obtida.

Nestes pacientes observaram-se níveis diminuídos de miR-219a-5p nas células Th1 da mucosa intestinal inflamada e do sangue periférico. O seu alvo molecular é o o gene que codifica o fator Etv5, um fator de transcrição que promove a expressão do fator STAT4, que, por sua vez, se liga à região promotora do gene que condifica o IFN-*γ*[111]. Deste modo, os níveis diminuídos de miR-219-5p correlacionaram-se com um aumento da produção de IFN-*γ* e consequente diferenciação das Th1, que contribuem para a progressão da doença, evidenciada pelas lesões observadas no tecido entérico.

Nas células Th1 e Th17 dos pacientes com doença de Crohn verificam-se níveis aumentados da expressão do miR-125a-3p/5p que reprime a expressão do fator Ets1, uma variante do Etv5, que promove a expressão de RORγt e STAT3, sendo que este

último induz a produção de citocinas inflamatórias, como é o caso do IFN-γ e da IL-17A[112]. Outro miRNA cuja expressão se encontra desregulada nesta patologia é o miR-425-3p/5p que possui como alvo molecular o fator de transcrição Foxo1 que, por sua vez, reprime a ação do fator ROR-γt, envolvido na produção da citocina IL-17A. Desta forma os níveis desta citocina encontram-se aumentados nestes pacientes, contribuindo assim para a diferenciação das células Th17, tipicamente presente em grandes quantidades no soro e tecido intestinal destes pacientes[113]. Destaca-se ainda uma diminuição da desacetilase Hdac4, devido ao aumento dos níveis do miR-22-3p/5p em pacientes com a doença de Crohn. Esta enzima desacetilase, ao promover a desacetilação das histonas, promove o silenciamenteo de genes envolvidos na diferenciação das células Th17, nomeadamente o IL-17A, IL-6 e TNF-α[114]. Desta forma a diminuição da sua atividade irá promover a diferenciação das células Th17.

Verifica-se ainda uma associação entre a diminuição da quantidade de células Treg, em biopsias de tecido entérico de doentes, com o aumento da expressão do miR-106a-3p/5p que se liga à região 3'UTR do mRNA que codifica a citocina IL-10, característica das células Treg, observando-se a diminuição da produção da mesma[115].

Tabela 6- **miRNAs moduladores da diferenciação das células T CD4+ na DCr.**

Tipo de Célula	Fator de regulação	Molecula álvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th1	↓miR-219a-5p	↑ETV5 (TF*)	↑Expressão de STAT4 ↑Expressão de IFN-γ	Humana (Biopsia de Tecido Entérico)	Promovida	111
	↓miR-125a-3p/5p	↑ETS1 (TF*)	↑Expressão de IFN-γ	Humana (Sangue Periférico e Biopsia de Tecido Entérico		112
Th17	↓miR-125a-3p/5p	↑ETS1 (TF*)	↑Expressão de RORγt ↑Produção de IL-17A	Humana (Sangue Periférico e Biopsia de Tecido Entérico)	Promovida	112
	↑miR-425-3p/5p	↓FOXO1 (TF*)	↑Expressão de IL-17A			113
	↑miR-22-3p/5p	↓HDAC4 (D*)	↑Produção de IL-17A, IL-6 e TNF-α			114
Treg	↑miR-106a-3p/5p	↓IL10 (C*)	↓Diferenciação de células Treg	Humana (Biopsia de Tecido Entérico)	Inibida	115

*TF-Fator de Transcrição; C-Citocina; D-Desacetilase;
Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso

4.2.5. Esclerose Múltipla (EM)

A esclerose múltipla é uma doença autoimune com origem multifatorial que afeta o sistema nervoso central, provocando lesões cerebrais e medulares. Segundo uma revisão feita por Reich, D. S. *et al* em 2018, vários estudos demonstram a existência de um perfil de expressão desregulado nas células do sistema imunitário isoladas de amostras de sangue periférico e do líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM[116]. Observam-se níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, que comprometem a viabilidade do tecido nervoso subjacente[116]. O aumento do dos níveis de IFN-*γ* e do TNF-α, por um lado, está diretamente associado a níveis aumentados de células Th1. Por outro lado, o aumento da expressão das citocinas IL-17A, IL-21 e IL-22 relaciona-se com um aumento da diferenciação das células Th17. Quanto às células Treg, sabe-se que estas possuem um papel regulatório fundamental para a mantenção da homeostasia do sistema imunitário e bloquear a resposta inflamatória promovida pelas células Th1 e Th17. A perda da função destas células constitui um fator determinante na patogénese da doença. Estudos realizados no modelo animal de esclerose múltipla, designado por encefalite autoimune experimental (EAE) demostram que, num estágio avançado, a ação supressora das células Treg diminui significativamente, tornando-se menos eficaz a inibição da ação de células T efetoras (Th1 e Th17)[117].

O modelo de EAE é frequentemente usado para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que limitem a progressão da EM ou que conduzam a tratamentos eficazes em humanos. A indução da doença é feita por meio da administração de antigénios, reconhecidos pelas células T CD4+, que conduzem ao desenvolvimento das principais características patológicas da esclerose múltipla que são monitorizadas, ao longo do tempo. Nestes animais observa-se a ação inflamatória das células do sistema imunitário, a desmielinização dos neurónios e a perda do

transporte axonal que se traduzem em vários sintomas clínicos avaliados sob a forma de "*clinical score*"[118].

Comparativamente com as restantes doenças, verificou-se uma grande quantidade de estudos relacionados com a relevância dos miRNAs na regulação da diferenciação das células T efetoras e reguladoras em EM. Estes estudos foram feitos em células isoladas de sangue periférico e de fluído cefalorraquidiano quer do modelo animal EAE quer de pacientes que se encontram num estágio avançado da doença. A desregulação dos níveis destes miRNAs contribui para um aumento da diferenciação das células efetoras Th1 e Th17 e para uma diminuição das células Treg, contribuindo assim para a patogénese da doença. A tabela 7 resume a informação obtida.

Nas células mononucleares do sangue periférico de doentes com EM verifica-se uma diminuição da expressão do miR-140-5p que possui como alvo molecular o STAT1 que induz a expressão do fator de transcrição T-bet, e consequentemente do IFN-*γ*. Assim, os níveis diminuídos deste miRNA estão diretamente relacionados com níveis aumentados de células Th1 encefalitogénicas promotoras da doença nestes pacientes[119]. A observação de níveis aumentados do miR-92a-3p/5p está também relacionada com a proliferação desta população de células, através da promoção da via de sinalização MAPK/mTOR. Os seus alvos moleculares consistem em dois fatores reguladores. O primeiro corresponde ao Tsc1 que consiste numa proteína co-chaperone que forma um complexo com outras proteínas funcionalmente semelhantes que inibem o fator Rheb, responsável pela ativação do mTORC1 um complexo proteíco central na via de sinalização referida. O segundo corresponde ao gene DUSP10 que codifica uma fosfatase que inativa proteínas envolvidas na proliferação celular, entre as quais as cinases p38 e Juk[120].

Relativamente às células Th17, observou-se uma expressão diminuída do miR-30a-3p/5p em ratinhos sujeitos a EAE comparado com os controlos saudáveis. Este miRNA possui como alvo molecular o recetor da citocina inflamatória IL-21, promovedora da desmielinização neste modelo animal. A via de sinalização desencadeada por este recetor promove a ativação do fator STAT3 que induz a expressão de IL-17A[121]. Outro miRNA cuja expressão se encontra diminuída consiste no miR-15b-3p/5p. Este possui como alvo o fator OGT que corresponde a um gene que codifica para uma glicosiltransferase que ativa o fator NF-*k*B, através da formação de ligações *β*-glicosídicas. Este fator de transcrição correlaciona-se com o aumento da expressão de STAT3, promovedor da expressão das citocinas IL-17A e IFN-*γ*. A diminuição deste miRNA, promove assim a proliferação de células T efetoras, sendo

que a população Th17 apresenta um aumento significativo[122]. Verifica-se ainda a diminuição da expressão do miR-590-3p/5p que inibe a expressão do fator Tob1, um regulador do ciclo celular que suprime a proliferação das células Th17. Uma das formas consiste na ativação do complexo formado pelas proteínas Smad4 e 3 que inibem o STAT3, indutor da expressão de IL-17A[123]. Outro estudo revela o aumento da expressão do miR-448-3p/5p que inibe a expressão do gene PTPN2 que codifica uma fosfase que inativa fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização MAPK/mTOR, dos quais o gene JUK, referido anteriormente. Assim se explica porque é que em células de doentes com MS ocorre um aumento da produção de IL-17 e consequentemente uma expansão de células Th17[124]. Outro estudo feito em pacientes com EM, demonstrou diferentes perfis de expressão para o miR-214-3p/5p e o miR-27a-3p/5p. Os níveis de miR-214-3p/5p encontram-se diminuídos em pacientes com MS, possuindo como alvo molecular o gene que codifica o fator Akt1, essencial para a via de sinalização dependente de MAPK que promove a proliferação celular. O miR-27a-3p/5p, cuja expressão se encontra aumentada, possui como alvo o gene que codifica a proteína Smad3 que inibe a transcrição do fator STAT3, que se encontra envolvido na produção de IL-17A[125]. Outro microRNA consiste no miR-20b, cuja expressão se encontra diminuída. Este reprime a expressão dos genes STAT3 e RORC que promovem a transcrição do gene que codifica a IL-17A[126]. O miR-21, cuja expressão se encontra aumentada, possui como alvo o gene TGFB1 que codifica o fator TGF-*β*, cuja via de sinalização associada promove a produção de IL-17A[127]. Verifica-se, em análises de sangue periférico de pacientes com EM e a partir do modelo EAE, o aumento da expressão do miR-22 que reprime a expressão do gene PTEN, observando-se também a diminuição da produção de IL-2, associada a um aumento da diferenciação das células Th17[128].

Relativamente às células Treg, encontra-se também aumentada a expressão do mir-182-3p/5p que reprime a expressão de Foxo1, um fator que induz a expressão de Foxp3[129]. O mesmo acontece com o Let-7e-3p/5p que reprime a expressão do gene que codifica a IL-10, característica das células Treg, cuja via de sinalização associada induz a expressão de Foxp3[130]. Destaca-se ainda o aumento da expressão do miR-142-3p/5p que reprime a expressão do recetor de TGF-*β*, necessário para a diferenciação das células Treg, nomeadamente pelo seu papel na manutenção da expressão de Foxp3[131]. Por fim, verifica-se o aumento da expressão do miR-223-3p/5p que inibe a expressão do Foxo1/3 e do recetor Ctla-4, sendo que ambos também

contribuem para a manutenção da expressão de Foxp3 e consequentemente a diferenciação das células Treg[132].

Tabela 7- **Regulação genética das células T CD4+ na EAE e EM.**

Tipo de Célula	Fator de Regulação	Molécula Alvo	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
Th1	↓miR-140-5p	↑STAT1 (TF*)	↑Expressão de T-bet	EAE (Murino) EM (Humano)	Promovida	119
	↑miR-92a-3p/5p	↓TSC1 (Ch*) ↓DUSP10 (F*)	↑Promoção da Via de sinalização MAPK/mTOR	EAE (Murino)		120
Th17	↓miR-30a-3p/5p	↑IL21R (R*)	↑Expressão de IL-17A	EAE (Murino) EM (Humano)	Promovida	121
	↓miR-15b-3p/5p	↑OGT (TF*)				122
	↑miR-590-3p/5p	↓TOB1 (TF*)		EM (Humano)		123
	↑miR-448-3p/5p	↓PTPN2 (K*)				124
	↑miR-27-3p/5p	↓SMAD3 (TF*)				125
	↓miR-214-3p/5p	↑AKT1 (TF*)	↑Expressão de STAT3 ↑Expressão de IL-17A			
Th17	↓miR-20b-3p/5p	↑RORC (TF*) ↑STAT3 (TF*)	↑Expressão de IL-17	EAE (Murino) EM (Humano)	Promovida	126
	↑miR-21-3p/5p	↓SMAD7 (TF*)	↑Expressão de TGF-β	EAE (Murino)		127
	↑miR-22-3p/5p	↓PTEN (F*)	↓Produção de IL-2			128

Treg	↑miR-182-3p/5p	↓FOXO1 (TF*)	↓Expressão de Foxp3	EAE (Murino)	Inibida	129
	↑let-7e-3p/5p	↓IL10 (C*)				130
	↑miR-142a-3p/5p	↓TGFBR1 (R*)	↓Receção do TGF-*β*	EAE (Murino) EM (Humano)		131
	↑miR-223-3p/5p	↓FOXO1/3 (TF*)	↓Expressão de CTLA-4	EM (Humano)		132

*TF-Fator de Transcrição; R-Recetor; C-Citocina; K-Cinase; Ch-Chaperona; F-Fosfatase;
Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso;

4.3 Identificação de miRNAs como possíveis biomarcadores de doenças autoimunes

Os biomarcadores consistem em moléculas biológicas presentes em tecidos ou fluidos corporais que constituem indicadores da severidade ou progressão de patologias, utilizados na prática clínica para o diagnóstico complementar das mesmas, possuindo também um papel fundamental no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em doenças autoimunes[133]. Os miRNAs circulantes, que se originam a partir de vesículas extracelulares, cumprem os requisitos que constituem um potencial biomarcador, pois encontram-se associados a um perfil de expressão específico, em cada doença autoimune, são muito estáveis, do ponto de vista molecular, e facilmente acessíveis, através de processos minimamente invasivos e sua detecção é pouco dispendiosa. Possuem também uma correlação com a severidade de diferentes patologias. A sua quantificação é frequentemente realizada por meio da técnica RT-qPCR, que permite a análise de perfis de expressão de forma simples e eficaz[134].

