



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LIA FURLANETO MAREGA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS MIR-146a E MIR-21 E
SUAS FITAS PASSAGEIRAS NA SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVA
AUTOIMUNE ASSOCIADA COM MUTAÇÃO EM *FAS*

CAMPINAS
2016

LIA FURLANETO MAREGA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS MIR-146a E MIR-21 E SUAS FITAS PASSAGEIRAS
NA SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVA AUTOIMUNE ASSOCIADA COM
MUTAÇÃO EM *FAS*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ananias Teocchi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LIA FURLANETO MAREGA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA.

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/06194-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M334e Marega, Lia Furlaneto, 1991-
Estudo da expressão dos microRNAs miR146a e miR-21 e suas fitas passageiras na síndrome linfoproliferativa autoimune com mutação em *FAS* / Lia Furlaneto Marega. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela.

Coorientador: Marcelo Ananias Teocchi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Apoptose. 2. Linfoma. 3. MicroRNAs. 4. Regulação da expressão gênica. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos, 1947-. II. Teocchi, Marcelo Ananias, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the expression of miR-146a and miR-21 microRNAs and their passenger strands in autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with *FAS* mutation

Palavras-chave em inglês:

Apoptosis

Lymphoma

MicroRNAs

Gene expression regulation

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Maria Marluce dos Santos Vilela [Orientador]

Dewton de Moraes Vasconcelos

Karin Juliane Pelizzaro Rocha

Data de defesa: 21-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LIA FURLANETO MAREGA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). MARCELO ANANIAS TEOCCHI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

2. PROF(A). DR(A). DEWTON DE MORAES VASCONCELOS

3. PROF(A). DR(A). KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 21 de janeiro de 2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Enrico e Cristina, que me incentivaram e contribuíram muito para que todas as etapas deste trabalho fossem concretizadas com sucesso. E as minhas irmãs Nina e Laís, pela alegria que me trazem diariamente, mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela pela oportunidade, confiança e por compartilhar sua sabedoria e experiência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Ananias Teocchi pela paciência, pelo grande empenho em ajudar, pelo companheirismo, amizade, risadas...

À FAPESP pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de estudos.

Aos pacientes e familiares pela disponibilidade em contribuir com este estudo.

Ao programa de pós – graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

Ao Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas e a todos os seus profissionais pela contribuição a esta pesquisa.

Ao CIPED, pelo apoio e por toda estrutura oferecida para a realização do trabalho.

Aos amigos do CIPED, pelo apoio e contribuição.

Amigos e amigas do Laboratório de Imunologia Pediátrica pela convivência e amizade.

À Silvana, enfermeira do CIPED.

Ao Laboratório Multiusuário da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD).

Aos meus pais, Enrico e Cristina.

Aos meus avós Eloísa, Marília e Ivo.

Às minhas irmãs Nina e Laís.

Ao meu tio Paulo.

RESUMO

A síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS) é a primeira doença humana, cuja etiologia é atribuída a um defeito primário em apoptose. Esta doença é caracterizada por linfoproliferação não maligna, manifestações autoimunes, hipergamaglobulinemia, expansão de linfócitos T CD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8-, conhecido como células T duplo negativa, e risco aumentado de linfoma. Na maioria dos casos, pacientes com ALPS possuem um defeito genético herdado envolvendo genes relacionados com a apoptose da via do receptor de morte FAS. MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs reguladores, não codificadores de proteína, que possuem um papel no controle da expressão gênica. Este é o primeiro estudo sobre miRNA em pacientes com ALPS. O objetivo foi analisar a expressão de miR-21 e miR-146a, incluindo as suas respectivas fitas passageiras, em mãe e filho portadores da mesma mutação em *FAS*, mas somente o filho manifestou os sinais e sintomas da doença ALPS-FAS. A expressão relativa dos dois pares de miRNAs foram avaliadas por PCR quantitativo (RT-qPCR) em células mononucleadas do sangue periférico para ambos indivíduos. Observou-se que o miR-21-3p foi significativamente hiperexpresso apenas para o filho ($P=0,0313$), sem qualquer alteração significativa na expressão de miR-146a, miR-146a-3p e miR-21. Para a mãe encontramos uma leve hipoexpressão do miR-146a ($P=0,06$). Uma vez que apenas o filho possui as principais manifestações clínicas de ALPS, miR-21-3p deve ser investigado por desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia da ALPS, incluindo o desenvolvimento de linfoma.

Palavras chaves: apoptose.linfoma.miRNAs.regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is the first human disease whose etiology has been attributed to a primary defect in apoptosis. This disorder is characterized by nonmalignant lymphoproliferation, autoimmune manifestations, hypergammaglobulinemia, expansion of CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- lymphocytes (referred to as the double negative T cells) and increased risk of lymphoma. Most cases of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) have an inherited genetic defect involving apoptosis-related genes of the FAS pathway. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding regulatory RNAs playing a role in the control of gene expression. This is the first report on miRNAs in ALPS patients. The aim was to analyze the expression of miR-21 and miR-146a, including their respective passenger strands, in mother and son carrying the same FAS mutation, but only the son manifested the signs and symptoms of ALPS-FAS disease. The relative expression of the two pairs of miRNA was evaluated by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) in peripheral blood mononucleated cells from both patients and healthy control subjects. We observed that miR-21-3p was significantly overexpressed for the son ($P=0.0313$) with no significant change in the expression of miR-146a, miR-146a-3p and miR-21. For the mother we found a slight downregulation of miR-146a ($P=0.06$). Since only the son had the major clinical manifestations of ALPS, miR-21-3p should be investigated as playing a critical role in ALPS physiopathology, including the development of lymphoma.

Key words: *apoptosis.gene expression regulation.lymphoma.microRNAs.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Vias extrínseca e intrínseca de sinalização da apoptose.	18
Figura 1.2 Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs.	23
Figura 4.1 Expressão relativa dos miRNAs.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS).....	21
Tabela 3.1 Integridade, quantificação e pureza do RNA.....	27
Tabela 3.2 Lista dos microRNAs estudados.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
%	porcentagem
=	igual
°C	graus Celsius
A1	BCL2-related protein A1
ALPS	síndrome linfoproliferativa autoimune
APAF-1*	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
BAD*	BCL2-associated agonist of cell death
BAK*	BCL2-Antagonist/Killer 1
BAX*	BCL2-Associated X Protein
BCL-2*	B-Cell Lymphoma 2
BCL-XL*	BCL2-Like 1
BCL-W*	BCL2-like 2
BH*	Bcl-2 homology domains
BID*	BH3 interacting domain death agonist
BIK*	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
BIM*	BCL2-like 11
BMF*	BCL2 modifying factor
BOK*	BCL2-related ovarian killer

* Essa sigla não há acrônimo correspondente na língua portuguesa.

CASP8*	caspase-8, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CASP9*	caspase-9, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CASP10*	caspase-10, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CMSPs	células mononucleadas do sangue periférico
Ct*	Cycle Threshold
CTLA4*	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DD	death domain (domínio de morte)
DED	death effector domain (domínio efector de morte)
DEPC	dietil-pirocarbonato
DISC	complexo sinalizador indutor de morte
DNT	células T duplo-negativas
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EoE	esofagite eosinofílica
FADD*	fas-associated death domain protein
FAS	fas Cell Surface Death Receptor
FASLG	fas ligand
g/ml	grama por mililitro
HRK*	harakiri, BCL2 interacting protein
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IRAK1*	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
KRAS*	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LES	lupus eritematoso sistêmico

* Essa sigla não há acrônimo correspondente na língua portuguesa.

MCL1*	myeloid cell leukemia 1
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
miRNAs	microRNAs
MMF	micofenolato de mofetila
mRNA	messenger RNA (RNA mensageiro)
NAV3*	Neuron Navigator 3
NRAS*	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NOXA*	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
Omi*	HtrA serine peptidase 2
pré-miRNA	microRNA precursor
PRKCD	proteína quinase C delta
PUMA*	BCL2 binding component 3
qPCR	PCR quantitativo
RALD*	RAS-associated autoimmune leukoproliferative disorder
RIN	número de integridade do RNA
RISC*	RNA induced silencing complex
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação da transcriptase reversa, seguida de PCR
SMAC*	second mitochondria-derived activator of caspases
TCR	receptor de células T
TLR	receptores Toll-like
TNFR	receptor do fator de necrose tumoral

* Essa sigla não há acrônimo correspondente na língua portuguesa.

TNF-R1	tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1a
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
TRAF6*	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase
U/μL	unidade por microlitro
3'UTR	região 3' não traduzida

* Essa sigla não há acrônimo correspondente na língua portuguesa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	24
2.1	Geral.....	24
2.2	Específico	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Sujeitos.....	25
3.2	Extração de RNA total	26
3.3	Quantificação, pureza e integridade do RNA	27
3.4	Reação da transcriptase reversa (RT-PCR)	27
3.5	PCR quantitativo (qPCR)	28
3.6	Análises estatísticas.....	29
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Análise da expressão de miRNAs	29
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS	34
8	ANEXOS	41
8.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	41
8.2	Carta de Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.....	43
8.3	Artigo	45

1 INTRODUÇÃO

O termo apoptose foi introduzido por Kerr e colaboradores em 1972 para descrever uma forma de morte celular "programada" (1). É importante notar que há outros processos de morte celular programada descritos, como autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (2,3), contudo, a apoptose é o mais estudado e melhor compreendido (4). Caracterizada por um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação de DNA internucleossomal e, talvez mais importante, alterações da superfície celular. Todas essas mudanças sinalizam às células fagocíticas para o rápido reconhecimento e englobamento das células apoptóticas, controlando assim a indução de reações patológicas (5).

Apoptose é um mecanismo importante em organismos multicelulares. Durante o desenvolvimento regula o número de células e a arquitetura do tecido. Já na idade adulta, é fundamental para a eliminação das células imunológicas autorreativas, células infectadas, e células mutadas (5). Existem duas vias principais de sinalização de apoptose celular: a via extrínseca ou via dos receptores de morte e a via intrínseca ou mitocondrial (3,5,6).

A via extrínseca da apoptose pode ser induzida através da ativação de receptores de morte, que pertencem a uma superfamília de receptores de membrana do fator de necrose tumoral (TNF) e seus ligantes. Entre os receptores mais conhecidos estão o receptor de morte da superfície celular FAS (FAS), receptor do fator de necrose tumoral 1a (TNFR1), receptor do fator de necrose tumoral, membro 25 (TNFRSF25), receptor do fator de necrose tumoral membro 10a (TNFRSF10A), receptor da superfamília do fator de necrose tumoral membro 10b (TNFRSF10B). Esta superfamília de receptores possuem domínios extracelulares ricos em cisteína e uma região citoplasmática, com cerca de 80 aminoácidos chamada de "domínio de morte" (do inglês *Death Domain*, DD). O ligante desses receptores pode ser uma proteína de membrana integrada à superfície de uma célula ou uma proteína solúvel extracelular (3,5).

Para explicar o processo de sinalização da via extrínseca será usado como exemplo o receptor FAS. Essa sinalização ocorre de modo que o receptor FAS, após a interação com o Fas ligante (FASLG), recruta a proteína adaptadora FADD (do inglês *Fas-associated death domain protein*) através da interação entre os DD. Em seguida é ativada a pró-caspase-8 que interage com FADD através do domínio efetor de morte (DED) formando o complexo sinalizador indutor de morte (do inglês *death-inducing signaling complex* - DISC).

