



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU



**ANÁLISE *IN SILICO* INDICA SIMILARIDADE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA
REDE DE INTERAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D NA SÍNDROME
CLINICAMENTE ISOLADA E ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Alexia Dimitra Zarbinati de Oliveira

BOTUCATU/SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU



**ANÁLISE *IN SILICO* INDICA SIMILARIDADE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA
REDE DE INTERAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D NA SÍNDROME
CLINICAMENTE ISOLADA E ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Alexia Dimitra Zarbinati de Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Doralina Guimarães Brum Souza

Supervisor: Prof^º. Dr^º. Danilo Moretti-Ferreira

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas

BOTUCATU/SP

2014

**Análise *In Silico* Indica Similaridade Da Expressão Gênica Na Rede De Interação
Do Receptor De Vitamina D Na Síndrome Clinicamente Isolada e Esclerose
Múltipla**

In Silico Analysis Indicates Similarity Of Gene Expression In Vitamin D Receptor
Interaction Network In Clinically Isolated Syndrome And Multiple Sclerosis

Alexia Dimitra Zarbinati de Oliveira¹, José Luiz Rybarczyk Filho², Doralina Guimarães Brum¹

¹ Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP,
Botucatu, São Paulo, Brasil -

Autor para correspondência:

Doralina Guimarães Brum

Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Faculdade de Medicina de Botucatu,
Distrito de Rubião Junior, Caixa Postal 540, CEP 18618-970, Botucatu-SP

Telefone: (14) 3880-1233

Email: doradoralina@uol.com.br

***Trabalho Científico apresentado segundo as normas da Revista Brasileira de
Neurologia e Psiquiatria**

RESUMO

Objetivo: Criar rede de interação do receptor de vitamina D e verificar o padrão de expressão gênica de seus constituintes em pacientes com esclerose múltipla (EM) e pacientes que apresentaram episódio isolado de disfunção neurológica sugestivo de mecanismo desmielinizante, *clinical isolated syndrome* (CIS). **Metodologia:** A rede de interação do VDR foi criada a partir de bancos de dados específicos para interações físicas, metabólicas e transcricionais. Paralelamente, foram realizadas busca na base de dados GEO DataSets empregando os descritores “multiple sclerosis” e “vitamin D”. Dois artigos envolvendo pacientes com EM, CIS e controles foram selecionados. Apenas os dados de expressão desses grupos foram utilizados para aplicação do método. O GALANT projeção os dados de expressão sobre a rede criada, resultando em mapas funcionais, no qual o perfil de expressão de CIS e EM foi reproduzido segundo uma escala de cores. **Resultados:** A rede de interação do VDR totalizou 102 genes e 1501 interações físicas, metabólicas e transcricionais. Três análises resultaram da relação entre *CIS versus Controles*, *EM versus Controles* e *EM versus CIS*. Em todas as análises, encontramos sete áreas indicando hiperexpressão dos genes correspondentes na rede. **Conclusão:** A criação de uma rede de interações específica do VDR e a aplicação do GALANT para análise dos dados de expressão gênica de pacientes com EM evidenciaram-se ferramentas com potencial de identificar novos genes relacionados com o mecanismo da doença.

Palavras Chave: esclerose múltipla, receptor de vitamina D, redes de interação, bioinformática

ABSTRACT

Purpose: The aim of the study was to create a vitamin D receptor (VDR) network. Additionally, to verify the pattern of gene expression in multiple sclerosis (MS) and clinical isolated syndrome (CIS) **Methods:** Gene expression GEO database of MS and CIS patients was identified and selected. GALANT was used to analyze this data **Results:** The VDR network identified a total of 102 genes and 1501 transcriptional, physical and metabolic interactions among them. Analyses of gene expression with GALANT created three images after comparing MS and CIS, CIS and control, MS and control. **Conclusion:** Similar areas of gene expression in MS and CIS corroborates there is trait of disease. Additionally, our findings suggested GALANT can be a potential tool to discover more about pathogenic mechanism of the disease. Functional genomics studies is necessary to validate these findings.