Os miRNAs selecionados, a partir das pesquisas acima descritas, foram sujeitos a um intenso estudo molecular que permitiu identificar os seus genes alvo bem como o mecanismo de regulação subjacente à diferenciação de cada subpopulação de linfócitos T CD4+, tendo-se evidenciado níveis desregulados dos mesmos em doenças autoimunes, o que indica que poderão constituir potenciais biomarcadores das respetivas doenças. No entanto, foram encontrados também alguns artigos que, tendo descrito miRNAs desregulados em doenças autoimunes, não especificam o alvo molecular do miRNA em estudo, sendo a sua função desconhecida. Sabe-se que os níveis desses miRNAs se correlacionam com a expressão de fatores reguladores da diferenciação da população celular referida, assim como a severidade da doença. A tabela 8 resume a informação obtida, a partir dos artigos selecionados

das pesquisas anteriores, em que o alvo molecular do miRNA não é identificado e que poderão também ser considerados biomarcadores.

No LES, verificou-se uma associação entre o miR-31-3p/5p e o miR-21-3p/5p, relativamente à expressão citocina IL-2, que se encontra aumentada, em amostras de sangue periférico de pacientes. Observaram-se diferentes perfis de expressão dos mesmos, sendo que o miR-31-3p/5p possui um nível de expressão diminuído, em oposição ao do miR-21-3p/5p que se encontra aumentado, verificando-se uma diminuição da proliferação das células Treg, comparativamente à população Th1[135]. Sabe-se ainda que o miR-210-3p/5p, cuja expressão se encontra aumentada em pacientes com LES, correlaciona-se com o aumento da expressão do fator RORγt, essencial para a diferenciação das células Th17, cujos níveis se encontram aumentados nestes pacientes[136].

Na AR, verificou-se, através da técnica RT-qPCR, que a expressão de miR-16-5p se encontra aumentada na população Th17. A partir de amostras de sangue de pacientes, determinou-se uma associação, em que a sua expressão e a de ROR-γt se encontram simultaneamente aumentadas, observando-se também uma diminuição da expressão deste miRNA em células Treg, correlacionando-se à diminuição da expressão de Foxp3[137]. Destaca-se ainda o let-7g-5p, cuja expressão se demonstra aumentada em pacientes e no modelo murino, em amostras de sangue periférico. Verificou-se uma associação, entre a expressão deste miRNA e a expressão de IL-17A e ROR-γt, que se encontram aumentadas em células T CD4+[138].

Na Ps, um estudo verificou uma associação entre o aumento da expressão do miR-200a-3p/5p e o perfil de expressão dos fatores de transcrição RORγt e o Foxp3. Relativamente ao fator RORγt, ambos possuem a sua expressão aumentada mas, no caso do fator Foxp3, verifica-se a diminuição da sua expressão, o que se correlaciona com a observação de um aumento da proliferação das células Th17, em relação às células Treg, em amostras de sangue periférico de pacientes[139]. Verifica-se ainda, para o mesmo tipo de amostra, o aumento da expressão do miR-1266-3p/5p, associado ao aumento da expressão da citocina IL-17A em células Th17[140].

Na DCr, um estudo analisa a expressão de 17 miRNAs com expressão significativamente diferente, dos quais 3 se correlacionam com o aumento da progressão da doença, com base em biopsias de tecido entérico. Observa-se a diminuição da expressão do miR-192-5p e do miR-141-3p, em oposição ao miR-375-3p/5p que possui a sua expressão aumentada[141].

Na EM, verifica-se uma associação, em que a expressão do miR-26a-3p/5p e de IL-17A se encontam simultaneamente aumentadas, em amostras de sangue periférico de pacientes, observando-se o aumento da proliferação das células Th17[142].

Concluí-se que os miRNAs referidos constituem indicadores de processos biológicos associados a diferentes patologias, possuindo a função de biomarcadores. Com base nos artigos analisados, a sua quantificação realiza-se maioritariamente, a partir de amostras de sangue periférico. Verifica-se que mesmo sem um alvo molecular identificado, torna-se possível correlacionar a expressão de miRNAs com o perfil de expressão de citocinas inflamatórias, presentes no meio extracelular, no contexto da autoimunidade. Desta forma, é estabelecida uma associação com a proliferação de células T efetoras, produtoras das mesmas. A quantificação destes fatores em outros fluídos corporais, como a urina, o flúido cefalorraquidiano, ou o líquido sinovial poderá complementar a informação obtida.

Tabela 8- **Possíveis biomarcadores encontrados para o diagnóstico complementar das doenças autoimunes abordadas.**

Doença Autoimune	Biomarcador	Efeito a nível molecular	Origem da Amostra	Diferenciação	Referência
LES	↓miR-31-3p/5p	↑Expressão de IL-2	Humana (Sangue Periférico)	↓Treg e ↑Th1	135
	↑miR-21-3p/5p				
	↑miR-210-3p/5p	↑Expressão de ROR-γt	Humana e Murina (Sangue Periférico)	↑Th17	136
AR	↑miR-16-5p	↑Expressão de ROR-γt	Humana (Sangue Periférico)	↑Th17	137
	↑let-7g-5p	↑Expressão de ROR-γt e de IL-17A	Murina (Sangue Periférico)	↑Th17	138
Ps	↑miR-200a-3p/5p	↑Promoção da expressão de ROR-γt ↓Inibição da expressão de Foxp3	Humana (Sangue Periférico)	↑Th17 e ↓Treg	139
	↑miR-1266-3p/5p	↑Expressão de IL-17A	Humana (Sangue Periférico)	↑Th17	140
	↓miR-192-5p		Humana		

DCr	↓miR-141-3p ↑miR-375-3p/5p	↑Severidade da doença (Inflamação intestinal)	(Biopsia de Tecido Entérico)	↑Th17 e ↑Th1	141
EM	↑miR-26a-3p/5p	↑Expressão de IL-17A	Humana (Sangue Periférico)	↑Th17	142

Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso;

4.4 Análise do perfil de expressão dos miRNAs identificados na literatura, em células Th1, Th17 e Treg, de doenças autoimunes num modelo experimental de Esclerose Múltipla

As pesquisas anteriormente realizadas permitiram a identificação de microRNAs envolvidos na modulação da expressão genética das células Th1, Th17 e Treg (tabela 2), bem como de miRNAs cuja expressão se encontra alterada em várias doenças autoimunes (tabelas 3 a 8), encontrando-se os resultados sumarizados nas quatro primeiras colunas da tabela 9. Por outro lado, as experiências realizadas no âmbito do Projeto CoG-646701 ERC (ver secção dados preliminares) permitiram identificar 110 miRNAs diferencialmente expressos em células Th1, Th17 e Treg isoladas a partir dos nódulos linfáticos e baço de um modelo animal triplo repórter para o o IFN-*γ* (YFP+), a IL-17 (GFP+) e o Foxp3 (hCD2+) sujeito a EAE conforme descrito na secção de dados preliminares (página 15).

A fim de confirmar se os miRNAs identificados nesta pesquisa bibliográfica, no contexto de várias doenças autoimunes, também se encontravam diferencialmente regulados no modelo animal de EAE, previamente estabelecido no laboratório de acolhimento (dados preliminares, páginas 26-29), procedemos à analise dos níveis de expressão dos mesmos a partir dos nossos dados - sob a forma de *Counts per Million* (CPM) - obtidos por small RNA-seq realizado em RNA extraído de células Th1, Th17 e Treg de ratinhos sujeitos a EAE (Tabela 9). Esta pesquisa permitiu identificar 5 miRNAs diferencialmente expressos em Th1, Th17 ou Treg no modelo de EAE, ou seja, 5 miRNAs que apresentam um "*fold change*" (FD) superior a 2 e significativo, possuindo um valor "*False Discovery Rate*" (FDR) > 0,05 assinalados no "*Heatmap*" da figura 16 que representa os 110 miRNAs diferencialmente expressos entre células efetoras (Th1 e Th17) e reguladoras (Treg) e destacados na tabela 10. O perfil de

expressão dos respetivos alvos moleculares previamente identificados em contextos de outras doenças autoimunes também foram analisados no nosso modelo de EAE, encontrando-se os resultados representados na tabela 10.

Ao juntar a informação das tabelas 3-8 para a construção da tabela 9 foi possível concluir que a alteração da expressão dos níveis de alguns miRNAs é um fator comum a várias doenças autoimunes, o que revela um interesse fisiopatológico acrescido para estes miRNAs conforme explorado na discussão desta tese.

Tabela 9- **Perfil de expressão na EAE dos microRNAs selecionados a partir da pesquisa bibliográfica.**

Diferenciação (De acordo, com a referência)	miRNA	Doença Autoimune	Referência	Níveis de expressão no modelo EAE (CPM*)		
				Th1	Th17	Treg
↑Th1	↑Let-7a-5p	Ps	106	58017,15	78139,48	52261,43
↑Th1	↑miR-92a-3p/5p	EAE/EM	120	25477,34	17430,1	40046,54
↑Th1	↓miR-138-3p/5p	Ps	105	1,24	0	0
↑Th1	↓miR-140-5p	EAE/EM	119	802,57	331,40	805,38
↑Th1	↓miR-219a-5p	DCr	111	20,95	68,59	22,55
↑Th17	↑let-7g-5p (Biomarcador)	AR	137	58017,15	78139,48	52261,43
↑Th17	↑miR-1266-3p/5p (Biomarcador)	Ps	139	0	0	0
↑Th17	↑miR-210-3p (Biomarcador)	LES, Ps	135,107	37,21	50,61	19,21
	↑miR-210-5p (Biomarcador)			10,06	0	23,75
↑Th17	↑miR-128-3p	AR	100	254,32	98	334,39
↑Th17	↑miR-22-3p	DCr e EAE/EM	114, 128	740,41	125,68	352,74
	↑miR-22-5p			189,51	65,28	53,15
↑Th17	↑miR-26a-3p /5p (Biomarcador)	EM	132, 141	685,66	438,33	1377,66
↑Th17	↑miR-27a-3p	EAE/EM	125	1184,84	236,57	2307,61
	↑miR-27a-5p			1363,74	426,19	1929,1
↑Th17	↑miR-301a-3p	AR	99	271,14	486,52	136,56
↑Th17	↑miR-322-5p	LES	95	106	360	74,66
↑Th17	↑miR-425-3p	DCr	113	76,6	19,63	40,95
	↑miR-425-5p			564,27	250,17	699,5
↑Th17	↑miR-448-3p/5p	EAE/EM	124	0	0	0
↑Th17	↑miR-451a-3p/5p**	LES	91	40,84	145,74	0,99

↑Th17	↑miR-590-3p/5p	EAE/EM	123	0	0	0
↑Th17	↑miR-873-3p/5p	LES	93	0	0	0
↑Th17	↓Let-7f-1-3p	LES	94	45.55	283.56	45.55
	↓Let-7f-2-3p			68.33	20.89	68.33
	↓Let-7f-5p			36170.06	31477.97	60282.27
↑Th17	↓miR-101-3p	LES	92	174,02	65,28	134,69
↑Th17 e ↑Th1	↓miR-125a-3p	DCr	112	26,49	9,83	7,81
	↓miR-125a-5p**			2077,1	509,52	5343,78
↑Th17	↓miR-15b-3p	EAE/EM	122	1243,57	1077,94	3115,37
	↓miR-15b-5p**			1310,92	538,31	5970,73
↑Th17	↓miR-20b-3p	EAE/EM	126	3,69	0	10,18
	↓miR-20b-5p			712,88	470,41	859,59
↑Th17	↓miR-214-3p	EAE/EM	125	64,01	106,01	22,38
	↓miR-214-5p			0	0	0
↑Th17	↓miR-30a-3p	EAE/EM	121	60,66	27,72	64,02
	↓miR-30a-5p			0	0	1,61
↑Th17	↓miR-340-3p	Ps	108	8,65	88,17	43,22
	↓miR-340-5p			2,47	3,27	36,54
↑Th17	↓miR-498-3p/5p	AR	101	0	0	0
↓Treg	↑let-7e-3p	EAE/EM	130	1,22	0	1,61
	↑let-7e-5p			1294,32	566,32	1135,62
↓Treg	↑miR-106a-3p	DCr	115	1,24	0	1,99
	↑miR-106a-5p			301,75	179,58	392,85
↓Treg	↑miR-142-3p	EAE/EM	131	27568,48	24809,35	24448,44
	↑miR-142-5p			29964,52	13863,26	49657,1
↓Treg	↑miR-148-3p	LES	97	144,71	88,14	78,12
	↑miR-148-5p			0	0	0
↓Treg	↑miR-17-3p	AR	102	113.88	119.39	113.88
	↑miR-17-5p			1047.74	1370.05	1047.75
↓Treg	↑miR-182-3p	EAE/EM	145	0	0	0
	↑miR-182-5p			58,72	8,15	1,61
↓Treg	↑miR-223-3p**	EAE/EM	132	946,26	275,94	2549,09
	↑miR-223-5p		132	11,08	2,6	62,07
↓Treg	↑miR-34a-3p	LES e AR	96	1,22	0	0
	↑miR-34a-5p			19,74	58,81	26,38
↓Treg e ↑Th1	↑miR-21-3p (Biomarcador)	LES e EAE/EM	134,127	66,76	34,29	41
	↑miR-21-5p (Biomarcador)			25036,12	10557,82	37904,34
	↓miR-31-3p (Biomarcador)	LES	134	46,99	96,35	12,99
	↓miR-31-5p			786,61	750,9	235,35