Este complexo promove a ativação das caspases iniciadoras 8, 10 e 2 que sinaliza a cascata de caspases efetoras 3, 6 e 7 da apoptose celular (3,5,7,8,9; Figura 1.1).

A sinalização da via intrínseca é controlada por proteínas da família BCL-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*). Todas as proteínas dessa família compartilham um ou mais domínios conhecidos como domínios BH (do inglês *Bcl-2 homology domains*), e são classificadas em três subfamílias: a subfamília anti-apoptótica que compreende as proteínas BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, A1 e BCL-B; a subfamília pró-apoptótica que consiste de BAX, BAK e BOK; e a subfamília pró-apoptótica conhecida como "*BH3-only*" que inclui BIM, PUMA, BAD, NOXA, BIK, HRK, BMF e BID (5,10). Diversos estímulos citotóxicos, incluindo o estresse oncogênico e agentes quimioterapêuticos são responsáveis por ativar a via intrínseca da apoptose. Estes estímulos ativam os membros da subfamília "*BH3-only*", que por sua vez, inibem os membros da subfamília anti-apoptótica, permitindo assim a ativação das proteínas da subfamília pró-apoptótica como BAX e BAK, as quais são responsáveis por mediar a permeabilização da membrana mitocondrial externa, promovendo a liberação de proteínas apoptogênicas como SMAC (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases*), Omi (também conhecido como HtrA2 – do inglês *HtrA serine peptidase 2*) e citocromo-C para o citoplasma. O citocromo-C vai se oligomerizar no citoplasma, junto com a proteína APAF1 (do inglês *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) e a pró-caspase-9, para formar um complexo ativador de caspase-9 (CASP9) chamado de apoptossoma. Uma vez ativada, a CASP9 cliva e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando na morte celular (10,11).

Além disso, as vias intrínseca e extrínseca da apoptose convergem na mitocôndria. A interação entre essas vias ocorre através da clivagem da proteína pró-apoptótica BID (do inglês *BH3 interacting domain death agonist*) pela caspase-8 (CASP8) e desse modo amplifica a resposta apoptótica (10,12; Figura 1.1). A apoptose desregulada resulta em uma variedade de doenças. Defeito na apoptose pode conduzir ao desenvolvimento de tumores e doenças autoimunes, e o excesso de apoptose pode causar doenças degenerativas (13).

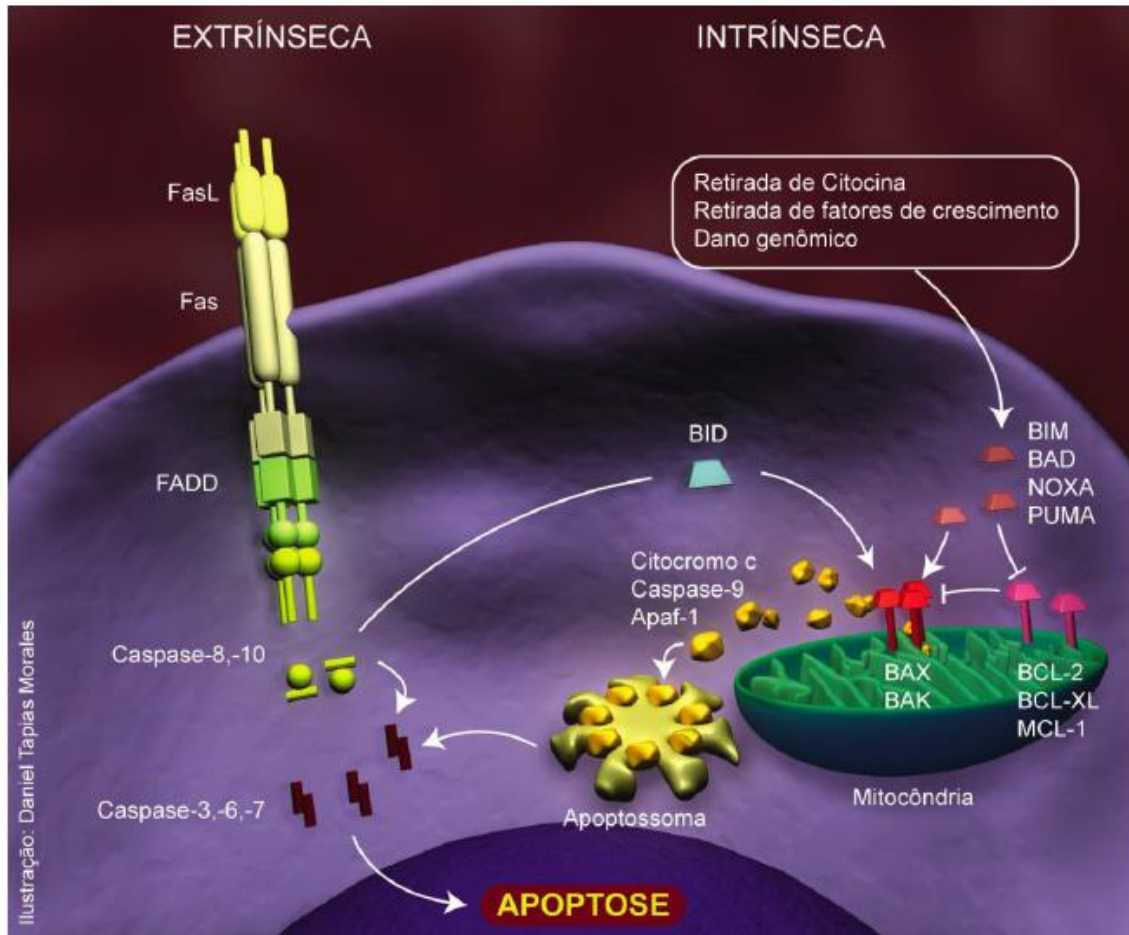


Figura 1.1 Vias extrínseca e intrínseca de sinalização da apoptose.

Há duas vias principais para a ativação da cascata de caspases (caspases efetoras 3, 6 e 7). A via extrínseca é mediada pelo receptor FAS, onde através do DISC ativa as caspases iniciadoras 8 e 10. A via intrínseca através da formação de poros na superfície mitocondrial, libera citocromo c para o citoplasma, ocorrendo a formação do apoptossoma, que por sua vez ativa a caspase iniciadora 9. BID interliga as duas vias.

Na classificação das Imunodeficiências Primárias, a síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS) pertence à categoria das doenças com desregulação do sistema imunológico (14). ALPS é considerada a primeira doença humana com etiologia atribuída a defeito primário da apoptose ou morte celular programada (15).

A primeira descrição de ALPS foi feita em 1967 por Canale e Smith onde relatou cinco pacientes com linfadenopatia, esplenomegalia, e citopenias autoimunes que se assemelhavam a um linfoma maligno (16). Em 1992, Sneller e colaboradores investigaram dois pacientes com linfadenopatia, hipergamaglobulinemia, esplenomegalia e autoimunidade,

os quais possuíam um aumento na população de células T com receptores TCR α/β + e duplo negativas (DNT) para os marcadores CD4 e CD8 (TCR α/β +CD4-CD8-) (17). No mesmo ano, Watanabe-Fukunaga e colaboradores (1992) relataram que os camundongos *lpr* (do inglês *lymphoproliferation*) não tinham expressão de Fas na superfície celular (18). Em 1994, Takahashi e colaboradores descobriram que camundongos *gld* (do inglês *generalized lymphoproliferative disease*) possuíam com mutação em Faslg. (19). Pouco tempo depois, foi identificado em humanos com ALPS mutações no gene *FAS*, (20,21) e outras moléculas das vias extrínseca e intrínseca de sinalização da apoptose (22).

Existem aproximadamente 500 casos de ALPS relatados em todo o mundo provenientes de mais de 300 famílias identificadas com ALPS (23). Contudo, a verdadeira incidência e prevalência permanecem desconhecidas (24,25), devido à expressão fenotípica variável com sintomas que se sobrepõem a outras condições hematológicas e consequentemente ausência de diagnóstico (24,26). A doença foi relatada em diversas raças e etnias, e algumas pesquisas sugeriram uma preponderância do sexo masculino (25,27).

A maioria dos pacientes com ALPS têm mutação genética identificada associada à via apoptótica *FAS* (28). Pacientes com mutação germinativa homozigota ou heterozigota no gene *FAS* são unidos sob a denominação ALPS-*FAS*; pacientes com mutação somática em *FAS* são classificados como ALPS-s*FAS*; pacientes com mutação no *FASLG* são classificados como ALPS-*FASLG* e pacientes com mutação na caspase-10 (*CASP10*) são classificados como ALPS-*CASP10*. Os pacientes que preenchem o critério para o diagnóstico clínico para ALPS, mas que não possuem diagnóstico genético são classificados como ALPS-U (28). Recentemente, novos achados moleculares foram encontrados e os critérios para o diagnóstico de ALPS foram modificados conforme descrição na Tabela 1.1.

Para o diagnóstico definitivo de ALPS é necessário à presença de uma mutação, mas ter a mutação não é suficiente para produzir a doença, devido aos mecanismos de regulação da expressão dos genes para a saúde e para a doença. Hoje reconhecemos que a penetrância variável dos genes é regulada por mecanismos epigenéticos através de metilação e acetilação das histonas e pelos microRNAs (miRNAs) em diversos processos biológicos e patológicos. Certamente, outros mecanismos ainda não identificados contribuirão para esclarecer essa regulação. Assim, familiares de pacientes com ALPS muitas vezes têm a mesma mutação genética, mas apresentam um fenótipo clínico com sintomas muito leves (24,25) ou sem sintomas. O aconselhamento genético é fundamental para essas famílias (24).

A maioria dos pacientes é diagnosticada na infância durante os episódios de linfoproliferação e ou manifestações autoimunes (29). No entanto, há casos relatados na

literatura com aparecimento na idade adulta (27,30). Manifestações autoimunes podem ocorrer alguns anos após linfoproliferação, e as citopenias como plaquetopenia, neutropenia e anemia hemolítica são as mais frequentes (27). Outras manifestações também são vistas em pacientes com ALPS como hipergamaglobulinemia e infecções bacterianas associadas com neutropenia. Linfoproliferações podem levar a autoimunidade direcionada a órgãos específicos como rins, fígado, articulações, olhos, sistema neurológico, intestino, pulmão e vasos sanguíneos (22,25,30).

As alterações histopatológicas em linfonodos de pacientes com ALPS revelam a expansão paracortical devido à infiltração policlonal de células $TCR\alpha/\beta$ +DNT, à hiperplasia folicular e plasmocitose policlonal. Esta infiltração acentuada das células DNT pode levar ao diagnóstico incorreto de linfoma de células T (28,32).

Nos pacientes com ALPS o tratamento inicial para as manifestações autoimunes como citopenia é o corticosteroide seguido por Micofenolato de Mofetila (MMF) e sirolimus como segunda e terceira opções. MMF é geralmente bem tolerado nos casos de ALPS com manifestações clínicas moderadas. Enquanto o sirolimus deve ser reservado para os pacientes com doença grave (23). A esplenectomia foi usada no passado para prevenir pancitopenias por hiperesplenismo e ruptura do órgão. Hoje esse procedimento não é mais recomendado pelo elevado risco de sepse pós esplenectomia (23,33,34).