Key words: Multiple sclerosis, vitamin D receptor, interaction networks, bioinformatics

INTRODUÇÃO

Os avanços da bioinformática na compreensão dos mecanismos celulares

O seqüenciamento do genoma humano possibilitou desvendar uma grande quantidade de dados contidos no *deoxyribonucleic acid (DNA)*, tornando-se necessário o seu armazenamento. O avanço de novas técnicas computacionais aplicadas à biologia molecular e genômica resultou no surgimento de uma promissora área da ciência, a bioinformática. Esta ferramenta mostrou-se útil para uso em pesquisa com fins diagnósticos preventivos e terapêuticos caracterizando a aplicação biomédica (1), A experimentação computacional, denominada análise *in silico*, possibilita construir e simular sistemas voltados para a predição de propriedades e comportamentos biológicos (2)

Uma célula, para funcionar corretamente, depende de que todos os seus componentes participem de reações bioquímicas intracelulares e interajam entre si. Por isso, o metabolismo celular pode ser reproduzido como uma rede formada por diferentes tipos de interações, como por exemplo: interação gene-gene, proteína-proteína, gene-proteína, gene-metabólito e assim por diante (3). A construção de uma rede é feita a partir de complexos modelos matemáticos e computacionais que identificam e caracterizam as relações de dependência de cada gene.

A expressão dos genes envolvidos nos diversos metabolismos pode ser quantificada por meio de métodos que avaliem o perfil transcricional celular. A técnica de microarray (ou microarranjos) permite comparar níveis de expressão gênica em larga escala em diferentes tecidos, tempos e condições. Seu princípio consiste na hibridização por complementaridade dos ácidos nucléicos. Milhares de seqüência de nucleotídeos (cDNA ou oligonucleotídeos) são fixadas em uma lamina de vidro (chip). Essas seqüências correspondentes aos genes, conhecidas como “sondas”, hibridizam com RNAs mensageiros das amostras de interesse marcados com fluoróforos para que possa ser realizada a leitura do chip (4).

Estudos como o de associação de genômica ampla (*GWAS, em inglês*) são capazes de gerar grande quantidade de dados, entretanto não fornecem informações importantes a respeito da função, localização e interações dos genes. Alguns estudos de associação têm utilizado da criação de complexas redes de interações para ampliar o

conhecimento sobre a patogenia das doenças e encontrar genes relacionados à suscetibilidade e possíveis alvos terapêuticos (5–7).

Na última década, inúmeros sistemas computacionais relacionando dados de expressão gênica foram criados para aplicação na biomedicina. O *ViaComplex* foi desenvolvido para analisar a expressão dos genes em redes biológicas por meio da construção de “mapas funcionais” utilizando dados de expressão gênica previamente processadas sobrepostos às redes de interação (8). Diferentemente das ferramentas já existentes, o *ViaComplex* considera a relação entre os genes não individualizados e fornece uma visualização menos poluída da projeção. Com o intuito de expandir esta funcionalidade, o mesmo grupo desenvolveu o GALANT (GrAph LANdscape VisualizaTion), um plug-in para o programa Cytoscape (9). Da mesma forma, o GALANT projeta qualquer tipo de dado numérico sobre a rede e cria imagens que lembram o layout da mesma. Esta análise se baseia no princípio de que genes que seriam descartados em uma análise de genes diferencialmente expressos podem causar um efeito nos processos biológicos em que estão envolvidos, quando se relacionam com outros componentes dentro do sistema em questão.

Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, desmielinizante e autoimune restrita ao sistema nervoso central (SNC). É considerada a principal causa de incapacidade permanente entre adultos jovens (10). Cerca de 90% das primeiras manifestações da EM são decorrentes de acometimento da medula espinhal, nervo óptico e tronco cerebral, causando mielite, neurite óptica e síndrome de tronco cerebral respectivamente. Esta primeira manifestação neurológica é definida como *síndrome clinicamente isolada* (CIS, do inglês *clinical isolated syndrome*) e tem duração de pelo menos 24 horas. A ocorrência de um novo episódio de caráter desmielinizante inflamatório em uma topografia diferente da inicial, com intervalo de 30 dias e duração maior que 24 horas caracteriza a disseminação temporal e espacial e a conversão de CIS para EM (11,12)

A etiologia da EM ainda não é conhecida. No entanto, há evidências de que a interação de fatores genéticos e ambientais contribua para sua manifestação. Estudos familiares mostraram que a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos é aproximadamente seis vezes maior do que entre gêmeos dizigóticos (13). Os genes do

sistema HLA, principalmente os de classe II, são os principais envolvidos na suscetibilidade à EM (14). A etnia também pode desempenhar um papel no desenvolvimento da doença, sendo algumas etnias mais afetadas que outras (15). Entre os fatores ambientais estudados, o tabagismo, a infecção pelo vírus Epstein-Barr e baixas concentrações de vitamina D apresentam as maiores evidências de associação (16). Esse último poderia explicar o motivo da variação na distribuição geográfica da EM, considerando que países do hemisfério norte recebem menos radiação solar do que os demais países e há uma alta prevalência de hipovitaminose D nessas populações (17). Adicionalmente, estudos asseguram o efeito protetor da vitamina D e defendem seu uso em doses adequadas no tratamento da esclerose múltipla (18).

Vitamina D

O termo vitamina D corresponde a um grupo de hormônios esteróides derivados do 7-deidrocolesterol (7-DHC). Essas moléculas são sintetizadas na epiderme exposta à radiação ultravioleta B (UVB) e obtidas, em menor quantidade, pela ingestão de peixes de águas salgadas (atum e salmão) e alguns tipos de fungos. Tanto a vitamina proveniente da dieta quanto a produzida por síntese endógena dão origem à forma ativa $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (calcitriol) após passagem pelo fígado e rim. A principal função da vitamina D é a regulação da homeostase osteomineral através da manutenção dos níveis séricos de cálcio e fósforo (17). Entretanto, o calcitriol também desempenha um importante papel imunorregulatório, participando da diferenciação das células T helper, inibição da diferenciação e maturação das células dendríticas, bem como da produção de moléculas proinflamatórias (19). O envolvimento da vitamina D em doenças autoimunes como a EM, diabetes melítus tipo I e artrite reumatóide confirmam sua ação no sistema imunológico (20). Adicionalmente, a vitamina D está associada à prevenção de neoplasias e processos degenerativos cardiovasculares (21). Os efeitos biológicos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são mediados pelo seu receptor Vitamin D Receptor (VDR), um fator de transcrição pertencente a família dos receptores nucleares. O VDR está presente em quase todas as células humanas e parece regular direta ou indiretamente cerca de 3% do genoma humano (22).

Dada a importância da vitamina D no sistema imunológico e em doenças autoimunes como a EM, consideramos justificada a realização desse estudo utilizando as técnicas de bioinformática apresentadas. Neste contexto, objetivamos (i) criar a rede

do receptor de vitamina D, (ii) avaliar suas relações de interação e (iii) verificar a presença de genes hiperexpressos a partir de dados de expressão gênica de pacientes com EM e CIS utilizando o GALANT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pesquisa e escolha dos artigos de referência para aplicação do método

Foram realizadas buscas na base de dados GEO DataSets, em 30 julho de 2013, empregando as palavras-chave “*multiple sclerosis*” e “*vitamin D*”. Dois artigos foram selecionados utilizando o tamanho amostral como critério de seleção. O primeiro artigo (A1), “*Microarray analysis identifies altered regulation of nuclear receptor family members in the pre-disease state of multiple sclerosis*” (23), código de acesso *GSE14895*, verificou a expressão gênica de 64 pacientes com EM (n=9), CIS (n=31) e controles saudáveis (n=24). O segundo artigo (A2), “*Prediction of acute multiple sclerosis relapses by transcription levels of peripheral blood cells*” (24), código de acesso *GSE15245*, avaliou indivíduos com EM (n=62) e CIS (n= 32) com o objetivo de identificar genes com valor de prever o tempo para o próximo surto. Para identificar os grupos de pacientes com EM, CIS e Controles em ambos os artigos definimos que *EM1*, *CIS1* e *Controles* referem-se aos grupos do A1; *EM2* e *CIS2* referem-se aos pacientes do A2. A metodologia aplicada foi a mesma para os dois trabalhos. O objetivo, o mérito e o resultado dos artigos não foram considerados no estudo atual. Nesse contexto, usamos somente os dados de expressão dos indivíduos para aplicação do método proposto.