	(Biomarcador)					
↑Th17 e ↑Th1	↑miR-375-3p/5p (Biomarcador)	DCr	131	0	0	0
↑Th17 e ↑Th1	↓miR-141-3p (Biomarcador)	DCr		0	0	0
↑Th17 e ↑Th1	↓miR-192-5p (Biomarcador)	DCr		0	8.95	0
↑Th17 e ↓Treg	↑miR-16-5p** (Biomarcador)	AR	136	8333,38	2520,4	22414,94
↑Th17 e ↓Treg	↑miR-200a-3p (Biomarcador)	Ps	138	3,69	4,88	6,58
	↑miR-200a-5p (Biomarcador)			4,94	0	2,6

**Counts per million* – dados obtidos por análise de small RNA-seq
**miRNAs diferencialmente expressos no modelo experimental EAE (sombreado);
Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso;

Tabela 10- **Perfil de expressão na EAE dos genes alvo dos miRNA diferencialmente expressos.**

miRNA	População com maior expressão no modelo animal EAE	Níveis de expressão no modelo EAE (CPM*)			Valor FDR	Doença Autoimune	Efeito na diferenciação celular de acordo com a pesquisa bibliográfica	Gene Alvo	Níveis de expressão no modelo EAE (CPM*)			Referência
		Th1	Th17	Treg					Th1	Th17	Treg	
miR-451a-3p/5p**	Th17	40,84	145,74	0,99	0.0006	LES	Th17	IRF8	177,814	57,846	84,020	91
miR-125a-5p**	Treg	2077,1	509,52	5343,78	0.0497	DCr	Treg	ETS1	678,121	429,187	566,983	112
miR-15b-5p**	Treg	1310,92	538,31	5970,73	0.0012	EM/EAE	Treg	OGT	1366,82	1136,78	1030,73	122
miR-223-3p**	Treg	946,26	275,94	2549,09	0.0221	EM/EAE	Treg	FOXO1	328,078	240,848	243,429	132
								FOXO3	43,828	40,398	57,856	
miR-16-5p**	Treg	8333,38	2520,4	22414,94	0.0497	AR	Treg	Não identificado	-	-	-	136

**Counts per million*;
**miRNAs diferencialmente expressos;
Verde: Sobre-expresso; Vermelho: sub-expresso

5. Discussão

As células T CD4+ possuem um papel crucial no sistema imunitário adaptativo sendo importantes reguladores da autoimunidade e infeção. Estas células têm a capacidade de se diferenciarem em células efetoras (Th1 e Th17) e células reguladoras (Treg) que exercem ações opostas. O processo de diferenciação depende da expressão de fatores reguladores específicos para cada população celular, em que se destaca a função de citocinas, fatores de transcrição e recetores de superfície. As citocinas podem surgir a partir do meio extracelular, ou serem produzidas pelas

próprias células, atuando de forma autócrina, possuindo um papel fundamental na ativação de recetores que desencadeiam vias de sinalização, envolvidas na ativação dos fatores de transcrição que modulam a expressão de genes relevantes para a acção de cada subtipo celular[143]. As células Th1 desencadeiam respostas inflamatórias, resultantes da expressão do fator de transcrição T-bet que promove a produção das citocinas IL-2 e IFN-*γ*. As células Th17 caracterizam-se pela expressão do fator de transcrição ROR-*γ* que desencadeia a expressão de IL-17 envolvida em respostas inflamatórias[144]. As células Treg, por outro lado, funcionam como células supressoras, limitando as respostas das células pró-inflamatórias, nomeadamente através da produção de citocinas que exercem o efeito oposto, como a IL-10, e o TGF-*β*. A expressão de todos estes fatores encontra-se sujeita a um nível adicional de regulação pós-transcricional, mediada por microRNAs que consistem em pequenos RNAs não codificantes, formados por cerca de 20 nucleótidos, que atuam inibidindo a tradução, ou promovendo a degradação de mRNAs através da ligação à região 3'UTR dos mesmos. Por esse motivo, estes constituem fatores cruciais na diferenciação das células T CD4+ e da homeostasia do sistema imunitário. Quando o balanço entre células efetoras e reguladoras se encontra comprometido, nomeadamente, quando existe uma resposta exacerbada de células efetoras, poderá desenvolver-se autoimunidade. Deste modo, alterações no perfil de expressão dos microRNAs que comprometam a expressão de genes envolvidos na diferenciação das células T CD4+ poderão estar na origem de várias doenças autoimunes[145]. Na realidade, uma revisão feita por Abdellatif M em 2012 salienta o papel crucial que os microRNAs desempenham como reguladores pós-transcricionais que são expressos diferencialmente em quase todas as doenças conhecidas. Devido à sua capacidade de possuir simultaneamente vários alvos funcionalmente relevantes, cada miRNA possui a capacidade de desencadear diferentes efeitos na diferenciação celular[146].

Através da pesquisa bibliográfica efetuada neste estudo, foi possível identificar vários miRNAs com níveis de expressão alterados em células T CD4+ provenientes de amostras de sangue periférico de origem humana e/ou de modelos animais de várias doenças autoimines, tendo-se verificado o seu efeito na diferenciação celular, o qual foi relacionado com o perfil clínico de cada doença autoimune abordada. Após análise dos resultados obtidos, sumarizados nas secções 4.2. a 4.3 verificou-se que existem vários miRNAs comuns às patologias abordadas. Observa-se, tanto no LES como na AR, o aumento da expressão do miR-34a-3p/5p em células Treg. Relativamente ao miR-210-3p/5p, verifica-se o aumento da sua

expressão em células Th17 em pacientes com LES e Ps. Destaca-se também o miR-21-3p/5p, cuja expressão se encontra aumentada em células Th1, comparativamente à população Treg, em pacientes com LES e no modelo EAE. Por fim, verifica-se o aumento da expressão do miR-22-3p/5p em células Th17, tanto em pacientes com DCr, como no modelo EAE.

A indução da expressão de cada miRNA indicado parece estar sujeita a fatores reguladores comuns às patologias referidas. Nomeadamente, o aumento da expressão do miR-34a-3p/5p observado tanto nas células Treg do LES como na AR está relacionado com o aumento da expressão do fator NF-κB. Tal foi confirmado através da utilização do inibidor BAY 11-7082, que impede a fosforilação do NF-κB e que promove a diminuição da expressão do miR-34a-3p/5p. O agravamento das patologias provocado pelo aumento do miR-34a-3p/5p está relacionado com a diminuição da expressão de Foxp3, alvo direto deste miRNA, e portanto com a inibição da diferenciação das células Treg que se correlaciona com o perfil clínico observado no modelo murino, caracterizado por um aumento da inflamação das articulações com a consequente destruição do tecido ósseo e cartaliginoso[96].

Relativamente ao miR-210-3p/5p, sabe-se que o fator HIF-1*α* promove a sua expressão, através da sua ligação à zona promotora, designada S2, em pacientes com Ps. Observa-se uma associação entre este fator e o aumento da produção das citocinas IL-6, TGF-*β* e IL-23, que agrava as lesões dérmicas observadas em biopsias de origem murina[107]. Estas citocinas, indutoras da produção de IL-17 têm um efeito co-promotor, com o miR-210-3p/5p da diferenciação das células Th17 responsáveis pelas lesões dérmicas observadas nestes pacientes.

Relativamente ao miR-21, em pacientes com Ps verifica-se que este possui como alvo o fator Smad7 que inibe a formação do complexo Smad2/3, que induz a produção de IL-17A. O aumento da expressão deste miRNA associa-se à diminuição da produção da citocina IL-2 que possui ação anti-inflamatória, verificando-se o aumento da severidade do perfil clínico de pacientes com LES[135]. Um estudo feito em células malignas do tecido mamário revela que a exposição ao TGF-*β*, durante 30 minutos, promove a expressão do miR-21, devido ao facto da mesma gerar o aumento da expressão do complexo Smad2/3 que se encontra envolvido na maturação deste miRNA. O complexo referido é recrutado pela unidade RNA helicase p68, um componente da proteína Drosha, promovendo assim o processamento do pri-miR-21 em pre-miR-21[147]. O artigo relativo ao modelo EAE, confirma esta associação entre o aumento da quantidade de TGF-*β* e o aumento da expressão do complexo Smad2/3 e

consequentemente da diferenciação de células Th17, evidenciado pela presença de lesões na espinhal medula[127]. Quanto ao miR-22, verifica-se que a citocina IL-6 promove significativamente a sua expressão, assim como a diferenciação de células Th17, associando-se ao aumento da severidade do perfil clínico observado num modelo murino EAE[128]. Na DCr, também se observa um aumento da diferenciação das células Th17, verificando-se especificamente um aumento das citocinas IL-17A e o TNF-α, principais responsáveis pelas lesões no epitélio do tecido entérico, conforme observado em biópsias de pacientes[114]. Em estudos futuros seria importante a análise da via de sinalização desencadeada pelo recetor de IL-6, de forma a averiguar quais os fatores de transcrição envolvidos na indução do miR-22, tanto no modelo EAE como na DCr. Através de técnicas de precipitação da cromatina, como a técnica ChIP (ver anexo 7.1.2), poderá ser possível também a identificação de possíveis fatores que se ligam à região promotora deste miRNA.

Estes miRNAs, comuns a várias doenças autoimunes, poderão ser potenciais alvos terapêuticos sujeitos à ação de inibidores que promovam a diminuição da sua expressão e consequentemente restabeleçam os níveis normais de células Treg e Th17.

Posteriormente à identificação dos miRNAs envolvidos na modulação da diferenciação de células T CD4+ em doenças autoimunes, através da pesquisa bibliográfica, foi possível a construção da tabela 9 que inclui os níveis de expressão dos miRNAs em células Th1, Th17 e Treg no modelo experimental de esclerose múltipla – EAE – estabelecido no laboratório de acolhimento. Consideram-se diferencialmente expressos os miRNAs que apresentam um valor logFC superior a 2 com FDR significativo (<0.05) em cada uma das referidas populações, como observado no "*heatmap"* da figura 16. Do cruzamento dos dados obtidos na nossa pesquisa bibliográfica com a informação dos miRNAs diferencialmente expressos em Th1, Th17 e Treg em EAE, resultou a tabela 10 que inclui 5 miRNAs, a maioria dos quais desregulado em Treg na nossa pesquisa bibliográfica.

Verifica-se que a expressão do miR-451a-3p encontra-se aumentada em células Th17, isoladas a partir do ratinho triplo repórter sujeito a EAE, relativamente às restantes populações celulares (tabela 10). No LES, verifica-se o aumento da expressão deste miRNA em células T CD4+. O miR-451a-3p possui como alvo molecular o fator IRF8, cuja expressão está diminuída nas células Th17 dos ratinhos sujeitos a EAE (tabela 10), indicando que o IRF8 poderá também ser um gene alvo do miR-451ª-3p em EAE. O *Knockout* deste miRNA revela uma diminuição da produção

de citocinas inflamatórias, como a IL-17A e a IL-4. Observa-se ainda uma maior integridade do tecido tubular renal, a partir de biopsias de origem murina[91].

Relativamente ao miR-125a-5p, observa-se no modelo animal EAE um aumento da sua expressão em células Treg. Estes resultados contradizem os observados na doença de Crohn, em que se verifica uma diminuição da expressão do mesmo, sendo promovida a diferenciação de células Th1 e Th17, dado que este miRNA inibe a expressão do fator ETS1, indutor da expressão das citocinas IFN-*γ* e IL-17A[112]. Um estudo feito em pacientes com púrpura trombocitopénica idiopática, um distúrbio que envolve a formação de pequenos coágulos de sangue por todo o corpo, revela uma associação entre o aumento da expressão do miR-125a-5p e o aumento da expressão do fator Foxp3 em células T CD4+[148]. Tal poderá justificar a expressão aumentada deste miRNA nas células Treg presentes no nosso modelo EAE. Outro estudo demontra que a expressão do miR-125a-5p é induzida em células Treg na presença da citocina IL-6, estando associada à diminuição dos fatores IL-6R e STAT3 que promovem a produção de citocinas características de células T efetoras[149]. Verifica-se que a expressão deste miRNA é induzida num ambiente pró-inflamatório, como tal o desencadeamento do nosso modelo EAE, através da toxina MOG, poderá induzir a expressão deste miRNA.