Os critérios primários necessários para o diagnóstico de ALPS-FAS incluem linfadenopatia ou esplenomegalia crônica e níveis elevados de células DNTs. O diagnóstico pode ser fortalecido pelos critérios secundários que inclui: a) contagem de linfócitos $TCR\alpha/\beta$ + com duplo negativos $CD4-CD8$ - >1,5% do total de linfócitos $T\ CD3+\alpha/\beta$ +; b) dosagem de vitamina B12 >1500ng/L; c) dosagem de IL-10 >20pg/mL; d) dosagem de IL-18 >500 pg/mL; e) dosagem de sFASL >200 pg/mL, citopenias autoimunes, hipergamaglobulinemia, linfoproliferação com ou sem autoimunidade está associada à uma probabilidade de 85-97% de ter mutação em *FAS* (28,34,35). Estes biomarcadores podem facilitar o diagnóstico nos serviços que carecem de instrumentos de análise genética molecular ou teste funcional da apoptose celular (36).

Tabela 1.1 Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS)

Doença	Gene	Nome Aprovado do Gene	Herança	Células T Circulantes	OMIM
ALPS-FAS	<i>FAS</i>	<i>Fas cell surface death receptor</i>	AD/AR ^b	Células T CD4-CD8- TCRa/b DN aumentadas	601859
ALPS-FASLG	<i>FASLG</i>	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	AR	Células T DN aumentadas	134638
ALPS-caspase10 ^a	<i>CASP10</i>	<i>caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	AD	Células T DN aumentadas	603909
ALPS-caspase8 ^a	<i>CASP8</i>	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	AR	Células T DN ligeiramente aumentadas	607271
Deficiência de FADD ^a	<i>FADD</i>	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>	AR	Células T DN aumentadas	613759
CARD11 (GOF) ^a	<i>CARD11</i>	<i>caspase recruitment domain family, member 11</i>	AD	Normal	606445
Deficiência de CTLA-4	<i>CTLA4</i>	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	AD	Células T naive CD4+CD45RA+ diminuídas	616100
Deficiência de PRKCD^a	<i>PRKCD</i>	<i>protein kinase C, delta</i>	AR	Normal	615559
ALPS-sFAS	<i>FAS</i>	<i>Fas cell surface death receptor</i>	MS	Células T CD4-CD8- TCRa/b DN aumentadas	601859
RALD (GOF)	<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	MS	Normal	190070 ^c
	<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	MS	Células T CD4-CD8- TCRa/b DN aumentadas	164790 ^c

AR, herança autossômica recessiva; AD, herança autossômica dominante; DN, duplo negativa; GOF, ganho de função (*gain of function*); OMIM, do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*; RALD, do inglês *RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease*; MS, mutação somática. ^a Dez ou menos casos não relacionados relatados na literatura. ^b Pacientes ALPS–FAS AR têm as manifestações clínicas mais graves. ^c Descrição gênica. Adaptado de (14,37).

Recentemente, uma classe de moléculas de RNA (ácido ribonucleico) conhecida como miRNAs são definidas como biomarcadores para diversas doenças (38). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificadoras de proteínas, com aproximadamente 22 nucleotídeos (39), transcritas de genes evolutivamente conservados, localizados em íntrons ou éxons de genes codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (40). O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por Ambros e colaboradores. O gene *lin-4* conhecido por controlar o tempo de desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* não codificava uma proteína mas produzia um par de pequenos RNAs (61 e 22 nucleotídeos). O RNA de 22 nucleotídeos regulava negativamente a expressão do gene *lin-14* por complementaridade à região 3' não traduzida (3'UTR) deste gene (41). A partir do ano 2000, os miRNAs foram reconhecidos como uma classe distinta de reguladores biológicos (39,42) encontrados em vermes, moscas, plantas e mamíferos (43).

A formação de um miRNA ocorre pela transcrição do gene via RNA polimerase II, originando um longo transcrito primário que apresenta-se na forma de grampo (do inglês “*hairpin*”), contendo cap 5' e cauda poli (A+). Após este processo a ribonuclease III Droscha cliva este *hairpin*, gerando o miRNA precursor (pré-miRNA), com aproximadamente 70 nucleotídeos (44,45,46). Este pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela exportina-5 e o cofator Ran-GTP (47,48). No citoplasma, este *hairpin* de pré-miRNA é clivado pela ribonuclease III Dicer, perdendo sua estrutura de *hairpin*, gerando miRNA duplex, composto por uma fita guia (chamado miRNA ou miRNA-5p) e uma fita passageira (chamado miRNA-3p e anteriormente conhecida como miR-*) (45,47,49,50). Esta fita passageira foi, muitas vezes, considerada degradada e, por conseguinte, não-funcional. No entanto, vários estudos mostram que a fita passageira de miRNA pode atuar como um miRNA maduro (51,52,53; Figura 1.2).

Os miRNAs são incorporados ao complexo RISC (do inglês *RNA induced silencing complex*) e guiados para a sequência complementar do RNA mensageiro (mRNA) alvo. Os miRNAs possuem uma região chamada de região “semente”, contendo uma subsequência de 2-8 nucleotídeos na extremidade 5' considerada importante para o reconhecimento do mRNA alvo (54,55). Se o emparelhamento for completo (100% de complementaridade entre a sequência miRNA e mRNA), o mRNA alvo será degradado; no entanto, se for apenas parcialmente complementar resultará na inibição da tradução do mRNA alvo (56). A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs é mediada principalmente através de sítios complementares a região 3'UTR do mRNA alvo (57; Figura 1.2).

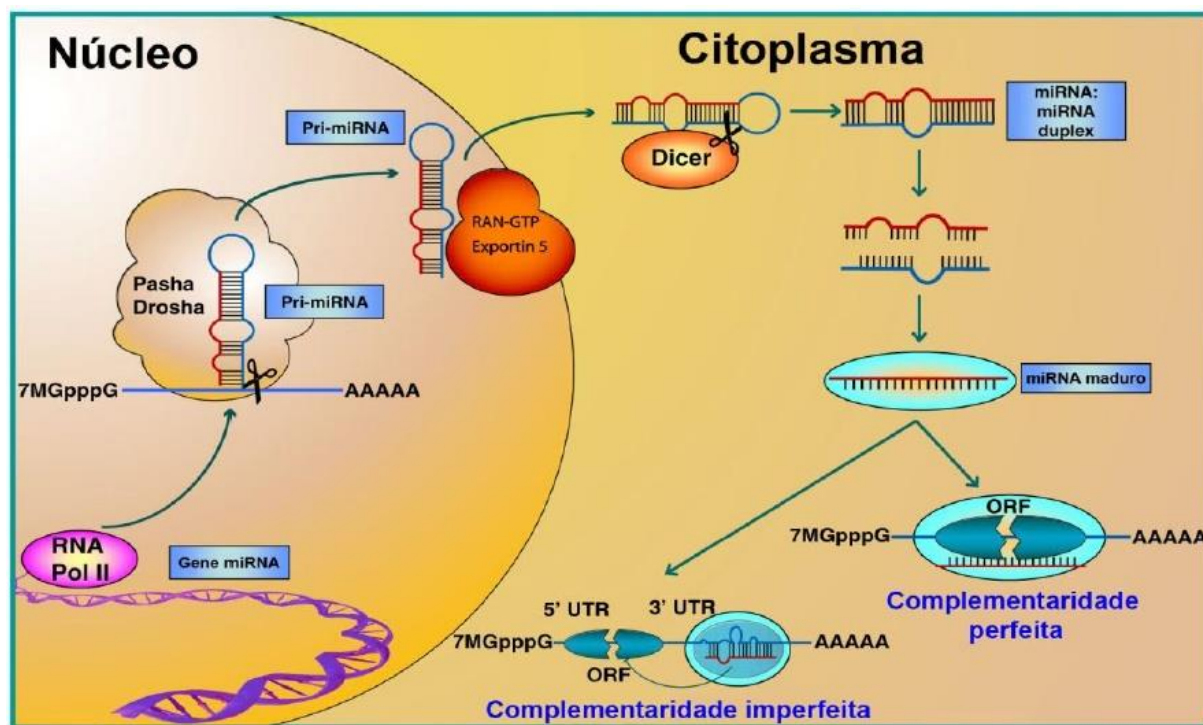


Figura 1.2 Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs.

A partir da transcrição do gene de miRNA pela RNA polimerase II, no núcleo celular, ocorre a formação do miRNA primário, que é clivado pela Drosha, formando o miRNA precursor (pré-miRNA). Este pré-miRNA é exportado para o citoplasma por exportina 5 e o cofator Ran-GTP, onde é clivado pela Dicer, formando o miRNA duplex de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. O miRNA maduro é incorporado no RISC e, com base na sequência de complementaridade, dirige repressão traducional ou da sua clivagem do mRNA. Adaptado (58).

O fato dos miRNAs serem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, faz com que um único miRNA pode ligar-se e regular vários alvos diferentes de mRNA, do mesmo modo que, vários miRNAs diferentes podem ligar-se cooperativamente e controlar um único mRNA alvo. Sabe-se que miRNAs regulam a expressão de, pelo menos, 1/3 de todos os genes humanos, e também são conhecidos por desempenhar um papel importante em vários processos biológicos, como a de reguladores celulares na diferenciação, proliferação e apoptose, na patogênese de doenças humanas, incluindo o câncer (38,50,56).

A importância dos miRNAs na regulação da diferenciação e função das células imunológicas destaca-se pela ocorrência de mudanças fenotípicas quando a expressão do

miRNA é alterada (59). O primeiro indício em que miRNAs estão envolvidos com o sistema imunológico surgiu através de estudos que mostram o envolvimento de miR-223, miR-155 e miR-146a na diferenciação de células mieloides (60). A partir disso, tornou-se evidente que o miR-146a desempenha um papel chave como modulador da resposta imune inata e adaptativa (60,61). A sua desregulação foi relatada em doenças autoimunes como: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome de Sjögren (62) e também associada com cânceres (63), atuando como um fator anti-apoptótico, onde possui *FADD* e *FAS* como alvos (60,64).

Expressões aberrantes de miRNAs ocasionam mudanças na expressão de diversas proteínas, levando a alteração de vias de sinalização, influenciando ao desenvolvimento do câncer (65,66,67). O interesse em estudar miR-21 aumentou devido ao seu papel no câncer e doenças cardiovasculares (68). Este miRNA foi primeiramente identificado como um fator anti-apoptótico em glioblastoma (69), possuindo uma relação com o desenvolvimento tumoral, onde sua expressão aumentada na maioria dos cânceres, está associada com a diminuição da sobrevivência dos pacientes (70). Sua hiperexpressão também foi vista em diferentes tipos de linfoma, incluindo linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin (67). Como revisado por Buscaglia e Li (2011) o miR-21 está fortemente envolvido na apoptose, com alvos ligados a ambas vias apoptóticas (intrínseca e extrínseca) (66). Sendo um de seus alvos o *FASLG* (71,72).