Quanto ao miR-15b-5p, verifica-se no modelo EAE uma maior expressão na população de células Treg. Sabe-se que este possui como alvo o fator OGT que promove a formação de ligações *β*-glicosídicas no fator NF-kB, ativando-o. Este, por usa vez, promove a expressão de STAT3 que induz a produção das citocinas IL-17A e IFN-*γ*, características das células Th17 e Th1, respetivamente[122]. Com base no modelo murino, foi por outro lado obsevado que o miR-15b-5p também promove a proliferação das células Treg, através da regulação da expressão dos fatores Rictor e mTOR que constituem alvos moleculares, envolvidos na ativação de fatores como o Akt1, que possuem a ação anti-apoptótica. Biopsias de tecido entérico revelam uma diminuição da inflamação do mesmo[150]. Assim o miR-15b-5p parece, por um lado estar associado à promoção de EAE, através da promoção da diferenciação das células Th1 ou Th17, mas poderá também, através da promoção da diferenciação das células Treg impedir a progressão da doença. Será necessário clarificar o papel deste miRNA em EAE em estudos futuros.

O miR-223-3p encontra-se mais expresso na população de células Treg do modelo experimental EAE do laboratório, confirmando resultados obtidos na nosssa pesquisa bibliográfica. Um estudo revela que em pacientes com EM existe uma

associação, entre o aumento da expressão do miR-223-3p e a diminuição da expressão de Foxo1/3, que constitui o alvo molecular, e a diminuição da expressão de Foxp3, durante a fase recorrente da EM, em que se verifica o agravamento dos sintomas[132]. Um estudo baseado num modelo de uveíte autoimune experimental confirma esta diminuição da diferenciação das células Treg, associada ao aumento da expressão deste miRNA. Os autores demonstraram que o fator Foxo3 inibe a expressão do recetor de IL-23, cuja via de sinalização ativa o fator de transcrição STAT3, envolvido na expressão de citocinas inflamatórias como a IL-17A[151]. Assim, o aumento da expressão do miR-223-3p em condições de autoimunidade diminui a diferenciação das células Treg e promove a diferenciação das células Th17, assim se justificando o seu papel na promoção da doença autoimune.

O miR-16-5p, proposto como biomarcador em AR no nosso estudo, possui também a sua expressão aumentada em células Treg do modelo experimental EAE analisado no laboratório de acolhimento. Um outro estudo, baseado no modelo murino, confirma a expressão aumentada do miR-16-5p em células Treg, em condições basais, devido à inibição dos fatores Rictor e mTOR que possuem ação anti-apoptótica em células T efetoras, constituindo alvos moleculares do miR-16-5p[150]. No entanto, estes resultados contradizem a correlação observada em amostras de sangue periférico de pacientes com AR, em que a expressão do miR-16-5p se encontra diminuída nesta população celular, estando associada à diminuição da expressão de Foxp3, observando-se, assim, uma diminuição da diferenciaçãodas células Treg[137].

A revisão sistemática feita por Mori, M. A. em 2019 revela que a quantificação da expressão de microRNAs pode representar uma nova ferramenta não invasiva para detectar e monitorizar a atividades de diversas doenças, servindo como biomarcadores[152]. Os miRNAs de origem extracelular permitem a identificação de 11 condições clínicas associadas à danificação de órgãos internos e de pelo menos 20 diferentes tipos de cancro[152]. Por exemplo, os miRNAs circulantes de amostras de sangue periférico podem ser usados como biomarcadores para distinguir diferentes tipos de linfomas não Hodgkin, cujo tratamento varia conforme a patologia, entre os quais destaca-se o linfoma difuso de grandes células B que se caracteriza pelo aumento da expressão dos fatores miR-155, miR-21 e miR-221[153]. A diminuição dos níveis de expressão do miR-29b e miR-29c, em amostras de urina de pacientes, são identificados como biomarcadores de diagnóstico, e possível prognóstico, de fibrose renal[154].

No caso da esclerose múltipla, a validação de novos biomarcadores, no soro

ou no plasma, para a identificação do estágio da doença, poderá beneficiar os pacientes, ao iniciarem o tratamento apropriado precocemente[155]. Com base em resultados obtidos, a partir de líquido cefalorraquidiano, verifica-se, através da técnica RT-qPCR, o aumento da expressão do miR-922, miR-181c e miR-633, em pacientes com EM num estágio inicial, sendo que estes dois últimos permitem a diferenciação de outras doenças neurológicas, com um perfil clínico semelhante. Concluí-se que os miRNAs referidos possuem a função de biomarcadores para o diagnóstico complementar da mesma[156]. Através do mesmo método, um estudo feito, com base no modelo murino da EAE, revela o aumento significativo da expressão do miR-99b, miR-125a e miR-146b, em amostras de sangue periférico, inferindo sobre a possibilidade do uso dos mesmos como biomarcadores no diagnóstico clínico[157]. Como tal, os microRNAs da tabela 8 que não possuem alvo molecular poderão ser utilizados como possíveis biomarcadores, pois funcionam como indicadores do estado de progressão da sua respetiva doença. No caso do miR-16 observou-se, como acima referido, a sua expressão diferencial nas células Treg do modelo EAE estabelecido. A fim de analisar a sua importância funcional poderá fazer-se a sua sobreexpressão ou inibição da sua expressão neste modelo animal. Poderão ainda ser identificados alvos moleculares deste miRNA neste modelo estabelecendo assim o mecanismo molecular da sua ação. Os resultados obtidos, uma vez validados em amostras de pacientes com EM, poderão levar ao uso deste miRNA como biomarcador em EM (para além de AR) e inclusivé como potencial alvo terapêutico. Para tal será necessária a realização de ensaios clínicos que gerem evidência suficiente, para que o biomarcador proposto seja aprovado por um processo de validação que atende a determinados critérios de clínicos, em que se verifica que a sua utilização é favorável, em termos de diagnóstico ou monitorização da doença[158].

De acordo com o proposto por Zhang, L. et al, o uso de microRNAs no tratamento de doenças autoimunes constitui uma nova geração de fármacos, devido ao seu papel na regulação da expressão génica[159]. Sabe-se que estes possuem alvos potenciais que alteram a produção de diferentes tipos de citocinas, como o IFN-γ e a IL-17, modulando assim a resposta imunitária[159]. Como tal, o principal objetivo deste tipo de terapia, consiste na modulação dos níveis dos miRNAs que, por sua vez, vão regular a produção de citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias em células T efetoras e reguladoras. Assim, por um lado, terão de ser administrados miRNAs, cuja expressão se encontre diminuida nos pacientes, o que poderá ser feito através de oligonucleótidos sintéticos. Por outro lado, terá de se bloquear o efeito de miRNAs,

cuja expressão se encontre aumentada em pacientes. Tal poderá ser feito por meio de antagonistas, designados, nomeadamente, por antagomiRs. Para isso, a administração pode realizar-se por via parenteral para maximizar a biodisponibilidade, de forma a gerar o efeito desejado no tecido alvo[160]. É necessário ter em conta que a administração ou o silenciamento de um único microRNA pode modificar a expressão de vários genes, de forma simultânea. Além disso, um desafio geral deste tipo de terapia consiste em evitar a degradação rápida pelas RNases abundantes na circulação ou no compartimento endocítico das células. De facto, a modulação de miRNAs envolvidos na diferenciação de células T CD4+ constitui uma oportunidade para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças autoimunes. Embora na prática clínica possa ser necessário alterar a expressão de vários microRNAs para a obtenção do efeito terapêutico[162].

Em suma, a pesquisa bibliográfica permitiu a identificação de miRNAs comuns às patologias abordadas que poderão constituir possíveis alvos terapêuticos no tratamento da autoimunidade, com base modulação da diferenciação de células T CD4+. Podendo ser relevantes na manutenção da homeostase entre células T efetoras (Th1 e Th17) e células Treg, regulando assim a resposta inflamatória do sistema imunitário. Outros estudos poderão analisar o impacto da modulação dos mesmos no desenvolvimento de uma terapia comum às diferentes patologias. Os dados do nosso modelo animal EAE possibilitaram a identificação de miRNAs com expressão diferencial que poderão ser sujeitos a uma análise funcional futura que permita determinar o seu impacto na esclerose múltipla. Estudos futuros ajudarão a compreender os processos moleculares envolvidos na doença, assim como a identificação de possíveis indicadores da sua atividade ou progressão clínica.

6. Referências Bibliográficas

1. Mackay, I. R. (2010). Travels and travails of autoimmunity: A historical journey from discovery to rediscovery. *Autoimmunity Reviews, 9*(5), A251–A258. doi:10.1016/j.autrev.2009.10.007

2. Conigliaro, P., Triggianese, P., Ballanti, E., Perricone, C., Perricone, R., & Chimenti, M. S. (2019). Complement, infection, and autoimmunity. Current opinion in rheumatology, 31(5), 532–541. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000633

3. Khan, U., & Ghazanfar, H. (2018). T Lymphocytes and Autoimmunity. *International review of cell and molecular biology, 341*, 125–168. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008

4. Fallahi, P., Ferrari, S. M., Ragusa, F., Ruffilli, I., Elia, G., Paparo, S. R., & Antonelli, A. (2020). Th1 Chemokines in Autoimmune Endocrine Disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *105*(4), dgz289. https://doi.org/10.1210/clinem/dgz289

5. Kidd P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, *8*(3), 223–246.

6. Diveu, C., McGeachy, M. J., & Cua, D. J. (2008). Cytokines that regulate autoimmunity. *Current Opinion in Immunology, 20*(6), 663–668. doi:10.1016/j.coi.2008.09.003

7. Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells*. Nature immunology, 3*(6), 549–557. https://doi.org/10.1038/ni794

8. Sugimoto, N., Nakahira, M., Ahn, H. J., Micallef, M., Hamaoka, T., Kurimoto, M., & Fujiwara, H. (2003). Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *European journal of immunology, 33*(1), 243–251. https://doi.org/10.1002/immu.200390027

9. Immune response - IL-12-induced IFN-gamma production. (2020). Recuperado em outubro 05, 2020, de https://www.bio-rad.com/de-de/prime-pcr-assays/pathway/immune-system-development/immune-response-il-12-induced-ifn-gamma-production

10. Yasuda, K., Takeuchi, Y., & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in immunopathology*, *41*(3), 283–297. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00733-8

11. Schraml, B. U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W. L., Smith, W. A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., Hatton, R. D., Stormo, G. D., Weaver, C. T., Russell, J. H., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature, 460*(7253), 405–409. https://doi.org/10.1038/nature08114

12. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, *27*, 485–517. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710

13. Romagnani, S. (2008). *Human Th17 cells. Arthritis Research & Therapy, 10(2), 206.* doi:10.1186/ar2392

14. Amatya, N., Garg, A. V., & Gaffen, S. L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends in immunology*, *38*(5), 310–322. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006

15. Abusleme, L., & Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral diseases*, *23*(7), 854–865. https://doi.org/10.1111/odi.12598

16. Khan, D., & Ansar, S. (2015). Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Frontiers in Genetics, 6.* doi:10.3389/fgene.2015.00236

17. Jäger, A., & Kuchroo, V. K. (2010). Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology, 72*(3), 173–184. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x

18. Göschl, L., Scheinecker, C., & Bonelli, M. (2019). Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Seminars in immunopathology*, *41*(3), 301–314. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00741-8

19. Deng, G., Song, X., Fujimoto, S., Piccirillo, C. A., Nagai, Y., & Greene, M. I. (2019). Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity. *Frontiers in immunology*, *10,* 2486. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02486

20. Bitesized imunnology. (2020). Recuperado em outubro 24, 2020, de https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/regulatory-t-cells-tregs

21. Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T., & Sakaguchi, S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature, 446*(7136), 685–689. https://doi.org/10.1038/nature05673

22. Kim C. H. (2009). FOXP3 and its role in the immune system. *Advances in experimental medicine and biology*, *665*, 17–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_2

23. Sakaguchi, S., Wing, K., & Yamaguchi, T. (2009). Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European Journal of Immunology, 39*(9), 2331–2336. doi:10.1002/eji.200939688

24. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochov, G., & Sakaguchi, S. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity, 30*(6), 899–911. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019

25. Barbi, J., Pardoll, D., & Pan, F. (2014). Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunological reviews, 259*(1), 115–139. https://doi.org/10.1111/imr.12172

26. Lee, G. R. (2018). The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 730. https://doi.org/10.3390/ijms19030730

27. Guéry, L., & Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Research International, 20*, 1–11. doi:10.1155/2015/314620

28. Eisenstein, E. M., & Williams, C. B. (2009). The Treg/Th17 Cell Balance: A New Paradigm for Autoimmunity. Pediatric Research, 65(5), 26–31. doi:10.1203/pdr.0b013e31819e76c7

29. Figueiredo, A. S., & Schumacher, A. (2016). The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. Immunology, 148(1), 13–21. doi:10.1111/imm.12595

30. Quintero, O. L., Amador-Patarroyo, M. J., Montoya-Ortiz, G., Rojas-Villarraga, A., & Anaya, J.-M. (2012). Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. Journal of Autoimmunity, 38(2-3), 109–119. doi:10.1016/j.jaut.2011. 10.003

31. Ortona, E., Pierdominici, M., Maselli, A., Veroni, C., Aloisi, F., & Shoenfeld, Y. (2016). Sex-based differences in autoimmune diseases. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, *52*(2), 205–212. https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_12

32. Rivas-Larrauri, F., & Yamazaki-Nakashimada, M. A. (2016). Systemic lupus erythematosus: Is it one disease?. Lupus eritematoso sistémico: ¿es una sola enfermedad?. *Reumatologia clinica*, *12*(5), 274–281. https://doi.org/10.1016/ j.reuma.2016.01.005

33. Kleczynska W, Jakiela B, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, & Musial J. (2011). Imbalance between TH17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochemistry Cytobiology 49*(4),646–53. doi: 10.1155/2018/7103219

34. Tobón, G. J., Youinou, P., & Saraux, A. (2010). The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. Journal of Autoimmunity, 35(1), 10–14. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.009

35. Castagnetta, L. A., Carruba, G., Granata, O. M., Stefano, R., Miele, M., Schmidt, M., Cutolo, M., & Straub, RH. (2003). Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology 30*(12):2597-605.

36. Bystrom, J., Clanchy, F. I., Taher, T. E., Mangat, P., Jawad, A. S., Williams, R. O., & Mageed, R. A. (2018). TNFα in the regulation of Treg and Th17 cells in

rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases. *Cytokine, 101*, 4–13. doi:10.1016/j.cyto.2016.09.001

37. Yang, P., Qian, F., Zhang, M., Xu, A., Wang, X., Jiang, B., & Zhou, L. (2019). Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis. *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1002/jlb.4ru0619-197r

38. Christophers, E. (2001). Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. Clinical and Experimental Dermatology, 26(4), 314–320. doi:10.1046/j.1365-2230.2001.00832.x

39. Prinz, J. (2003). The role of T cells in psoriasis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 17(3), 257–270. doi:10.1046/j.1468-3083.2003.00720.x

40. Owczarczyk-Saczonek, A., Czerwińska, J., & Placek, W. (2018). The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, *27*(1), 17–23.

41. D'Haens, G., Baert, F., van Assche, G., Caenepeel, P., Vergauwe, P., Tuynman, H., & Hommes, D. (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. The Lancet, 371(9613), 660–667. doi:10.1016/s0140-6736(08)60304-9

42. Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine, 361*(21), 2066–2078. doi:10.1056/nejmra0804647

43. Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. *Current opinion in neurology*, *31*(6), 752–759. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000622

44. McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F. D., &Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Annals of Neurology, 50(1), 121–127. doi:10.1002/ana.1032

45. Codarri, L., Gyülvészi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., & Becher, B. (2011). RORγt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology*, *12*(6), 560–567. https://doi.org/10.1038/ni.2027

46. Bjartmar, C., Kinkel, R. P., Kidd, G., Rudick, R. A., & Trapp, B. D. (2001). Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. Neurology, 57(7), 1248–1252. doi:10.1212/wnl.57.7.1248

47. Kaskow, B. J., & Baecher-Allan, C. (2018). Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8*(4), a029025. doi:10.1101/cshperspect.a029025

48. McGeachy, M. J., Stephens, L. A., & Anderton, S. M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(5), 3025–3032. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3025

49. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome research, 19(1), 92–105. https://doi.org/10.1101/gr.082701.108

50. Dai, R., & Ahmed, S. A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. Translational Research, 157(4), 163–179. doi:10.1016/j.trsl.2011.01.007
51. Chong, M. M., Rasmussen, J. P., Rudensky, A. Y., & Littman, D. R. (2008). The RNAseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine*, *205*(9), 2005–2017. https://doi.org/10.1084/jem.20081219
52. Cobb, B. S., Nesterova, T. B., Thompson, E., Hertweck, A., O'Connor, E., Godwin, J., Wilson, C. B., Brockdorff, N., Fisher, A. G., Smale, S. T., & Merkenschlager, M. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of experimental medicine*, *201*(9), 1367–1373. https://doi.org/10.1084/jem.20050572
53. Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. Cell, 173(1), 20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
54. Pagani, M., Rossetti, G., Panzeri, I., de Candia, P., Bonnal, R. J. P., Rossi, R. L., & Abrignani, S. (2013). Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4+T-cell differentiation. Immunological Reviews, 253(1), 82–96. doi:10.1111/imr.12055
55. Inácio, D. P., Amado, T., Silva-Santos, B., & Gomes, A. Q. (2018). Control of T cell effector functions by miRNAs. *Cancer Letters, 427,* 63–73. doi:10.1016/j.canlet.2018.04.011
56. Cobb, B. S., Nesterova, T. B., Thompson, E., Hertweck, A., O'Connor, E., Godwin, J., Wilson, C. B., Brockdorff, N., Fisher, A. G., Smale, S. T., & Merkenschlager, M. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of experimental medicine, 201*(9), 1367–1373. https://doi.org/10.1084/jem.20050572
57. Steiner, D. F., Thomas, M. F., Hu, J. K., Yang, Z., Babiarz, J. E., Allen, C. D., Matloubian, M., Blelloch, R., & Ansel, K. M. (2011). MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-γ production in helper T cells. *Immunity*, *35*(2), 169–181. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.009
58. Kästle, M., Bartel, S., Geillinger-Kästle, K., Irmler, M., Beckers, J., Ryffel, B., Eickelberg, O., & Krauss-Etschmann, S. (2017). microRNA cluster 106a~363 is involved in T helper 17 cell differentiation. *Immunology, 152*(3), 402–413. https://doi.org/10.1111/imm.12775

59. Pan, W., Zhu, S., Dai, D., Liu, Z., Li, D., Li, B., Gagliani, N., Zheng, Y., Tang, Y., Weirauch, M. T., Chen, X., Zhu, W., Wang, Y., Chen, B., Qian, Y., Chen, Y., Fang, J., Herbst, R., Richman, L., Jallal, B., & Shen, N. (2015). MiR-125a targets effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature communications*, *6*, 7096. https://doi.org/10.1038/ncomms8096
60. Sethi, A., Kulkarni, N., Sonar, S., & Lal, G. (2013). Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. Frontiers in Genetics, 4. doi:10.3389/fgene.2013.00008
61. Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., & Pei, G. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology*, *10*(12), 1252–1259. https://doi.org/10.1038/ni.1798
62. Sun, Z., Evans, J., Bhagwate, A., Middha, S., Bockol, M., Yan, H., & Kocher, J. P. (2014). CAP-miRSeq: a comprehensive analysis pipeline for microRNA sequencing data. *BMC genomics*, *15*(1), 423. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-423
63. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, *10*(3), R25. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25
64. Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic acids research*, *40*(1), 37–52. https://doi.org/10.1093/nar/gkr688
65. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, *36*, D154–D158. https://doi.org/10.1093/nar/gkm952
66. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature biotechnology*, *37*(8), 907–915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4
67. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(7), 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656
68. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *26*(1), 139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616
69. Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*, *11*(3), R25. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25
70. Robinson, M. D., & Smyth, G. K. (2007). Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *23*(21), 2881–2887. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm453
71. Chen, C., Zhou, Y., Wang, J., Yan, Y., Peng, L., & Qiu, W. (2018). Dysregulated MicroRNA Involvement in Multiple Sclerosis by Induction of T Helper 17 Cell Differentiation. *Frontiers in immunology*, *9*, 1256. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01256

72. Zhu J. (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 10(10), a030338. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338
73. Liu, J., Wu, C. P., Lu, B. F., & Jiang, J. T. (2013). Mechanism of T cell regulation by microRNAs. Cancer biology & medicine, 10(3), 131–137. https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.03.002

74. Ogawa, C., Bankoti, R., Nguyen, T., Hassanzadeh-Kiabi, N., Nadeau, S., Porritt, R. A., Couse, M., Fan, X., Dhall, D., Eberl, G., Ohnmacht, C., & Martins, G. A. (2018). Blimp-1 Functions as a Molecular Switch to Prevent Inflammatory Activity in Foxp3^{+}RORγt^{+} Regulatory T Cells. *Cell reports*, *25*(1), 19–28.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.016

75. Barnes, M. J., Griseri, T., Johnson, A. M. F., Young, W., Powrie, F., & Izcue, A. (2012). CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunology, 6*(2), 324–334. doi:10.1038/mi.2012.75

76. Ouyang, W., Liao, W., Luo, C. T., Yin, N., Huse, M., Kim, M. V., & Li, M. O. (2012). *Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function. Nature, 491(*7425), 554–559*.* doi:10.1038/nature11581

77. Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology reports*, *37*(1), 3–9. https://doi.org/10.3892/or.2016.5236

78. Lourenço, E. V., & La Cava, A. (2011). Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity, 44*(1), 33–42. https://doi.org/10.3109/08916931003782155

79. Ma, F., Xu, S., Liu, X., Zhang, Q., Xu, X., Liu, M., Hua, M., Li, N., Yao, H., & Cao, X. (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-*γ*. Nature immunology, 12(9), 861–869. https://doi.org/10.1038/ni.2073

80. Möhnle, P., Schütz, S. V., van der Heide, V., Hübner, M., Luchting, B., Sedlbauer, J., Limbeck, E., Hinske, L. C., Briegel, J., & Kreth, S. (2015). MicroRNA-146a controls Th1-cell differentiation of human CD4+ T lymphocytes by targeting PRKCε. European journal of immunology, 45(1), 260–272. https://doi.org/10.1002/eji.201444667

81. Thiele, S., Wittmann, J., Hans-Martin, J., & Pahl, A. (2012). miR-9 enhances IL-2 production in activated human CD4+ T cells by repressing Blimp-1. *European Journal of Immunology, 42*(8). doi:10.1002/eji.201142203

82. Haftmann, C., Stittrich, A. B., Zimmermann, J., Fang, Z., Hradilkova, K., Bardua, M., Westendorf, K., Heinz, G. A., Riedel, R., Siede, J., Lehmann, K., Weinberger, E. E., Zimmel, D., Lauer, U., Häupl, T., Sieper, J., Backhaus, M., Neumann, C., Hoffmann, U., Porstner, M., & Mashreghi, M. F. (2015). miR-148a

is upregulated by Twist1 and T-bet and promotes Th1-cell survival by regulating the proapoptotic gene Bim. *European journal of immunology, 45*(4), 1192–1205. https://doi.org/10.1002/eji.201444633

83. Kärner, J., Wawrzyniak, M., Tankov, S., Runnel, T., Aints, A., Kisand, K., Altraja, A., Kingo, K., Akdis, C. A., Akdis, M., & Rebane, A. (2017). Increased microRNA-323-3p in IL-22/IL-17-producing T cells and asthma: a role in the regulation of the TGF-*β* pathway and IL-22 production. *Allergy, 72*(1), 55–65. https://doi.org/10.1111/all.12907
84. Yao, R., Ma, Y. L., Liang, W., Li, H. H., Ma, Z. J., Yu, X., & Liao, Y. H. (2012). MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PloS one, 7*(10), e46082. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046082

85. Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., & Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4+Foxp3+regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 17*(2), 252–264. doi:10.1111/jcmm.12003

86. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., & Ochs, H. D. (2001*). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nature Genetics, 27(1), 20–21.* doi:10.1038/83713

87. Kondo, K., Ohigashi, I., & Takahama, Y. (2019). Thymus machinery for T-cell selection. *International immunology*, *31*(3), 119–125. https://doi.org/10.1093/intimm/dxy081

88. Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine, 278*(4), 369–395. https://doi.org/10.1111/joim.12395

89. Li, W., Deng, C., Yang, H., & Wang, G. (2019). The Regulatory T Cell in Active Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology, 10*, 159. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00159

90. Ma, J., Yu, J., Tao, X., Cai, L., Wang, J., & Zheng, S. G. (2010). The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4+ T cells in lupus patients. *Clinical rheumatology*, *29*(11), 1251–1258. https://doi.org/10.1007/s10067-010-1510-7

91. Cheng, J., Wu, R., Long, L., Su, J., Liu, J., Wu, X. D., Zhu, J., & Zhou, B. (2017). miRNA-451a Targets IFN Regulatory Factor 8 for the Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Inflammation, 40*(2), 676–687. https://doi.org/10.1007/s10753-017-0514-8

92. Sun, H., Guo, F., & Xu, L. (2020). Downregulation of microRNA-101-3p participates in systemic lupus erythematosus progression via negatively

regulating HDAC9. *Journal of cellular biochemistry, 121*(10), 4310–4320. https://doi.org/10.1002/jcb.29624

93. Liu, L., Liu, Y., Yuan, M., Xu, L, Sun, H. (2017). Elevated expression of microRNA-873 facilitates Th17 differentiation by targeting forkhead box O1 (Foxo1) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.075

94. Geng, L., Tang, X., Wang, S., Sun, Y., Wang, D., Tsao, B. P., Feng, X., & Sun, L. (2020). Reduced Let-7f in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Triggers Treg/Th17 Imbalance in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*, *11*, 233. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00233

95. Pang, B., Zhen, Y., Hu, C., Ma, Z., Lin, S., & Yi, H. (2020). Myeloid-derived suppressor cells shift Th17/Treg ratio and promote systemic lupus erythematosus progression through arginase-1/miR-322-5p/TGF-*β* pathway. *Clinical science, 134*(16), 2209–2222. https://doi.org/10.1042/CS20200799

96. Xie, M., Wang, J., Gong, W., Xu, H., Pan, X., Chen, Y., & Shao, Q. (2019). NF-κB-driven miR-34a impairs Treg/Th17 balance via targeting Foxp3. *Journal of Autoimmunity.* doi:10.1016/j.jaut.2019.04.018

97. Pan, W., Zhu, S., Yuan, M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y., & Shen, N. (2010). MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *Journal of immunology, 184*(12), 6773–6781. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904060

98. Morita, T., Shima, Y., Wing, J. B., Sakaguchi, S., Ogata, A., & Kumanogoh, A. (2016). The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PloS one, 11*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162306

99. Tang, X., Yin, K., Zhu, H., Tian, J., Shen, D., Yi, L., Rui, K., Ma, J., Xu, H., & Wang, S. (2016). Correlation Between the Expression of MicroRNA-301a-3p and the Proportion of Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Inflammation, 39*(2), 759–767. https://doi.org/10.1007/s10753-016-0304-8

100. Xia, Z., Meng, F., Liu, Y., Fang, Y., Wu, X., Zhang, C., Liu, D., & Li, G. (2018). Decreased MiR-128-3p alleviates the progression of rheumatoid arthritis by up-regulating the expression of TNFAIP3. *Bioscience reports*, *38*(4), BSR20180540. https://doi.org/10.1042/BSR20180540

101. Xiang, H. Y., Pan, F., Yan, J. Z., Hong, L. Q., Zhang, L. H., Liu, Y. H., Feng, X., & Cai, C. S. (2018). [Upregulation of miR-498 suppresses Th17 cell differentiation by targeting STAT3 in rheumatoid arthritis patients]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*, *70*(2), 167–174.