Tomados em conjunto, os conhecimentos sobre a interação dos miRNAs com diferentes vias de sinalização celular evidenciam que eles possuem uma função crucial nas vias da regulação pós-transcricional de genes que codificam proteínas. O miR-146a e miR-21 são capazes de suprimir a expressão de um grande número de genes relacionados com a via de sinalização extrínseca da apoptose e possui como seus alvos *FAS* e *FASLG*, respectivamente, proteínas responsáveis pela via extrínseca da apoptose.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a expressão de miRNAs na síndrome linfoproliferativa autoimune associada à mutação do gene *FAS*.

2.2 Específico

Investigar a expressão dos microRNAs *miR-146a* e *miR-21* e suas fitas passageiras, em dois pacientes, mãe e filho, ambos portadores da mesma mutação em *FAS*, associada com a síndrome linfoproliferativa autoimune.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP (CEP #1176/2011).

3.1 Sujeitos

Foram avaliados um filho e sua mãe, brasileiros, acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas da Unicamp. Ambos participantes são portadores de mutação no gene *FAS*, sendo uma substituição heterozigota no sítio de splicing do íntron 4 (IVS4 +1G>A) (73), porém apenas o filho manifestou os sinais e sintomas da doença ALPS-FAS. No momento da coleta de sangue, o filho e sua mãe tinham, respectivamente, 23 e 52 anos de idade. O filho apresentava história de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, anemia hemolítica, hipergamaglobulinemia, osteoporose e glomerulonefrite. Após a terapia com corticoide o filho teve um resultado positivo mostrando uma melhora na esplenomegalia, anemia e nos altos níveis de IgG e IgA. Ele estava sem o uso de medicação por três anos e dez meses, quando sua amostra de sangue foi coletada para realizar a dosagem da expressão de miRNAs. Já a mãe somente apresentava infecção recorrente por herpes genital e leucopenia, mas sem terapia imunossupressora.

Os controles foram representados por 11 indivíduos saudáveis, pareados por gênero e idade.

3.2 Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada a partir de seis ml de sangue periférico anticoagulado com EDTA utilizando-se de kit de extração comercial *Ambion miRvana PARIS* (Life Technologies).

Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através de centrifugação com gradiente de densidade (Ficoll-Paque densidade $1.077\pm 0,01\text{g/ml}$ Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 576g, com posterior lavagem em salina por 10 minutos a 384g. A concentração de células foi ajustada para 1×10^6 células/mL em 625 μL de tampão de ruptura celular.

Para extrair o miRNA colocou-se as CMSP em um tubo cônico, adicionou-se 625 μL de tampão de ruptura celular (*cell disruption buffer*) e agitou-se a amostra com auxílio do vórtex para a lise celular completa. Foi acrescentado o mesmo volume de 2x solução de desnaturação (*2x Denaturing Solution*) e, em seguida, a amostra foi agitada manualmente e incubada em gelo durante 5 minutos. O fenol clorofórmio foi adicionado no volume final da amostra, e, em seguida, o tubo levado ao vórtex por 60 segundos. A amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 minutos. Este passo da extração pode ser repetido, caso não fique visível a dupla fase (fase proteica e fase aquosa). A fase aquosa foi recolhida, colocada em outro tubo cônico limpo e medido o volume final. Etanol 100% em temperatura ambiente no volume de 1,25 vezes a fase aquosa foi adicionado ao tubo, e a solução foi homogeneizada com o vórtex. Em seguida, essa solução foi aplicada sobre uma coluna de micro-filtro e centrifugada a 16.000g por 30 segundos, e o eluato foi descartado. Este processo de micro-filtração foi repetido com todo o volume da solução. A coluna foi lavada com 700 μL da solução de lavagem 1 (*wash solution 1*) e duas vezes com 700 μL da solução de lavagem 2/3 (*wash solution 2/3*). Em seguida o RNA retido na coluna foi eluído com 30 μL de uma solução de eluição (*elution solution*) pré-aquecida a 95°C, deixando-a por 30 segundos e, a seguir o RNA foi recuperado por centrifugação. Essa eluição foi repetida uma vez usando 20 μL da solução de eluição. O volume final de RNA eluído foi de 50 μL .

3.3 Quantificação, pureza e integridade do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop) onde as leituras da D_{260} e D_{280} foram obtidas e avaliadas quanto à pureza através da razão $D_{260}/280$ (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). A integridade do RNA (RIN) foi avaliada por eletroforese utilizando-se o equipamento Bioanalyzer 2100 Expert (B.02.08.SI648) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Integridade, quantificação e pureza do RNA

Amostras	RIN	RNA	
		Espectrofotometria	
		concentração	R260/280
		ng/ μ L	
C01	6.70	523.3	2.00
C02	9.10	1478.9	2.01
C03	9.80	1041.7	1.96
C04	9.10	404.7	2.08
C05	8.80	422.2	2.11
C06	9.20	377.6	2.11
C07	8.50	745.7	2.10
C08	8.10	434.6	2.06
C09	8.70	549.9	2.06
C010	8.70	555.3	1.97
C011	8.40	1096.4	2.04
Mãe	9.50	205.1	2.13
Filho	8.10	241.9	1.98

C01-5, controles femininos saudáveis pareados com a mãe; C06-11, controles masculinos saudáveis pareados com o filho; RIN, número de integridade do RNA.

3.4 Reação da transcriptase reversa (RT-PCR)

Na reação de RT foi utilizado o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante. A 1,5 μ L de tampão 10X, 0,15 μ L de mix de dNTP (100mM), 0,19 μ L de inibidor de RNases (20 U/ μ L) e 1 μ L de transcriptase reversa *Multiscribe* (50 U/ μ L), 4,16 μ L de água DEPC (dietil-

pirocarbonato) esterilizada e filtrada foi adicionado 1 µg de RNA e 3 µL de *primer* específico para cada miRNAs alvos (miR-146a, miR-21) e para os snoRNA de referência (RNU24, U18 e U47). Os *RT primers* específicos para cada miRNA foram fornecidos no kit *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems-Life Technologies) (Tabela 3.2). As reações foram realizadas no gelo, submetidas a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e a 85°C por 5 minutos (inativação da transcriptase), em termociclador (Mastercycler - Eppendorf).

Tabela 3.2 Lista dos microRNAs estudados.

Nome	Número de acesso no miRBase	Assay ID	Função	Acesso no NCBI
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	000468	Alvo	NR_029701
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	002163	Alvo	NA*
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	000397	Alvo	NR_029493
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494	002438	Alvo	NA*
RNU24	NA*	001001	Referência	NR_002447
U18	NA*	001204	Referência	AB061820 ¹
U47	NA*	001223	Referência	NR_002746

* Sem número no miRBase ou de acesso ao NCBI; ¹ número de acesso por DNA.

3.5 PCR quantitativo (qPCR)

A expressão dos miRNAs foi quantificada utilizando-se o kit *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante e a análise dos resultados pelo Software *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Life Technologies).

Cada cDNA (DNA complementar) gerado foi amplificado utilizando-se *primers* específicos para o miRNA (Tabela 3.2). Adicionou-se 10 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix II*, 1 µL de cada *Taqman MicroRNA Assay*, 7,67 µL de água livre de Nuclease e 1,33 uL de cDNA, resultando em um volume total de 20 ul. As amostras foram distribuídas em placa de 96 poços, em triplicatas, incubadas 10 minutos a 95°C e, na sequência, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e de um minuto a 60°C no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR (Life Technologies). Foram excluídas da análise as amostras que alcançaram medidas com uma diferença superior a 0,5 nos valores de Ct (do inglês Cycle Threshold).

3.6 Análises estatísticas

Para análise de correlação da expressão dos miRNAs do filho e mãe com a expressão de controles saudáveis, foi empregado o teste não-paramétrico de Wilcoxon (*Wilcoxon matched-pairs signed rank test*), com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 versão 5.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão de miRNAs

Os resultados obtidos por qPCR da expressão dos miR-146a, miR-146a-3p, miR-21 e miR-21-3p mostraram que o miR-21-3p foi significativamente hiperexpresso para o filho ($P=0,0313$), enquanto que a expressão de miR-146a, 146a-miR-3p e miR-21 não apresentaram mudança significativa (Figura 4.1). Com relação à mãe, não houve alteração relevante na expressão dos quatro miRNAs analisados. No entanto, para o par miR-146a encontramos um valor de P próximo de ser significativo ($P=0,06$) (Figura 4.1). Foram excluídas da análise 12 amostras que alcançaram medidas com uma diferença superior a 0,5 nos valores de Ct.

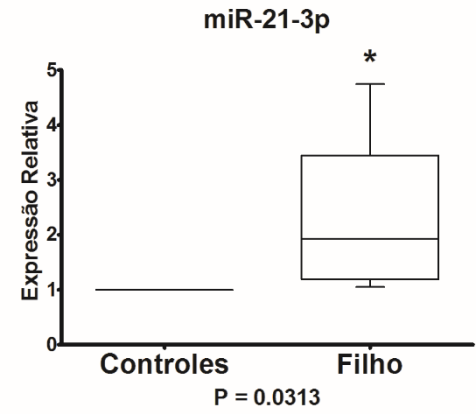
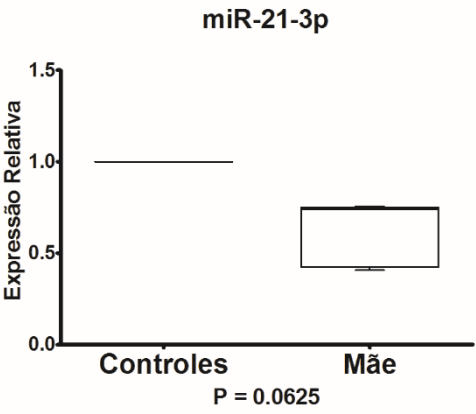
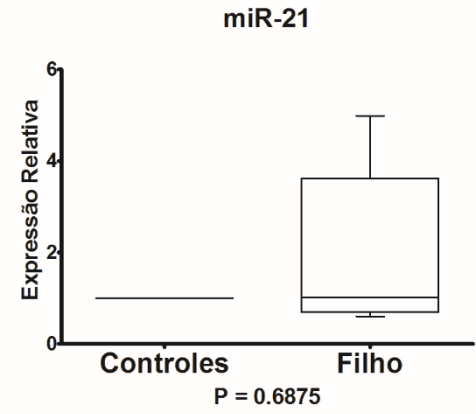
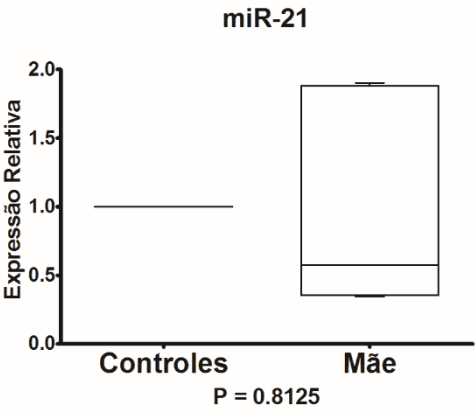
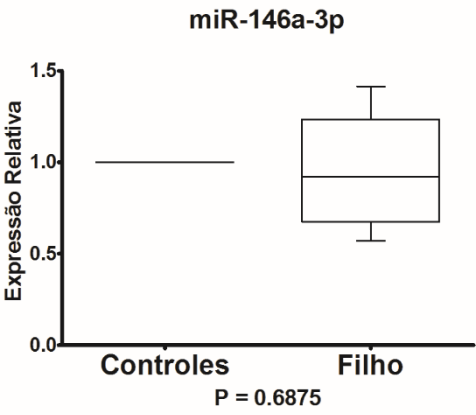
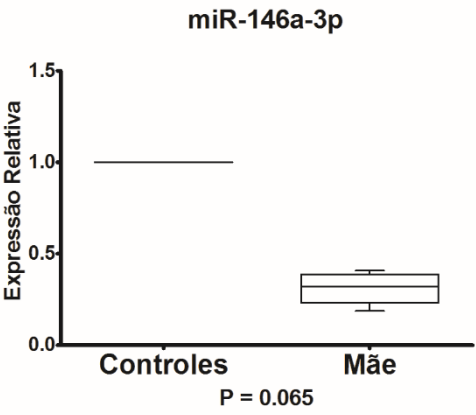
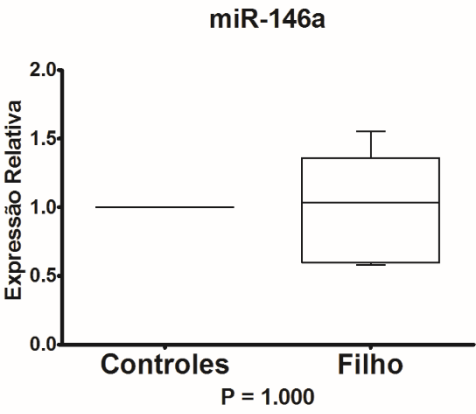
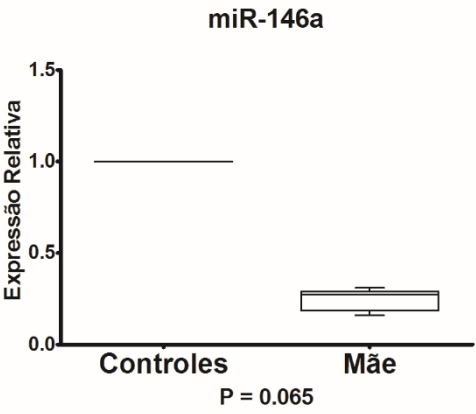