102. Wang, L., Wang, C., Jia, X., & Yu, J. (2018). Circulating Exosomal miR-17 Inhibits the Induction of Regulatory T Cells via Suppressing TGFBR II

Expression in Rheumatoid Arthritis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *50*(5), 1754–1763. https://doi.org/10.1159/000494793

103. Deng, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2016). The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. Clinical reviews in allergy & immunology, 50(3), 377–389. https://doi.org/10.1007/s12016-016-8535-x

104. Ni, X., & Lai, Y. (2020). Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis?. *Journal of Leukocyte Biology.* doi:10.1002/jlb.5mr0120-439r

105. Fu, D., Yu, W., Li, M., Wang, H., Liu, D., Song, X., & Tian, Z. (2015). MicroRNA-138 regulates the balance of Th1/Th2 via targeting RUNX3 in psoriasis. *Immunology Letters, 166*(1), 55-62. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.014

106. Xiao-Ping, H., Qian, X., Chao-Feng, C., Wei, Z., Bo, Y. (2017). Let-7a Inhibits T-Cell Proliferation and IFN-γ Secretion by Down-Regulating STAT3 Expression in Patients with Psoriasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 115–125. doi:10.1159/000477120

107. Wu, R., Zeng, J., Yuan, J., Deng, X., Huang, Y., Chen, L., Zhang, P., Feng, H., Liu, Z., Wang, Z., Gao, X., Wu, H., Wang, H., Su, Y., Zhao, M., & Lu, Q. (2018). MicroRNA-210 overexpression promotes psoriasis-like inflammation by inducing Th1 and Th17 cell differentiation. The Journal of clinical investigation, 128(6), 2551–2568. https://doi.org/10.1172/JCI97426

108. Bian, J., Liu, R., Fan, T., Liao, L., Wang, S., Geng, W., Wang, T., Shi, W., & Ruan, Q. (2018). miR-340 Alleviates Psoriasis in Mice through Direct Targeting of IL-17A. *Journal of immunology, 201*(5), 1412–1420. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800189

109. Lee, S. H., Kwon, J. E., & Cho, M. L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal research, 16*(1), 26–42. https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.1.26

110. Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews*, *13*(1), 3–10. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004

111. Shi, Y., Dai, S., Qiu, C., Wang, T., Zhou, Y., Xue, C., Yao, J., & Xu, Y. (2020). MicroRNA-219a-5p suppresses intestinal inflammation through inhibiting Th1/Th17-mediated immune responses in inflammatory bowel disease. *Mucosal immunology, 13*(2), 303–312. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0216-7

112. Ge, Y., Sun, M., Wu, W., Ma, C., Zhang, C., He, C., Li, J., Cong, Y., Zhang, D., & Liu, Z. (2019). MicroRNA-125a suppresses intestinal mucosal

inflammation through targeting ETS-1 in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of autoimmunity, 101*, 109–120. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.014

113. Yang, X., He, Q., Guo, Z., Xiong, F., Li, Y., Pan, Y., Gao, C., Li, L., & He, C. (2018). MicroRNA-425 facilitates pathogenic Th17 cell differentiation by targeting forkhead box O1 (Foxo1) and is associated with inflammatory bowel disease. *Biochemical and biophysical research communications, 496*(2), 352–358. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.055

114. Pei, X. F., Cao, L. L., Huang, F., Qiao, X., Yu, J., Ye, H., Xi, C. L., Zhou, Q. C., Zhang, G. F., & Gong, Z. L. (2018). Role of miR-22 in intestinal mucosa tissues and peripheral blood CD4+ T cells of inflammatory bowel disease. *Pathology, research and practice, 214*(8), 1095–1104. https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.04.009

115. Sanctuary, M. R., Huang, R. H., Jones, A. A., Luck, M. E., Aherne, C. M., Jedlicka, P., de Zoeten, E. F., & Collins, C. B. (2019). miR-106a deficiency attenuates inflammation in murine IBD models. *Mucosal immunology, 12*(1), 200–211. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0091-7

116. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*, *378*(2), 169–180. https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483

117. Li, Y. F., Zhang, S. X., Ma, X. W., Xue, Y. L., Gao, C., Li, X. Y., & Xu, A. D. (2019). The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Multiple sclerosis and related disorders, 28*, 75–80. https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.12.019

118. Glatigny, S., & Bettelli, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *8*(11), a028977. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028977

119. Guan, H., Singh, U. P., Rao, R., Mrelashvili, D., Sen, S., Hao, H., Zumbrun, E. E., Singh, N. P., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2016). Inverse correlation of expression of microRNA-140-5p with progression of multiple sclerosis and differentiation of encephalitogenic T helper type 1 cells. *Immunology, 147*(4), 488–498. https://doi.org/10.1111/imm.12583

120. Rezaei, N., Talebi, F., Ghorbani, S., Rezaei, A., Esmaeili, A., Noorbakhsh, F., & Hakemi, M. G. (2019). MicroRNA-92a Drives Th1 Responses in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation, 42*(1), 235–245. https://doi.org/10.1007/s10753-018-0887-3

121. Qu, X., Zhou, J., Wang, T., Han, J., Ma, L., Yu, H., Geng, D., Fan, H., Zhang, Q., Hua, F., & Yao, R. (2016). MiR-30a inhibits Th17 differentiation and demyelination of EAE mice by targeting the IL-21R. *Brain, behavior, and immunity*, *57*, 193–199. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.016

122. Liu, R., Ma, X., Chen, L., Yang, Y., Zeng, Y., Gao, J., Jiang, W., Zhang, F., Li, D., Han, B., Han, R., Qiu, R., Huang, W., Wang, Y., & Hao, J. (2017). MicroRNA-15b Suppresses Th17 Differentiation and Is Associated with Pathogenesis of Multiple Sclerosis by Targeting *O*-GlcNAc Transferase. *Journal of immunology*, *198*(7), 2626–2639. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601727

123. Liu, Q., Gao, Q., Zhang, Y., Li, Z., & Mei, X. (2017). MicroRNA-590 promotes pathogenic Th17 cell differentiation through targeting Tob1 and is associated with multiple sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*, *493*(2), 901–908. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.123

124. Wu, R., He, Q., Chen, H., Xu, M., Zhao, N., Xiao, Y., Tu, Q. Q., Zhang, W., & Bi, X. (2017). MicroRNA-448 promotes multiple sclerosis development through induction of Th17 response through targeting protein tyrosine phosphatase non-recetor type 2 (PTPN2). *Biochemical and biophysical research communications*, *486*(3), 759–766. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.115

125. Ahmadian-Elmi, M., Bidmeshki Pour, A., Naghavian, R., Ghaedi, K., Tanhaei, S., Izadi, T., & Nasr-Esfahani, M. H. (2016). miR-27a and miR-214 exert opposite regulatory roles in Th17 differentiation via mediating different signaling pathways in peripheral blood CD4+ T lymphocytes of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunogenetics*, *68*(1), 43–54. https://doi.org/10.1007/s00251-015-0881-y

126. Zhu, E., Wang, X., Zheng, B., Wang, Q., Hao, J., Chen, S., Zhao, Q., Zhao, L., Wu, Z., & Yin, Z. (2014). miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting RORγt and STAT3. *Journal of immunology*, *192*(12), 5599–5609. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303488

127. Murugaiyan, G., Cunha, A. P., Ajay, A. K., Joller, N., Garo, L. P., Kumaradevan, S., Yosef, N., Vaidya, V. S., & Weiner, H. L. (2015). MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation, 125*(3), 1069–1080. https://doi.org/10.1172/JCI74347

128. Wang, L., Qiu, R., Zhang, Z., Han, Z., Yao, C., Hou, G., Dai, D., Jin, W., Tang, Y., Yu, X., & Shen, N. (2020). The MicroRNA *miR*-22 Represses Th17 Cell Pathogenicity by Targeting PTEN-Regulated Pathways. *ImmunoHorizons*, *4*(6), 308–318. https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2000008

129. Wan, C., Ping, C. Y., Shang, X. Y., Tian, J. T., Zhao, S. H., Li, L., Fang, S. H., Sun, W., Zhao, Y. F., Li, Z. Y., Xu, Y. W., Mu, L. L., Wang, J. H., Kong, Q. F., Wang, G. Y., Li, H. L., & Sun, B. (2016). MicroRNA 182 inhibits $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ Treg differentiation in experimental autoimmune

encephalomyelitis. *Clinical immunology*, *173*, 109–116. https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.008

130. Guan, H., Fan, D., Mrelashvili, D., Hao, H., Singh, N. P., Singh, U. P., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2013). MicroRNA let-7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*, *43*(1), 104–114. https://doi.org/10.1002/eji.201242702

131. Talebi, F., Ghorbani, S., Chan, W. F., Boghozian, R., Masoumi, F., Ghasemi, S., Vojgani, M., Power, C., & Noorbakhsh, F. (2017). MicroRNA-142 regulates inflammation and T cell differentiation in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, *14*(1), 55. https://doi.org/10.1186/s12974-017-0832-7

132. Hosseini, A., Ghaedi, K., Tanhaei, S., Ganjalikhani-Hakemi, M., Teimuri, S., Etemadifar, M., & Nasr Esfahani, M. H. (2016). Upregulation of CD4+T-Cell Derived MiR-223 in The Relapsing Phase of Multiple Sclerosis Patients. *Cell journal*, *18*(3), 371–380. https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4565

133. Rose N. R. (2016). Prediction and Prevention of Autoimmune Disease in the 21st Century: A Review and Preview. *American journal of epidemiology, 183*(5), 403–406. https://doi.org/10.1093/aje/kwv292

134. Sabre, L., Punga, T., & Punga, A. R. (2020). Circulating miRNAs as Potential Biomarkers in Myasthenia Gravis: Tools for Personalized Medicine. *Frontiers in immunology*, *11*, 213. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00213

135. Amr, K. S., Bayoumi, F. S., Elgengehy, F. T., Abdallah, S. O., Ahmed, H. H., & Eissa, E. (2016). The role of microRNA-31 and microRNA-21 as regulatory bio-markers in the activation of T lymphocytes of Egyptian lupus patients. *Rheumatology international, 36*(11), 1617–1625. https://doi.org/10.1007/s00296-016-3550-z

136. Garchow, B., Maque Acosta, Y., & Kiriakidou, M. (2021). HIF-1α and miR-210 differential and lineage-specific expression in systemic lupus erythematosus. *Molecular immunology*, *133*, 128–134. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.019

137. Wu, Y. H., Liu, W., Xue, B., Zhang, L., Liu, X. Y., Liu, B., Wang, Y., Cai, Y., & Duan, R. (2016). Upregulated Expression of microRNA-16 Correlates with Th17/Treg Cell Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis. *DNA and cell biology, 35*(12), 853–860. https://doi.org/10.1089/dna.2016.3349

138. Yang, P., Zhang, M., Wang, X., Xu, A. L., Shen, M., Jiang, B., Zhou, X., & Zhou, L. (2020). MicroRNA let-7g-5p alleviates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 cell differentiation. *Biochemical pharmacology*, *174*, 113822. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113822

139. Wang, X., Chen, X., Li, J., Zhang, H., Liu, J., & Sun, L. (2017). MiR-200a expression in CD4+ T cells correlates with the expression of Th17/Treg cells

and relevant cytokines in psoriasis vulgaris: A case control study. *Biomedicine & Pharmacotherapy. 93,* 1158-1164. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.055

140. Ichihara, A., Jinnin, M., Oyama, R., Yamane, K., Fujisawa, A., Sakai, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Maruo, K., & Ihn, H. (2012). Increased serum levels of miR-1266 in patients with psoriasis vulgaris. *European journal of dermatology : EJD*, *22*(1), 68–71. https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1600

141. Wohnhaas, C. T., Schmid, R., Rolser, M., Kaaru, E., Langgartner, D., Rieber, K., Strobel, B., Eisele, C., Wiech, F., Jakob, I., Gantner, F., Herichova, I., Vinisko, R., Böcher, W. O., Visvanathan, S., Shen, F., Panzenbeck, M., Raymond, E., Reber, S. O., Delić, D., & Baum, P. (2020). Fecal MicroRNAs Show Promise as Noninvasive Crohn's Disease Biomarkers. *Crohn's & colitis 360*, *2*(1), otaa003. https://doi.org/10.1093/crocol/otaa003

142. Mahmoud, F. M., ElSheshtawy, N. M., Zaki, W. K., Zamzam, D. M., & Fahim, N. M. (2017). MicroRNA 26a Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Correlation with Serum Interleukin-17 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *The Egyptian journal of immunology*, *24*(2), 71–82.

143. Raphael, I., Joern, R. R., & Forsthuber, T. G. (2020). Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. Cells, 9(3), 531. https://doi.org/10.3390/cells9030531

144. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). $CD4^+$T cells: differentiation and functions. Clinical & developmental immunology, 2012, 925135. https://doi.org/10.1155/2012/925135

145. Maul, J., Alterauge, D., & Baumjohann, D. (2019). Micro RNA -mediated regulation of T follicular helper and T follicular regulatory cell identity. *Immunological Reviews, 288*(1), 97–111. doi:10.1111/imr.12735

146. Abdellatif M. (2012). Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circulation research*, *110*(4), 638–650. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247437

147. Du, J., Yang, S., An, D., Hu, F., Yuan, W., Zhai, C., & Zhu, T. (2009). BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing δEF1 and AP-1. *Cell Research, 19(4), 487–496.* doi:10.1038/cr.2009.34

148. Li, J. Q., Hu, S. Y., Wang, Z. Y., Lin, J., Jian, S., Dong, Y. C., Wu, X. F., Dai-Lan, & Cao, L. J. (2016). Long non-coding RNA MEG3 inhibits microRNA-125a-5p expression and induces immune imbalance of Treg/Th17 in immune thrombocytopenic purpura. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *83*, 905–911. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.057

149. Li, D., Kong, C., Tsun, A., Chen, C., Song, H., Shi, G., & Li, B. (2015). MiR-125a-5p Decreases the Sensitivity of Treg cells Toward IL-6-Mediated

Conversion by Inhibiting IL-6R and STAT3 Expression. *Scientific Reports, 5, 14615.* doi:10.1038/srep14615

150. Singh, Y., Garden, O. A., Lang, F., & Cobb, B. S. (2015). MicroRNA-15b/16 Enhances the Induction of Regulatory T Cells by Regulating the Expression of Rictor and mTOR. *Journal of immunology*, *195*(12), 5667–5677. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401875

151. Wei, Y., Chen, S., Sun, D., Li, X., Wei, R., Li, X., & Nian, H. (2019). miR-223-3p promotes autoreactive T_h17 cell responses in experimental autoimmune uveitis (EAU) by inhibiting transcription factor FOXO3 expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(12), 13951–13965. https://doi.org/10.1096/fj.201901446R

152. Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell metabolism*, *30*(4), 656–673. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011

153. Lawrie, C. H., Soneji, S., Marafioti, T., Cooper, C. D., Palazzo, S., Paterson, J. C., Cattan, H., Enver, T., Mager, R., Boultwood, J., Wainscoat, J. S., & Hatton, C. S. (2007). MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *International journal of cancer*, *121*(5), 1156–1161. https://doi.org/10.1002/ijc.22800

154. Wang, G., Kwan, B. C., Lai, F. M., Chow, K. M., Li, P. K., & Szeto, C. C. (2012). Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis. *American journal of nephrology*, *36*(5), 412–418. https://doi.org/10.1159/000343452

155. Rot, U., Sandelius, Å., Emeršič, A., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2018). Cerebrospinal fluid GAP-43 in early multiple sclerosis. *Multiple sclerosis journal - experimental, translational and clinical*, *4*(3), 2055217318792931. https://doi.org/10.1177/2055217318792931

156. Kramer, S., Haghikia, A., Bang, C., Scherf, K., Pfanne, A., Duscha, A., Kaisler, J., Gisevius, B., Gold, R., Thum, T., & Haghikia, A. (2019). Elevated levels of miR-181c and miR-633 in the CSF of patients with MS: A validation study. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, *6*(6), e623. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000623

157. Venkatesha, S. H., Dudics, S., Song, Y., Mahurkar, A., & Moudgil, K. D. (2018). The miRNA Expression Profile of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reveals Novel Potential Disease Biomarkers. *International journal of molecular sciences*, *19*(12), 3990. https://doi.org/10.3390/ijms19123990

158. Kraus V. B. (2018). Biomarkers as drug development tools: discovery, validation, qualification and use. *Nature reviews. Rheumatology*, *14*(6), 354–362. https://doi.org/10.1038/s41584-018-0005-9

159. Zhang, L., Wu, H., Zhao, M., Chang, C., & Lu, Q. (2020). Clinical significance of miRNAs in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, *109*, 102438. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102438

160. Wahid, F., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2014). MicroRNA and diseases: therapeutic potential as new generation of drugs. *Biochimie*, *104*, 12–26. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.05.004

161. Giri, B. R., & Cheng, G. (2019). *MicroRNAs, T-cell immunity and immunotherapy. Future Medicinal Chemistry, 11(16), 2043–2045.* doi:10.4155/fmc-2019-0145

162. Sun, P., Liu, D. Z., Jickling, G. C., Sharp, F. R., & Yin, K. J. (2018). MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *38*(7), 1125–1148. https://doi.org/10.1177/0271678X18773871

7. Anexo

7.1 Descrição das técnicas de identificação e quantificação dos fatores reguladores da diferenciação de células T CD4+

7.1.1 RT-qPCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais comuns para a amplificação e identificação de material genético presente em amostras biológicas, podendo também ser usada para detetar níveis de expressão de transcritos quando antecedida por síntese de cDNA a partir do RNA extraído. A enzima utilizada é a transcriptase reversa, capaz de sintetizar cDNA a partir de mRNAs e miRNAs. Cada reação PCR é constituída por vários ciclos de 3 fases, a desnaturação, emparelhamento de primers e síndese de uma nova cadeia pela Taq polimerase[1]. A quantidade de transcritos/DNA pode ser quantificada na técnica de PCR em tempo real em que se utilizam corantes fluorescentes inespecíficos (ex. Sybr Green) ou Sondas específicas (ex. sondas TaqMan) para detetar o DNA amplificado. O Sybr Green, quando intercalado numa cadeia dupla, recém sintetizada, emite fluorescência que é então diretamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. No

caso das Sondas Taqman, estas são compostas por por um *quencher* e um fluoróforo. Na ausência de amplificação, a proximidade entre estas duas moléculas impede a emissão de fluorescência. Contudo, quando existe amplificação, mediada pela TaqMan, há clivagem da sonda, possibilitando assim a emissão de fluorescência e detecção de sinal que é proporcional à quantidade de DNA/cDNA presente na amostra. Assim, as cadeias são quantificadas, com base na absorvância emitida pela amostra. O valor do ciclo CT (cycle treshold) definirá se a quantidade de transcrito presente é elevada ou baixa, sendo que um menor CT corresponde a um transcrito mais abundante e um maior CT a um gene/transcrito menos abundante numa determinada amostra biológica[2.]

7.1.2 ChIP-seq

A imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciação em larga escala, ou ChIP-Seq, é uma técnica que determina locais de ligação de proteínas ao DNA, permitindo identificar genes que se ligam a fatores de transcrição ou genes que se ligam a histonas modificadas, por exemplo, dependendo do anticorpo usado na imunoprecipitação. Corresponde a um método de estudo da regulação da expressão génica e dos mecanismos genéticos e/ou epigenéticos[3]. Vários artigos usam este método para comparar padrões de modificações de cromatina entre indivíduos saudáveis e indivíduos doentes[4]. As abordagens existentes para investigar o epigenoma são inerentemente tendenciosas, dado que as mesmas exigem sondas derivadas de sequências conhecidas. Como é o caso das técnicas de análise da metilação do DNA. Ao se averiguar, por exemplo, uma diferença nos níveis de metilação das histonas, torna-se possível propor uma associação entre genes que se encontrem potencialmente ativos ou inativos, a nível transcricional. Uma técnica comum envolve o uso do bissulfito de sódio para a conversão de resíduos de citosina não metilados em uracilo, enquanto as citosinas metiladas que não passam por essa modificação são posteriormente identificadas por técnicas de sequenciação[5].

A técnica ChIP-Seq não requer esse conhecimento prévio. Inicialmente, durante o procedimento, realiza-se uma fixação por formaldeído, de forma manter as proteínas presentes ligadas à cadeia de DNA. Este é fragmentado, através da ultra-sonografia ou, preferencialmente, por meio endonucleases. Em seguida, as proteínas que se ligam ao DNA são precipitadas, por meio de anticorpos. Posteriormente, os complexos formados são separados por eletroforese em gel de agarose[6]. Desta forma, os

nucleótidos que não se encontram associados a proteínas são separados da cadeia de DNA. Este processo de purificação pode ser otimizado pela aplicação de um campo eletromagnético que gera uma diferença de potencial no gel de agarose que possibilita a migração dos complexos formados, num sentido determinado pela carga do marcador conjugado ao anticorpo[7]. Posteriormente, torna-se necessário separar as mesmas da cadeia de DNA. Tal pode ser alcançado por um extenso período de incubação, ou por meio de uma solução salina (como o NaCl). O produto final, correspondente à cadeia de DNA, a ser sequenciada, por meio de tecnologias *High-throughput*[8]. A técnica permite determinar mecanismos reguladores da diferenciação de linfócitos T CD4+. Por exemplo, um estudo feito em células Treg determinou, através da técnica ChIP-Seq, que o fator Foxp3 reprime a expressão dos fatores AML1 e Runz1 que promovem a proliferação de células Th1[9].

7.1.3 Sequenciação de mRNA e “small-RNA” em larga escala

A sequenciação de mRNA/”small” RNA ou RNA-seq consiste num método de análise da expressão diferencial de transcriptomas de RNAs mensageiros ou pequenos RNAs em vários contextos, incluindo, tipos de células diferentes, mesmo tipo de células em contextos diferentes, como situações fisiológicas versus situações de doenças, entre outros[10]. No presente trabalho, utilizou-se esta metodologia em vários contextos, entre os quais o modelo animal de EAE para análise da expressão de assinaturas moleculares de células Th1, Th17 e Treg. Outro exemplo, consiste num ensaio clínico feito em pacientes com LES, em que através da sequenciação bissulfito, foram determinados os genes em que se observa um menor grau de metilação, justificando o perfil de expressão significativamente alterado em células T CD4+[11].

A técnica RNA-seq divide-se em 3 fases principais. Inicia-se pela preparação da amostra biológica, em que se realiza a extração dos RNAs presentes na mesma. Em seguida, estes são separados daqueles que não constituem o objeto de estudo, tratando -se frequentemente de RNA ribossomal e RNA de transferência. Na segunda fase, ocorre a síntese de DNA complementar às cadeias de mRNA e de miRNA (cDNA), por meio da enzima transcriptase reversa. Este, por usa vez, é posteriormente amplificado por PCR. Sabe-se que para a síntese de cDNA torna-se necessário uma cadeia molde (inicial), cujo comprimento deverá ser superior a 40 nucleótidos. No caso do mRNA, o comprimento de cada cadeia é geralmente superior a 100 nucleótidos, permitindo uma amplificação eficiente. O comprimento das cadeias de miRNA

possuem cerca de 18 a 24 nucleótidos de comprimento. Como tal, o PCR realizado deverá ser adaptado, usando um primer em forma de grampo que se liga à cadeia de miRNA maduro, como referido na descrição da técnica RT-qPCR. Após a ação da transcriptase reversa, forma-se uma cadeia dupla, cuja extremidade 5' possui uma estrutura semelhante a um laço, como verificado nas cadeias de pré-miRNA. Em seguida, ocorre a desnaturação das cadeias a 90º que gera a formação de uma cadeia única (com o dobro do comprimento). Para a amplificação torna-se necessário um primer que se liga à extremidade 3' e uma sonda de hidrólise, como a TaqMan que permite a deteção da cadeia, através do fluoróforo associado. Na fase final, é feita a preparação de bibliotecas de cDNA que consistem em combinações de fragmentos de cDNA amplificados inseridos em células de uma amostra, em que as espécies de RNA presentes variam em termos de tamanho, sequência e características estruturais. Antes da sequenciação das cadeias, estas encontram-se ligadas a adaptadores moleculares que permitem a sua identificação das mesmas. Tal ocorre com a remoção do grupo fosfato na extremidade 3' da cadeia de RNA fragmentada, em que posteriormente é adicionado o adaptador molecular, através da enzima RNA ligase II. Repetindo-se o mesmo processo na extremidade 5', através da RNA ligase I[12].