Figura 4.1 Expressão relativa dos miRNAs.

Mãe e filho são portadores da mesma mutação no gene de *FAS*, a qual está associada com ALPS-FAS. Ambos estavam sem manifestações clínicas e sem medicação no momento da coleta. Os controles foram pareados por idade e sexo com mãe e filho, e representam a expressão de cinco e seis indivíduos, respectivamente. Cada indivíduo controle teve sua expressão miRNA calibrada para 1.0. Quando a mãe foi comparada com controles saudáveis, não se observou mudanças significativas na expressão dos miRNAs analisados. Já o filho mostrou uma regulação positiva significativa somente para o miR-21-3p, quando comparado aos controles saudáveis. As amostras foram analisadas pelo teste de Wilcoxon (*Wilcoxon matched-pairs signed rank test*).

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de miRNA em ALPS. Nós exploramos a expressão de dois miRNAs: o miR-21 e o miR-146a e suas fitas passageiras (miR-21-3p e miR-146a-3p), em mãe e filho portadores da mesma mutação em *FAS*, mas apenas o filho manifestou os critérios primários e secundários para o diagnóstico definitivo de ALPS-FAS.

Recentemente, mostrou-se que a expressão forçada do miR-146a em camundongos se assemelhava a ALPS em humanos (64), possuindo também papel de regulação na inibição do gene *FAS*. Visto isso, a hipótese do nosso estudo foi que a perda funcional de *FAS* não afetaria a expressão do miR-146a ou que este miRNA teria sua expressão reduzida como uma resposta fisio-molecular para estimular a transcrição e a tradução de *FAS*. De fato, nós encontramos ambas as situações: a expressão do miR-146a está normal para o filho e levemente reduzida para a mãe ($P=0,06$; Figura 4.1).

O gene que codifica o miR-146a é dependente do fator de transcrição NF-kappaB. Este miRNA desencadeia um papel importante na resposta da imunidade inata contra infecções microbianas e intervém em mediadores pró inflamatórios (61). Atuando como regulador negativo da inflamação, este miRNA possui como alvo os genes *TRAF6* (do inglês TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase) e *IRAK1* (do inglês interleukin-1 receptor-associated kinase 1), resultando na hipoexpressão dos mesmos. Ambos os genes estão envolvidos na transdução de sinais da via dos receptores Toll-like (TLR) (61). A desregulação do miR-146a foi relatada em doenças autoimunes como artrite reumatoide,

síndrome de Sjögren's e Lupus eritematoso sistêmico (62). De acordo com a revisão realizada por Xu e colaboradores (2012), o miR-146a é hiperexpresso no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, reduzindo a expressão de *IRAK1* e *TRAF6*. Os autores também reviram a hiperexpressão do miR-146a em pacientes com síndrome de Sjögren's e a hipoexpressão no Lupus eritematoso sistêmico, que contribui para alterações na via do interferon tipo I, uma via crucial para a predisposição do LES (62). Este miRNA também está associado com cânceres, existindo evidências consistente que o miR-146a pode atuar como um supressor do tumor, e sua desregulação foi descrita em diferentes tipos de tumores (63).

No centro germinativo de linfonodos em camundongos, a expressão forçada do miR-146a levou a hipoexpressão de *Fas* nas células B, resultando no desenvolvimento de ALPS (64). Curiosamente, a expressão do miR-146a para o filho com ALPS foi normal, e levemente reduzida para a mãe ($P=0,06$, Figura 4.1). Investigações futuras irão esclarecer se o miR-146a tem um papel em ALPS, e novos experimentos incluindo mais indivíduos controles saudáveis poderiam revelar alterações significantes na expressão do miRNA, particularmente para a mãe.

Como fatores anti-apoptóticos, o miR-146a e o miR-21 são capazes de suprimir a expressão de um elevado número de genes relacionados com a apoptose (60,64,66,72). *FAS* e *FASLG* são, respectivamente, alvos do miR-146a e miR-21. A expressão forçada do miR-146a é responsável pela baixa expressão de *FAS*, através da ligação do miRNA com a região 3'UTR deste gene (64). Enquanto que a região semente do miR-21 liga-se a região 3'UTR do *FASLG*, inibindo sua expressão (71,72,74). O eixo *FASLG*/miR-21 pode ter um papel importante mecanismo molecular na patofisiologia de ALPS, visto que os pacientes geralmente possuem uma desregulação dos níveis de mRNA e da proteína de *FASLG* (75,76).

O papel do miR-21 em vários tipos de cânceres está bem descrito (70). Pacientes com ALPS estão propensos a desenvolver linfomas devido ao defeito de apoptose (34). Foi observado que a hiperexpressão do miR-21 foi capaz de reduzir os níveis de proteína *FASLG*, em neurônios de ratos, sem efeitos significantes sobre o mRNA de *Faslg* (71). Um resultado similar foi descrito por Shang e colaboradores (2015) em células tronco do câncer de glioblastoma, em humanos (72). Os autores concluíram que o miR-21 regula negativamente a expressão do *FASLG* endógeno (71,72).

Em contraste, nosso resultado não mostrou mudança significativa na expressão do miR-21 para o filho e para a mãe, por outro lado, a expressão do miR-21-3p foi significativamente hiperexpressa somente para o filho ($P=0.0313$; Figura 4.1), que possui manifestações clínicas mais graves em comparação a mãe. Nosso grupo de pesquisa já

descreveu que *FASLG* é hipoexpresso em CMSPs do filho (76), enfatizando a alteração no eixo *FASLG*/miR-21 onde a substituição do miR-21, por sua fita passageira miR-21-3p pode ser considerada. A região 3'UTR de *FASLG* é um alvo do miR-21 e também um previsto alvo do miR-21-3p (77). Pink e colaboradores (2015) observaram que o miR-21-3p regula negativamente o gene supressor de tumor *NAV3* (Neuron Navigator 3), que é associado com piores prognósticos em cânceres (52). Visto essa relação entre o miR-21-3p e gene supressor de tumor nós sugerimos que a regulação negativa do gene *FASLG* pode estar relacionada a hiperexpressão do miR-21-3p.

Outra questão que surge é se o tratamento com corticosteroides realizado no filho poderia ter interferido na expressão dos miRNAs. Lu e colaboradores (2012) compararam a expressão epitelial esofágica de vários miRNAs, incluindo miR-146a e miR-21, em sete biópsias pareadas de pacientes com esofagite eosinofílica (EoE), pré e pós tratamento com glicocorticosteroide, sem nenhum tratamento e com dez controles normais. A expressão elevada dos miR-21 e miR-146a foi detectada nos controles normais e no grupo EoE pós-tratamento (78). No nosso paciente, a terapia com corticoide melhorou muito a sua condição clínica, mas não acreditamos que esteja relacionada com o aumento de miR-21-3p, uma vez que a mutação *FAS* é germinativa e, portanto, está mantida dentro do sistema.

6 CONCLUSÃO

A hiperexpressão do miR-21-3p deve ser investigada como um alvo de diagnóstico e terapia para ALPS-FAS, incluindo o desenvolvimento de linfoma.

A hipoexpressão do par de miR-146a observada para a mãe e a expressão normal deste par para o filho pode estar relacionada com as manifestações clínicas.

Os resultados obtidos não podem ser extrapolados para todos os portadores de ALPS-FAS. Hoje sabemos que a intensidade das manifestações clínicas pode estar associada à região da mutação em *FAS*, como mencionado por Hsu e colaboradores (2012). O próximo passo dessa investigação é estender a avaliação dos miRNAs para todos os membros da família do propósito com a mesma mutação.

7 REFERÊNCIAS

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57.
2. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343
3. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
4. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):742-58.
5. Penaloza C, Orlanski S, Ye Y, Entezari-Zaher T, Javdan M, Zakeri Z. Cell death in mammalian development. *Curr Pharm Des.* 2008;14(2):184-96.
6. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia.* 2000 Dec;14(12):2035-44.
7. Lavrik IN, Golks A, Baumann S, Krammer PH. Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood.* 2006 Jul 15;108(2):559-65.
8. Cerutti E, Campagnoli MF, Ferretti M, Garelli E, Crescenzo N, Rosolen A, Chiochetti A, Lenardo MJ, Ramenghi U, Dianzani U. Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Immunol.* 2007 Nov 13;8:28.
9. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):36-41.
10. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan;15(1):49-63.
11. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Sep 1;5(9).
12. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1813(4):558-63.
13. Imao T, Nagata S. Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2013 Feb;20(2):343-52.
14. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang

- ML. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2015 Oct 7.
15. John MJ, Rajasekhar R, Mathews V. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): a rare cause of immune cytopenia. *Indian Pediatr*. 2008; 45(2):148-50.
 16. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr*. 1967; 70(6):891-9.
 17. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease. *J Clin Invest*. 1992; 90(2): 334–341.
 18. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *J Immunol*. 1992; 189(11):5101-4.
 19. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 1994 Mar 25;76(6):969-76.
 20. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995; 268(5215):1347-9.
 21. Fisher GH1, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995; 81(6):935-46.
 22. Madkaikar M, Mhatre S, Gupta M, Ghosh K. Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Eur J Haematol*. 2011; 87(1):1-9.
 23. Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011; 118(22):5741-51.
 24. Turbyville JC, Rao VK. The autoimmune lymphoproliferative syndrome: A rare disorder providing clues about normal tolerance. *Autoimmun Rev*. 2010; 9(7):488-93.
 25. Shah S, Wu E, Rao VK, Tarrant TK. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an update and review of the literature. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014; 14(9):462.

26. Rudman Spergel A, Walkovich K, Price S, Niemela JE, Wright D, Fleisher TA, Rao VK. Autoimmune lymphoproliferative syndrome misdiagnosed as hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatrics*. 2013; 132(5):e1440-4.
27. Neven B, Magerus-Chatinet A, Florkin B, Gobert D, Lambotte O, De Somer L, Lanzarotti N, Stolzenberg MC, Bader-Meunier B, Aladjidi N, Chantrain C, Bertrand Y, Jeziorski E, Leverger G, Michel G, Suarez F, Oksenhendler E, Hermine O, Blanche S, Picard C, Fischer A, Rieux-Laucat F. A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNF RSF6 mutation. *Blood*. 2011; 118(18):4798-807.
28. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT, Rao VK. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010; 116(14):e35-40.
29. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies (PIDs) presenting with cytopenias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:139-43.
30. Deutsch M, Tsopanou E, Dourakis SP. The autoimmune lymphoproliferative syndrome (Canale-Smith) in adulthood. *Clin Rheumatol*. 2004; 23(1):43-4.
31. Kanegane H, Vilela MM, Wang Y, Futatani T, Matsukura H, Miyawaki T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome presenting with glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*. 2003; 18(5):454-6.
32. Lim MS, Straus SE, Dale JK, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W, Sneller MC, Puck JM, Lenardo MJ, Elenitoba-Johnson KS, Lin AY, Raffeld M, Jaffe ES. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol*. 1998; 153(5):1541-50.
33. Teachey DT, Seif AE, Grupp SA. Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(2):205-16.
34. Price S, Shaw PA, Seitz A, Joshi G, Davis J, Niemela JE, Perkins K, Hornung RL, Folio L, Rosenberg PS, Puck JM, Hsu AP, Lo B, Pittaluga S, Jaffe ES, Fleisher TA, Rao VK, Lenardo MJ. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood*. 2014 Mar 27;123(13):1989-99.
35. Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, Dale JK, Niemela JE, Price S, Davis J, Perkins K, Dowdell KC, Brown MR, Rao VK, Oliveira JB. Using biomarkers to predict the

- presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(4):946-949.
36. Li P, Huang P, Yang Y, Hao M, Peng H, Li F. Updated Understanding of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS). *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Feb 8.
 37. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan K, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014; 5:162.
 38. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011 Dec 1;717(1-2):85-90.
 39. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001; 107(7):823-6.
 40. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004; 14(10A):1902-10.
 41. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
 42. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001; 294(5543):853-8.
 43. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31.
 44. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23(20):4051-60.
 45. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002; 21(17):4663-70.
 46. Rüegger S, Großhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci*. 2012 Oct;37(10):436-46. doi: 10.1016/j.tibs.2012.07.002. Epub 2012 Aug 23.
 47. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlgberg JE, Kutay U. Nuclear export of miRNA precursors. *Science*. 2004; 303:95-98.
 48. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006; 71:59-66.
 49. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003; 9(1):112-23.

50. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
51. Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F. miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; 20:141-8.
52. Pink RC, Samuel P, Massa D, Caley DP, Brooks SA, Carter DR. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2015; 137:143-51.
53. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:1502-5.
54. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003; 115(7):787-98.
55. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136(2):215-33.
56. Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol*. 2014 Mar;37(1 Suppl):285-93.
57. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*. 2006; 17(3):189-202.
58. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics*. 2011 Aug;2(2):171-185.
59. Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int*. 2011; 2011:437301.
60. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, Franceschini D, Meloni F, Barnaba V, Macino G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*. 2010; 115(2):265-73.
61. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(33):12481-6.
62. Xu WD, Lu MM, Pan HF, Ye DQ. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation*. 2012 Aug;35(4):1525-9.
63. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* 2012; 5:13.

64. Guo Q, Zhang J, Li J, Zou L, Xie Z, Fu X, Jiang S, Chen G, Jia Q, Li F, Wan Y, Wu Y. Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells. *Blood* 2013; 121:4875-83.
65. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
66. Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer* 2011; 30:371-80.
67. de Tullio G, De Fazio V, Sgherza N, Minoia C, Serratì S, Merchionne F, Loseto G, Iacobazzi A, Rana A, Petrillo P, Silvestris N, Iacopino P, Guarini A. Challenges and opportunities of microRNAs in lymphomas. *Molecules*. 2014 Sep 17;19(9):14723-81.
68. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 2011; 8:706-13.
69. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005; 65(14):6029-33.
70. Wang W, Li J, Zhu W, Gao C, Jiang R, Li W, Hu Q, Zhang B. MicroRNA-21 and the clinical outcomes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2014; 14:819.
71. Buller B, Liu X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, Hozeska-Solgot A, Chopp M, Zhang ZG. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *Febs J* 2010; 277:4299-307.
72. Shang C, Guo Y, Hong Y, Liu YH, Xue YX. MiR-21 up-regulation mediates glioblastoma cancer stem cells apoptosis and proliferation by targeting FASLG. *Mol Biol Rep* 2015; 42:721-7.
73. Kanegane H, Vilela MM, Wang Y, Futatani T, Matsukura H, Miyawaki T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome presenting with glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*. 2003 May;18(5):454-6..
74. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, Abdellatif M. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*. 2010 Jun 25;285(26):20281-90.

75. Rensing-Ehl, A. *et al.* Sequential decisions on FAS sequencing guided by biomarkers in patients with lymphoproliferation and autoimmune cytopenia. *Haematologica* **98**, 1948–1955 (2013).
76. Presentations, O. *et al.* Esid 2014 Oral Presentations. *J. Clin. Immunol.* **34**, 139–515 (2014).
77. Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. & Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* **11**, R90 (2010).
78. Lu, S. *et al.* MicroRNA Profiling in Mucosal Biopsies of Eosinophilic Esophagitis Patients Pre and Post Treatment with Steroids and Relationship with mRNA Targets. *PLoS One* **7**, e40676 (2012).
79. Hsu AP, Dowdell KC, Davis J, Niemela JE, Anderson SM, Shaw PA, Rao VK, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome due to FAS mutations outside the signal-transducing death domain: molecular mechanisms and clinical penetrance. *Genet Med.* 2012 Jan;14(1):81-9.

8 ANEXOS

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos

Eu, _____, de _____ anos, com registro hospitalar (HC) de nº _____, com Registro de Nascimento (RG) nº _____, e residente na Rua _____, permito por livre e espontânea vontade a minha participação na pesquisa intitulada “Imunodeficiência Primária e Síndrome Linfoproliferativa: Avaliação Diagnóstica”, promovida pelo Centro de Investigação em Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, sob responsabilidade da aluna Beatriz Mariana Abramczuk e coordenação da Profª Drª Maria Marluce dos Santos Vilela.

A pesquisa tem como objetivo fazer o diagnóstico por identificação de mutação no DNA dos pacientes com Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS) e estudar os efeitos dessa doença sobre o sistema de defesa do organismo. Para isso, aproximadamente 15mL de sangue serão coletados de veia periférica, por profissional preparado e com agulha e seringa descartáveis. A coleta de sangue causa ansiedade e desconforto no local da picada da agulha, mas não traz riscos para o paciente. Após a realização dos exames, as amostras que sobrarem serão descartadas. Faremos também uma reavaliação do material das biópsias que o paciente tenha realizado.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos que serão realizados, tais como:

- a) entrevista de acolhimento;
- b) coleta de sangue de veia com seringa descartável por uma enfermeira.

Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, e, portanto a mesma não inclui a possibilidade de indenização. Estou ciente de que não receberei remuneração em troca da minha participação na pesquisa e que todas as informações não serão identificadas por nome, para garantir o absoluto sigilo. O pesquisador me garantiu que receberei esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos

assuntos relacionados à pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa. Fui informado de que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo,

Participante: _____

Beatriz Mariana Abramczuk (telefone 19 3521-8989): _____

Profª Drª Maria Marluce dos Santos Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de ____.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas - UNICAMP: 19-3521-8936

8.2 Carta de Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 17/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1176/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1074.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “**IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA E SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVA: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA**”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Beatriz Mariana Abramczuk

INSTITUIÇÃO: Centro de Investigação em Pediatria/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/11/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 17/02/13 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Realizar o diagnóstico de Imunodeficiência Primária, especialmente de ALPS, avaliar a regulação da resposta imune e realizar análise morfológica, imunoistoquímica e de hibridização *in situ* dos tecidos linfóides em pacientes com condições não usuais de síndrome linfoproliferativa.

III – SUMÁRIO.

A apoptose ou morte celular geneticamente programada é o mecanismo responsável pelo controle do número de células e eliminação de células senescentes, danificadas ou desnecessárias, sem provocar inflamação. O processo tem grande relevância da regulação da resposta imune. A primeira doença humana com etiologia atribuída a defeito primário em apoptose foi a Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS), causada principalmente por mutações heterozigotas no gene TNFRSF6, que codifica para Fas (ALPS tipo 1). A doença é caracterizada tipicamente pela infiltração massiva de células com receptores TCR α/β e negativas para os marcadores CD4 e CD8 (células T duplo-negativas) nos órgãos linfóides, causando expansão deles. Autoimunidade também aparece como manifestação freqüente em indivíduos com ALPS, afetando principalmente plaquetas, eritrócitos e leucócitos. Alguns estudos sugerem que tais manifestações estão associadas a uma maior produção de interleucina 10 (IL-10) pelas células T duplo-negativas, a qual juntamente com fasL solúvel e vitamina B12, aparece em níveis elevados nesses pacientes. O objetivo deste estudo é realizar o diagnóstico de Imunodeficiência Primária, especialmente de ALPS, avaliar a regulação da resposta imune e realizar análise morfológica, imunoistoquímica e de hibridização *in situ* dos tecidos linfóides em pacientes com condições não usuais de síndrome linfoproliferativa.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

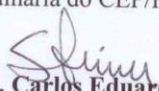
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.3 Artigo

TITLE PAGE

The passenger strand, miR-21-3p is upregulated in *FAS*-autoimmune lymphoproliferative syndrome

SHORT TITLE

MicroRNA-21-3p upregulation in ALPS-FAS

Lia Furlaneto Marega^{1#}, Marcelo Ananias Teocchi^{1#} and Maria Marluce dos Santos Vilela^{1*}

¹ Laboratory of Pediatric Immunology, Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

[#] Authors contributed equally to the study

*** Address for correspondence:** Maria Marluce S. Vilela MD, PhD.

Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas. FCM-UNICAMP.

Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitaria “Zeferino Vaz”

Campinas, São Paulo, CEP 13083-887 Brasil.