Relativamente à sequenciação das bibliotecas de cDNA, a preferência tecnológica varia consoante o objetivo do estudo. A tecnologia *Short-Read* consiste na leitura de cadeias de cDNA até 500 bp, reconhecendo somente fragmentos de RNA. A tecnologia *Long-Read*, cuja sequenciação permite a leitura de cadeias de cDNA entre 1000bp e 5000 bp, possibilita o reconhecimento de cadeias de RNAs inteiras ou quase completas. Uma leitura *Long-Read*, embora menos rápida, supera algumas desvantagens existentes na tecnologia *Short-Read*. Por exemplo, a diminuição do risco do surgimento de um viés associado à presença de isoformas do gene, que correspondem a transcritos gerados, a partir do mesmo *Locus*, que são distintos. Sabe-se que mais de 90% dos genes humanos possuem duas ou mais isoformas distintas. Tal deve-se aos processos de *Splicing* alternativo e da regulação génica associada à transcrição da região não codificante, em que destacam os miRNAs[13]. Sabe-se que cerca de 95% dos artigos publicados que realizam leituras *Short-Read* utilizam a tecnologia de sequenciação *Illumina* (a partir da qual se obteve o perfil de expressão dos genes analisados no modelo EAE da secção dos resultados), em que o material genético, após ser fragmentado, é inserido em células de fluxo que consistem em compartimentos que possuem sondas complementares às cadeias de cDNA presentes na amostra, que flui continuamente, permitindo a sequenciação das

mesmas. Cada sonda possui 4 fluoróforos diferentes, para distinguir cada nucleótido. Após a ligação da sonda a uma das extremidades do cDNA, ocorre a síntese de nova cadeia nucleotídica, com base na complementaridade de bases, por meio da DNA polimerase. Desta forma, a sequenciação é feita conforme a fluorescência emitida. No caso das leituras *Long-Read*, é frequente o uso das tecnologias de sequenciação *Pacific Biosciences* (PacBio) e *Oxford Nanopore* (ONT)[14].

7.1.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar o perfil de expressão de proteínas presentes na superfície celular e no meio intracelular, permitindo a caracterização individual de diferentes células numa população heterogéneas. Permite também avaliar o tamanho e volume das células. A técnica consiste na medição da intensidade, emitida por fluoróforos, que se encontram conjugados a anticorpos, como é o caso do marcador fluorescente *Green Fluorescent Protein* (GFP), entre outros ou recorrendo a corantes com propriedades semelhantes, como é o caso do iodeto de propídio[15].

As proteínas fluorescentes, os corantes fluorescentes e os fluoróforos, de forma geral, revolucionaram o campo da biologia celular molecular. Em particular, pelo surgimento de ensaios multiplex que permitem analisar e quantificar diversas proteínas em amostras biológicas complexas, com base na intensidade emitida pelo fluoróforo utilizado[16].

A amostra celular, previamente preparada com o marcador escolhido, é suspensa em meio líquido, sendo, de seguida, sujeita à incidência de um feixe laser que irá permitir a quantificação das moléculas biológicas de interesse. Após a excitação, cada molécula, suspensa no meio, dispersa o feixe que lhe foi direcionado. São utilizados filtros que direcionam os comprimentos de onda dispersos, após a emissão. Os filtros *Band Pass* (BP) permitem a transmissão de fluoróforos, que possuem num intervalo restrito de comprimento de onda. Os filtros *Short Pass* (SP) possibilitam a passagem de fluoróforos, abaixo de um determinado comprimento. Os filtros *Long Pass*, permitem a passagem de fluoróforos acima do mesmo. É possível também a deteção de fluoróforos através da colocação de sensores no local por onde passa o fluxo, que são designados por tubos fotomultiplicadores (PMTs). Cada um, deteta um intervalo de comprimento de onda específico. Podem-se classificar em *Forward Scatter* (*FSC*), em

que se mede a dispersão na direção do laser, ou *Side Scatter* (*SSC*), em que se mede a dispersão num ângulo de 90º, em relação ao laser. Estes são capazes de converter a energia de fluoróforos em sinais eletrónicos, que possuem uma determinada altura e área. Estes dois parâmetros correlacionam-se diretamente com a quantidade de moléculas-alvo presentes na amostra, permitindo a quantificação da mesma[17].

7.1.5 ELISA

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, ou ELISA, corresponde a uma técnica que permite a identificação e quantificação de antigénios específicos numa placa com vários poços contendo a amostra, através do uso de anticorpos. Estes últimos possuem um marcador enzimático que emite um determinado comprimento de onda, após a formação do complexo anticorpo-antigénio, permitindo assim a quantificação, com base na densidade ótica. Esta técnica é dividida em diferentes categorias, dependendo de como é formado o complexo referido, havendo três variante principais. No ELISA direto, o antigénio é imobilizado em cada poço, posteriormente é aplicado o anticorpo que, por sua vez, já se encontra conjugado com o marcador. No Elisa indireto são utilizados dois anticorpos. O primeiro, designado por anticorpo primário, liga-se ao antigénio presente na amostra, sendo removido o excesso não ligado através de lavagens O segundo possui afinidade pelo anticorpo primário, contendo o marcador enzimático que permite a sua quantificação. No ELISA imunométrico cada poço possui inicialmente anticorpos imobilizados que iram captar o antigénio após a adição da amostra. A primeira lavagem é feita com o objetivo de remover antigénios que não se ligaram aos anticorpos referidos. Posteriormente, são aplicados anticorpos conjugados com o marcador enzimático. Por fim, estes que não se ligaram ao antigénio são removidos por uma segunda lavagem[18]. Um exemplo da aplicação desta técnica consiste na determinação da quantidade das citocinas IL-10 e IL-17A, numa amostra de células CD4+ de origem murina, permitindo assim inferir sobre a regulação da diferenciação das mesmas[19].

7.1.6 Western Blot

O Western Blot é uma técnica de deteção de proteínas, através de anticorpos com afinidade pelas mesmas. O mesmo difere do ensaio ELISA por permitir uma comparação entre a quantidade relativa de diferentes amostras. Estas deverão ser

mantidas a -80ºC, para manter a integridade do conteúdo proteico, devendo o seu descongelamento ser feito dentro do menor tempo possível para evitar uma degradação proteolítica, por meio de proteases endógenas. O isolamento das proteínas alvo ocorre por lise celular, seguido de extração em condições que variam consoante o objeto de estudo e o tipo de tecido. A eficiência da extração pode ser avaliada, consoante a quantidade de proteínas no lisado, existindo diferentes métodos de quantificação, entre os quais, o ensaio de Bradford, cuja leitura poderá ser feita através da absorvância do UV e o ensaio Nanodrop que se baseia no mesmo princípio. Em seguida, as proteínas, previamente desnaturadas com dodecil sulfato de sódio (SDS), são separadas conforme o tamanho, através da eletroforese em gel de poliacriamida (SDS-PAGE), em que é aplicada uma diferença de potencial que possibilita a migração das mesmas. Subsequentemente, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno, através de uma aplicação de corrente elétrica. Para a sua deteção, são utilizados anticorpos primários que se ligam às proteínas-alvo, seguindo-se a detecção com anticorpos secundários conjugados com marcadores enzimáticos que emitem sinais fotométricos[20]. Um estudo feito em 2012 utiliza esta técnica para a deteção de proteínas presentes numa biopsia de baço de murina, envolvidas na produção de IL-17A, permitindo inferir sobre interações entre as mesmas que promovem o fenótipo Th17[21].

7.1.7 Ensaio Luciferase

O ensaio luciferase corresponde a uma técnica em que é usado o gene repórter de luciferase para analisar se determinando miRNA se liga diretamente a um determinado mRNA alvo. Neste modelo de estudo, efetua-se a transfecção de células com um vetor de expressão contendo uma região promotora, o gene que codifica a luciferase e a região 3'UTR de um determinado mRNA. A enzima luciferase catalisa uma reação redox que conduz à emissão de bioluminescência, a partir da energia química do seu substrato – a luciferina. A co-expressão deste vetor de expressão com um vetor contendo o miRNA regulador permitirá identificar se o mesmo se liga diretamente à região 3'UTR de um determinado mRNA através da leitura do sinal de luciferase. Quando este sinal diminuir, significa que há ligação direta de um determinado miRNA ao seu mRNA alvo. Uma mutação na seed sequence do miRNA alvo deverá provocar a reversão do sinal obtido[22].

7.1.8 HITS-CLIP

High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation", HITS-CLIP, ou CLIP-seq, corresponde a uma técnica para a identificação de interações específicas entre proteínas e RNA, assim como o mapeamento dos locais de ligação. A amostra contendo o tecido celular é exposta a radiação UV (mJ/cm^2) que induz a formação de ligações covalentes, designadas por *Crosslinks*, entre proteínas e os mRNAs. Em seguida, ocorre a imunoprecipitação dos complexos formados, por meio de anticorpos. Os complexos proteína-RNA são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de nitrocelulose como no *Western Blot*, migrando conforme a massa dos mesmos. Posteriormente, as ligações *Crosslink* são destruídas, por meio de enzimas digestivas, entre as quais a proteinase K. Tal poderá ocorrer, no gel utilizado na eletroforese, ou, a partir da membrana de nitrocelulose[23]. Por meio da técnica de RT-qPCR, as cadeias referidas são convertidas em DNA complementar, por ação da enzima transcriptase reversa. Os transcritos presentes são quantificados, posteriormente, por RNA-seq como anteriormente descrito[24].

7.1.9 Referências Bibliográficas dos Métodos

1. Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in biotechnology*, *37*(7), 761–774. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002 **Error! Reference source not found.**
2. Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods (San Diego, Calif.)*, *44*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006
3. Park P. J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature reviews*. *Genetics, 10*(10), 669–680. https://doi.org/10.1038/nrg2641
4. Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell, 128*(4), 669–681. doi:10.1016/j.cell.2007.01.033
5. Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2018). Epigenomics: Technologies and Applications. *Circulation research, 122*(9), 1191–1199. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310998
6. Isono, M., & Hashimoto, S. (2020). DNA Fragment Agarose Gel Electrophoresis for Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2119*, 201–211. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0323-9_17

7. Belyaev, I. Y., & Harms-Ringdahl, M. (2002). A simple and sensitive pulsed field gel electrophoresis protocol to study 50 kb apoptotic DNA fragmentation in human lymphocytes. *Radiatsionnaia biologiia, radioecologia, 42*(3), 279–283.

8. Furey T. S. (2012). ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature reviews. Genetics, 13*(12), 840–852. https://doi.org/10.1038/nrg3306

9. Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T., & Sakaguchi, S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature, 446*(7136), 685–689. https://doi.org/10.1038/nature05673

10. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature reviews. *Genetics, 10*(1), 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

11. Sun, H., Guo, F., & Xu, L. (2020). Downregulation of microRNA-101-3p participates in systemic lupus erythematosus progression via negatively regulating HDAC9. *Journal of cellular biochemistry, 121*(10), 4310–4320. https://doi.org/10.1002/jcb.29624

12. Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley interdisciplinary* reviews. RNA, 8(1), 10.1002/wrna.1364. https://doi.org/10.1002/wrna.1364

13. Kramer M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology, 15*, Unit15.10–15.10. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95

14. Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*. doi:10.1038/s41576-019-0150-2

15. Montante, S., & Brinkman, R. R. (2019). Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *International Journal of Laboratory Hematology, 41*(S1), 56–62. doi:10.1111/ijlh.13016

16. Smurthwaite, C. A., Williams, W., Fetsko, A., Abbadessa, D., Stolp, Z. D., Reed, C. W., Dharmawan, A., & Wolkowicz, R. (2015). Genetic barcoding with fluorescent proteins for multiplexed applications. *Journal of visualized experiments,* (98), 52452. https://doi.org/10.3791/52452

17. Black, C. B., Duensing, T. D., Trinkle, L. S., & Dunlay, R. T. (2011). Cell-based screening using high-throughput flow cytometry. *Assay and drug development technologies, 9*(1), 13–20. https://doi.org/10.1089/adt.2010.0308

18. Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. British Journal of Hospital Medicine, 77(7), C98–C101. doi:10.12968/hmed.2016.77.7.c98

19. Ma, J., Yu, J., Tao, X., Cai, L., Wang, J., & Zheng, S. G. (2010). The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4+ T cells in lupus patients. *Clinical rheumatology, 29*(11), 1251–1258. https://doi.org/10.1007/s10067-010-1510-7

20. Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. BioMed research international, 361590. https://doi.org/10.1155/2014/361590

21. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). $CD4^+$T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology, 2012*, 925135. https://doi.org/10.1155/2012/925135

22. Nair, A. K., & Baier, L. J. (2018). Using Luciferase Reporter Assays to Identify Functional Variants at Disease-Associated Loci. *Disease Gene Identification*, 303–319. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9_17

23. Bieniasz, P. D., & Kutluay, S. B. (2018). CLIP-related methodologies and their application to retrovirology. *Retrovirology, 15*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0417-2

24. Darnell R. B. (2010). HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. Wiley interdisciplinary reviews. *RNA, 1*(2), 266–286. https://doi.org/10.1002/wrna.31