Tel: +55 19 35218963;

Fax: +55 19 35218972;

E-mail: **marluce@fcm.unicamp.br**

Abbreviations: Ad: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance; ALPS: autoimmune lymphoproliferative syndrome; *CASP8*: caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase; *CASP10*: caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase; cDNA: complementary DNA; DISC: death-inducing signaling complex; DNT: double negative; *FADD*: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain; *FAS*: Fas cell surface death receptor; *FASLG*: Fas ligand (TNF superfamily, member 6); *IRAK1*: interleukin-1 receptor-associated kinase 1; miRNAs: microRNAs; *NAV3*: Neuron Navigator 3; PBMC: peripheral blood

mononuclear cell; qPCR: quantitative PCR; PCR: reverse transcription quantitative PCR; TLR: Toll-like receptor; *TRAF6*: TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase; SLE: systemic lupus erythematosus; snoRNAs: small nucleolar RNAs.

Key words: apoptosis, gene regulation, human, immunodeficiencies diseases.

SUMMARY

Most cases of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) have an inherited genetic defect involving apoptosis-related genes of the FAS pathway. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding regulatory RNAs playing a role in the control of gene expression. This is the first report on miRNAs in ALPS patients. The aim was to analyze the expression of miR-21 and miR-146a, including their respective passenger strands, in mother and son carrying the same *FAS* mutation, but only the son manifested the signs and symptoms of ALPS-FAS disease. The relative expression of the two pairs of miRNA was evaluated by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) in peripheral blood mononucleated cells from both patients and healthy control subjects. We observed that miR-21-3p was significantly overexpressed for the son ($P=0.0313$) with no significant change in the expression of miR-146a, miR-146a-3p and miR-21. For the mother we found a slight downregulation of miR-146a ($P=0.06$). Since only the son had the major clinical manifestations of ALPS, miR-21-3p should be investigated as playing a critical role in ALPS physiopathology, including the development of lymphoma.

INTRODUCTION

Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is an autosomal dominant (AD) or autosomal recessive (AR) inheritance disorder of lymphocyte apoptosis. Several genes are associated with this condition, particularly apoptosis related genes. ALPS is characterized by a polyclonal accumulation of lymphocytes in the spleen and lymphnodes, autoimmunity and expansion of $CD3^+TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$ lymphocytes, referred to as the double negative T cells (DNTs) [1, 2].

The primary required criteria for ALPS-FAS diagnosis include chronic lymphadenopathy or splenomegaly and elevated DNTs which accumulates with either somatic or germ-line pathogenic *FAS* (TNFRSF6/APO1/CD95) mutations. Elevated plasma levels of sFASL, IL-10 and vitamin B12, paracortical T cell hyperplasia, autoimmune cytopenias, hypergammaglobulinemia, lymphoproliferation with or without autoimmunity are considered as secondary criteria for diagnosis [2].

MicroRNAs (miRNAs) belong to a class of small endogenous noncoding RNAs with ~22nt that repress mRNA of protein-coding translation by base pairing of the target genes [3]. It has been shown that miRNAs regulate the expression of at least one third of all human

genes [4], and bioinformatics analyses estimate that over 60% of human protein-coding genes maintain pairing to miRNAs with regulatory roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis, pathogenesis of many human diseases and tumorigenesis [5-10]. The loss or dysregulation of certain individual miRNAs can have serious physiological consequences [11-12].

Recently, Guo *et al.* showed that forced miR-146a expression causes ALPS in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells [13]. MicroRNA-146a is a key factor modulating the innate and adaptive response [14] and also acting as an anti-apoptotic factor, with *FADD* being one of its targets [15]. Its dysregulation has been reported in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome [6]. Likewise, miR-21 is strongly involved in apoptosis inhibition, with targets belonging to both its intrinsic and extrinsic pathways [16]. *FASLG* was shown to be a miR-21 target in *FASLG*-mediated apoptosis tumorigenesis cell lines [8, 16]. The axis *FASLG*/miR-21 may represent an important molecular mechanism in ALPS pathophysiology, since patients usually have a dysregulation of *FASLG* mRNA and protein levels [17, 18]. Moreover, growing evidence from recent studies has shown the involvement of miR-21 in several cancers [19]. Its upregulation, particularly in cancerous tissue, is effectively predictive of worse prognosis in multiple carcinomas [20].

Patients with *FAS* mutation frequently have cytopenia as autoimmune manifestations and Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma, whose prevalences are 149 and 61 times higher, respectively [2]. The aim was to evaluate the expression of miR-21 and miR-146a, including their passenger strands, miR-21-3p and miR-146a-3p, in mother and son who carried the same *FAS* mutation, but with only the son manifesting ALPS-FAS disease, in comparison to healthy control subjects.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil (CEP #1176/2011).

Subjects

The patients mother and son have already been described in a previous study [21]. They have a *FAS* mutation with a heterozygous substitution in the splice donor site of intron 4

(IVS4 +1G>A). At blood collection, they were, respectively, 23 and 52 years old. The son's clinical history includes organomegaly (lymphadenopathy and hepatosplenomegaly), hemolytic anemia, hypergammaglobulinemia, osteoporosis and glomerulonephritis. His mother only had recurrent genital herpes infection and leucopenia. Corticosteroid therapy had a positive outcome for the son: splenomegaly, anemia and the high levels of IgG and IgA were controlled. He had been off medication for 3 years and 10 months when his samples were collected. Because of mild clinical manifestations, immunosuppressive therapy was unnecessary for the mother.

RNA extraction and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

Six mL of EDTA-anticoagulated whole blood were collected from all subjects for peripheral blood mononucleated cell (PBMC) isolation by density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque, Amersham Biosciences, USA). Saline-washed cell samples were diluted to approximately 1×10^6 cells/mL in 625 μ L of cell disruption buffer (reagent included in the kit) before extractions. Total RNA was extracted using the mirVana™ PARIS™ RNA and Native Protein Purification Kit (Catalog number: AM1556, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity, concentration and purity of samples are shown in Table 1. The RNA Integrity Number (RIN) was generated by Bioanalyzer 2100 Expert (B.02.08.SI648) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). RNA quantification and purity were assessed by spectrophotometry (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

One μ g of total RNA of each sample was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Catalog number: 4366596, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Each TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) (Table 2) provided a specific RT primer for cDNA synthesis, which later was used for the expression of each miRNA target. Sterilized and filtered DEPC-treated water was used in all cDNA synthesis reactions.

Quantitative PCR (qPCR)

MicroRNA expressions were assessed by an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Reactions were performed according to the manufacturer's recommendations. Each qPCR was run as triplicates in a total volume of 20 μ L: 1.33 μ L of the cDNA sample, 10 μ L of TaqMan® Universal Master Mix II (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 1.0 μ L of the specific TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and 7.67 μ L of nuclease-free water. We excluded from analysis 12 reactions with measurements that had a difference of more than 0.5 CT-values.

RESULTS

The study revealed the expression of miR-146a, miR-146a-3p, miR-21 and miR-21-3p in PBMCs from the two ALPS-FAS patients and healthy controls based on three small nucleolar RNAs (snoRNAs) as references: RNU24, U18 and U47 (Figure 1). Our results showed that miR-21-3p was significantly overexpressed for the son ($P=0.0313$), while the expression of miR-146a, miR-146a-3p and miR-21 had no significant change. Moreover, there was no significant change in the expression of the four miRNAs analyzed for the mother. However, for the miR146a pair we found a P value close to significant for her ($P=0.06$).

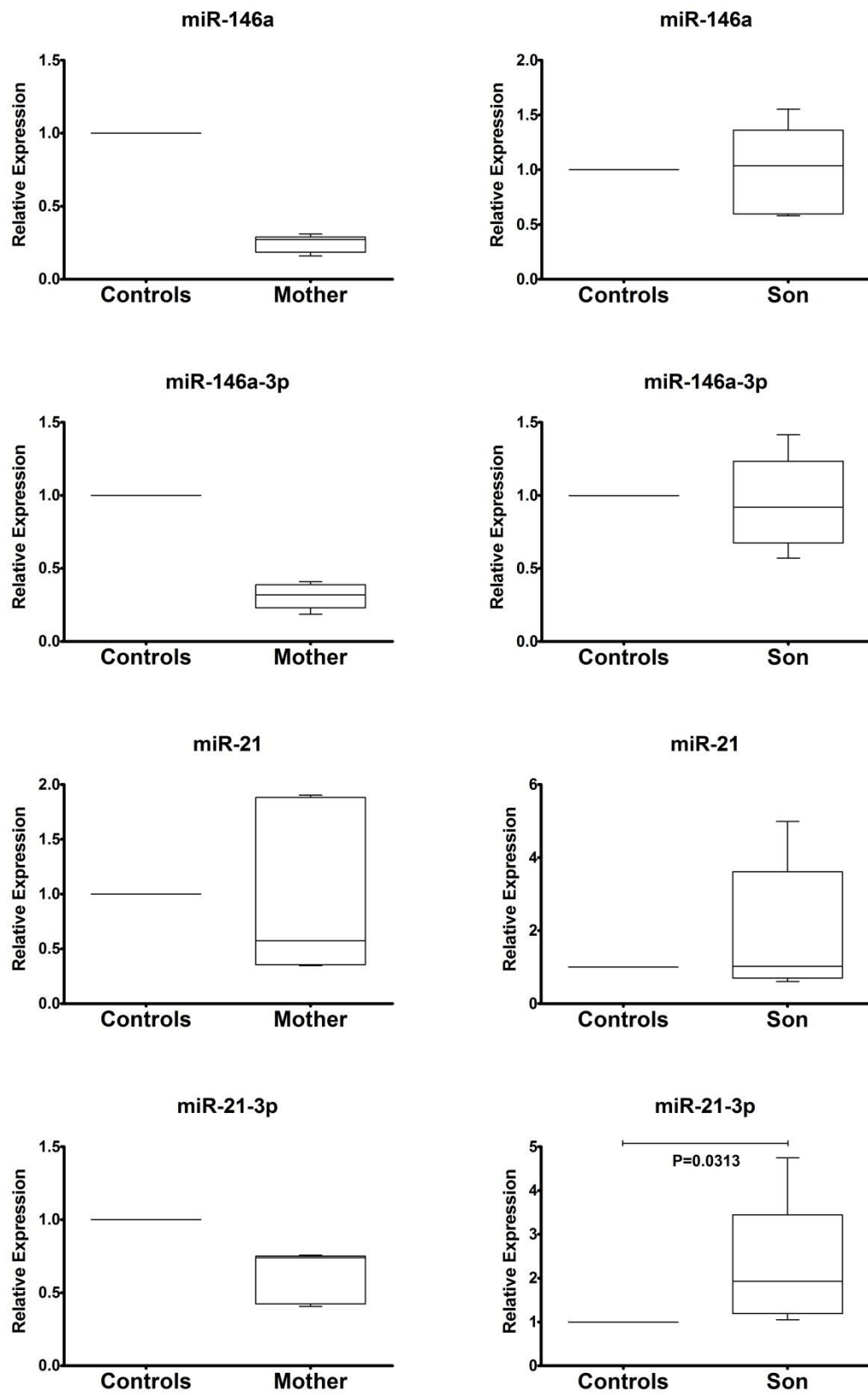


Figure 1. Mother and son have the same mutation in the *FAS* gene, which is associated with ALPS-FAS. Neither of them had clinical manifestations nor was taking medications at the

time of collection. Controls were matched by age and sex with mother and son, and represent the expression of five and six subjects, respectively. Each control individual had their miRNA expression calibrated to 1.0. When the mother was compared to healthy controls, no miRNAs analyzed had significant change in their expression. The son only showed a meaningful upregulation of miR-21-3p when he was compared to healthy controls. Samples were analyzed using the Wilcoxon test (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

DISCUSSION

This is the first report on miRNA in ALPS. We explored the expression of two miRNAs: miR-21 and miR-146a, including their passenger strands (miR-21-3p and miR-146a-3p), in mother and son carrying the same *FAS* mutation, but only the son manifested the primary and secondary criteria for definitive diagnosis of ALPS-FAS. During miRNA biogenesis, the pre-miRNA hairpin generates a double-stranded miRNA (miRNA duplex), which is made up of a guide strand (also called miRNA or miRNA-5p) and a passenger strand (called miRNA-3p and previously known as miRNA*) that is often considered to be degraded and therefore non-functional. However, several studies have shown that a passenger strand miRNA can act as a mature miRNA [22-24]. Recently, it was shown that the forced overexpression of miR-146a in mice mimicked human ALPS [13], which also supports the regulatory role of this miRNA on *FAS* inhibition. We hypothesized that the lack of functional *FAS* would not affect the miR-146a expression or would downregulate it as a physiological response to stimulate *FAS* transcription and translation. Indeed, we found both situations: miR-146a expression was normal in the son and slightly downregulated ($P=0.06$) in the mother (Figure 1). On the other hand, miR-21-3p expression was significantly upregulated only in the son ($P=0.0313$, Figure 1), who had a more severe clinical manifestation in comparison to his mother.

The vast majority of ALPS patients have mutations in apoptosis-related genes of the *FAS* pathway, including *FAS*, *FASLG* and *CASP10* [25]. *FAS*, which is a death receptor, has an important function in the extrinsic apoptotic pathway, with *FASLG* being its ligand. The adapter molecule FADD recruits *CASP8* to the activated receptor. The resulting death-inducing signaling complex (DISC) performs *CASP8* proteolytic activation which initiates the subsequent cascade of caspases mediating apoptosis. *FAS*-mediated apoptosis may have a role in the induction of peripheral tolerance and in the antigen-stimulated suicide of mature T-cells [26]. As anti-apoptotic factors, miR-21 and miR-146a are able to suppress the expression

of a large number of apoptosis-related genes [8, 13, 15, 16]. *FAS* and *FASLG* are, respectively, targets of miR-146a and miR-21. The miR-21 seed sequence binds to the 3'UTR of *FASLG*, inhibiting its expression [7, 8, 27] while miR-146a forced expression was shown to downregulate *Fas*, also targeting its 3' UTR [13].

MicroRNA-146a, whose encoding gene is NF-kappaB-dependent, plays an important role in the innate immune response to microbial infection and targets proinflammatory mediators [28]. Acting as a negative regulator of inflammation, it downregulates *TRAF6* (TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase) and *IRAK1* (interleukin-1 receptor-associated kinase 1), both involved in the Toll-like receptor (TLR) pathway [28]. According to the revision of Xu *et al.*, miR-146 is markedly upregulated in the synovial tissue from rheumatoid arthritis patients, restraining the expression of *IRAK1* and *TRAF6*. The authors also review the overexpression of miR-146a in Sjögren's syndrome patients and its underexpression in systemic lupus erythematosus, contributing to alterations in the type I interferon pathway, crucial for systemic lupus erythematosus predisposition [6]. Also, miR-146a may act as a tumor suppressor, and its dysregulation has been found in many types of cancer [9].

In the germinal center of mice, forced miR-146a upregulation led to B cell *Fas* downregulation, resulting in the development of ALPS [13]. Interestingly, miR-146a expression was normal in our "classical" ALPS patient, and slightly downregulated in his mother ($P=0.06$, Figure 1). Further investigations will clarify whether miR-146a has a role in ALPS. New experiments including more health control individuals could reveal significant alterations in its expression, particularly in the mother.

The role of miR-21 in several types of cancers is well documented [19]. Due to the apoptotic defect, ALPS patients are prone to develop lymphoma [2]. In rat neurons, the overexpression of miR-21 was able to knock down the *FASLG* protein, without a significant effect on *Faslg* mRNA [7]. A similar result was reported by Shang *et al.* in human glioblastoma cancer stem cells [8]. The authors concluded that miR-21 negatively regulates endogenous *FASLG* expression [7, 8].

In contrast, our data show no significant change in miR-21 expression for either son or mother although we have already reported that *FASLG* is downregulated in PBMCs from the son [18]. This again emphasizes a potential disturbance in the *FASLG*/miR-21 axis where a replacement of miR-21 by its passenger strand miR-21-3p can be considered. *FASLG* 3'UTR is target of miR-21 and also a predicted target of miR-21-3p [29], suggesting that this downregulation can be related to the miR-21-3p overexpression. It was observed that miR-21-

3p downregulates *NAV3* (Neuron Navigator 3), a tumor suppressor, being associated with a worse prognosis in tumors [23].

We wonder whether the son's corticosteroid treatment could have interfered in miRNA expression. Lu *et al.* compared the esophageal epithelial expression of several miRNAs, including miR-146a and miR-21, in seven paired biopsies from eosinophilic esophagitis (EoE) patients, pre- and post-treatment with glucocorticosteroids, untreated EoE specimens and ten normal controls. Higher expression of miR-21 and miR-146a were detected in the normal controls and in the post-treated EoE group [30]. In our understanding, these findings suggest that the son's corticosteroid therapy improved his clinical condition but was not related to the miR-21-3p upregulation, since the *FAS* mutation is germ-line.

Considering the close relationship among miR-21/miR-21-3p, tumor suppressor genes and ALPS apoptosis-related mutated genes, a prominent participation of miR-21-3p in ALPS pathophysiology is conceivable. Also, its overexpression should be investigated as a diagnostic and therapeutic target for ALPS-FAS, including the development of lymphoma.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work coordinated by MMSV was supported by grant #2012/06194-9, São Paulo Research Foundation (FAPESP). MAT designed the study. LFM, MAT and MMSV collected patients' clinical data. LFM and MAT did the total RNA extractions, RT-PCRs, qPCRs and analyzed all RT-qPCR data. MAT performed statistical analyses and prepared the figure. LFM did the tables. LFM, MAT and MMSV wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. Quantitative PCRs were carried out in the Multiuser Laboratory (www.laboratoriomultiusuario.com.br) and RIN detection was performed in the Central Laboratory of High Performance Technologies (LaCTAD; www.lactad.unicamp.br). LFM and MAT were recipients of scholarships provided by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no competing interest.

REFERENCES

1. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 1992; **90**:334-41.
2. Price S, Shaw PA, Seitz A, Joshi G, Davis J, Niemela JE, Perkins K, Hornung RL, Folio L, Rosenberg PS, Puck JM, Hsu AP, Lo B, Pittaluga S, Jaffe ES, Fleisher TA, Rao VK, Lenardo MJ. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* 2014; **123**:1989-99.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**:215-33.
4. Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol* 2014; **37**:285-93.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**:281-97.
6. Xu WD, Lu MM, Pan HF, Ye DQ. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* 2012; **35**:1525-9.
7. Buller B, Liu X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, Hozeska-Solgot A, Chopp M, Zhang ZG. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *Febs J* 2010; **277**:4299-307.
8. Shang C, Guo Y, Hong Y, Liu YH, Xue YX. MiR-21 up-regulation mediates glioblastoma cancer stem cells apoptosis and proliferation by targeting FASLG. *Mol Biol Rep* 2015; **42**:721-7.
9. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* 2012; **5**:13.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; **19**:92-105.
11. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009; **136**:26-36.
12. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 2011; **8**:706-13.
13. Guo Q, Zhang J, Li J, Zou L, Xie Z, Fu X, Jiang S, Chen G, Jia Q, Li F, Wan Y, Wu Y. Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells. *Blood* 2013; **121**:4875-83.

14. Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int* 2011; **2011**:437301.
15. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, Franceschini D, Meloni F, Barnaba V, Macino G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* 2010; **115**:265-73.
16. Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer* 2011; **30**:371-80.
17. Rensing-Ehl A, Janda A, Lorenz MR, Gladstone BP, Fuchs I, Abinun M, Albert M, Butler K, Cant A, Cseh AM, Ebinger M, Goldacker S, Hambleton S, Hebart H, Houet L, Kentouche K, Kuhnle I, Lehmberg K, Mejstrikova E, Niemeyer C, Minkov M, Neth O, Duckers G, Owens S, Rosler J, Schilling FH, Schuster V, Seidel MG, Smisek P, Sukova M, Svec P, Wiesel T, Gathmann B, Schwarz K, Vach W, Ehl S, Speckmann C. Sequential decisions on FAS sequencing guided by biomarkers in patients with lymphoproliferation and autoimmune cytopenia. *Haematologica* 2013; **98**:1948-55.
18. Esid 2014 oral presentations. *J Clin Immunol* 2014; **34 Suppl 2**:139-515.
19. Wang W, Li J, Zhu W, Gao C, Jiang R, Li W, Hu Q, Zhang B. MicroRNA-21 and the clinical outcomes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2014; **14**:819.
20. Zhu W, Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; **9**:e103373.
21. Kanegane H, Vilela MM, Wang Y, Futatani T, Matsukura H, Miyawaki T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome presenting with glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 2003; **18**:454-6.
22. Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F. miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; **20**:141-8.
23. Pink RC, Samuel P, Massa D, Caley DP, Brooks SA, Carter DR. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2015; **137**:143-51.
24. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:1502-5.
25. Oliveira JB. The expanding spectrum of the autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Curr Opin Pediatr* 2013; **25**:722-9.

26. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 2009; **457**:1019-22.
27. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, Abdellatif M. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem* 2010; **285**:20281-90.
28. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:12481-6.
29. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010; **11**:R90.
30. Lu S, Mikkala VA, Mangray S, Cleveland K, Shillingford N, Schorl C, Brodsky AS, Resnick MB. MicroRNA profiling in mucosal biopsies of eosinophilic esophagitis patients pre and post treatment with steroids and relationship with mRNA targets. *PLoS One* 2012; **7**:e40676.

Table 1. RNA integrity, quantification and purity.

Samples	RIN	RNA	
		Spectrophotometry	
		ng/μl	R260/280
C01	6.70	523.3	2.00
C02	9.10	1478.9	2.01
C03	9.80	1041.7	1.96
C04	9.10	404.7	2.08
C05	8.80	422.2	2.11
C06	9.20	377.6	2.11
C07	8.50	745.7	2.10
C08	8.10	434.6	2.06
C09	8.70	549.9	2.06
C010	8.70	555.3	1.97
C011	8.40	1096.4	2.04
Mother	9.50	205.1	2.13
Son	8.10	241.9	1.98

C01-C05, female healthy controls matched with the mother; C06-C11, male healthy controls matched with the son; RIN, RNA integrity number.

Table 2. List of microRNA assays.

Assay Name	miRBase Number	Accession	Assay ID	Task	NCBI Accession
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449		000468	Target	NR_029701
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608		002163	Target	NA*
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076		000397	Target	NR_029493
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494		002438	Target	NA*
RNU24	NA*		001001	Reference gene	NR_002447
U18	NA*		001204	Reference gene	AB061820 ¹
U47	NA*		001223	Reference gene	NR_002746

* No number cited on miRBase or NCBI Accession; ¹ DNA accession number.