Normalização dos dados

Ambos os estudos utilizaram GeneChips das plataformas HG-U133A e HG-U133A 2.0 da Affymetrix (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA). Os dados foram normalizados pelo método de Robust Multi-array Average (RMA) com o auxílio do pacote “Affy” carregado no *software* estatístico *R* (*R Development Core Team, 2011*).

Criação da rede de interação do VDR

Os constituintes da rede e todas as interações foram verificados experimentalmente e encontram-se disponíveis em bancos de dados específicos: As interações físicas foram obtidas do banco de dados HIPPIE (*Human Integrated Protein-Protein Interaction rEference*) (25); as interações de regulação transcricional foram extraídas do HTRIdb (*Human Transcriptional Regulation Interaction database*) (26); e as interações metabólicas do *Recon 1database* (27).

A rede do receptor de vitamina D foi construída baseada na suposição de que dois genes G1 e G2, que codificam respectivamente as proteínas P1 e P2, interagem entre si se, (i) há interação física entre as proteínas, (ii) ocorre regulação transcricional de P1 ou P2 sobre G1 ou G2 ou (iii) se ocorre interação entre os metabólitos gerados por P1 ou P2 (28).

Visualização da rede e importação dos dados de expressão

A visualização da rede e importação dos dados foram feitas pelo *software* Cytoscape versão 2.8.2 (29). Os dados de expressão gênica normalizados foram importados em formato de tabela e combinados a rede, atribuindo valores aos genes constituintes.

Projeção das imagens pelo GALANT

O plugin GALANT foi implementado ao Cytoscape. Utilizando a opção “*Exp x Control*”, a relação entre valores de expressão foi calculada através da fórmula matemática $\frac{\textit{caso}}{(\textit{caso}+\textit{controle})}$, onde “caso” corresponde a EM ou CIS. Em A1, fizemos as comparações de “CIS1 x controles” e “EM1 x Controles”. Em A2, comparamos EM2 e CIS2. A interpretação dos resultados foi feita segundo uma escala de cores: A coloração vermelha intensa e suas variações (resultado igual ou próximo a 1) indicam que os genes localizados naquela região estão mais expressos no caso do que no controle. A coloração verde (resultado igual a 0,5) indica que os genes estão igualmente expressos no caso e no controle. A coloração azul e suas variações (resultado igual ou próximo a 0,1) indicam que os genes estão mais expressos no controle do que no caso.

Classificação e análise ontológica

Os genes de interesse foram identificados e agrupados em núcleos devidamente enumerados para melhor identificação. Informações sobre localização cromossômica, funções celulares, proteína codificada e participação em processos biológicos foram obtidas nos bancos de dados *online GeneCards*® (www.genecards.org) e DAVID 6.7 (www.david.abcc.ncifcrf.gov).

RESULTADOS

Rede do VDR

A rede do VDR (figura 1) totalizou 1501 interações físicas, metabólicas e transcricionais entre 102 genes identificados pelos seus respectivos ID's - Entrez Gene Database (30). Os dados de expressão gênica normalizados atribuíram valor a 89 dos 102 genes existentes. Treze genes não receberam atributos quantitativos por não possuírem sondas em uma ou ambas as plataformas do chip de microarray.

A relação dos tipos de interações observadas entre os genes de interesse e o VDR encontra-se disponível no **material suplementar I**.

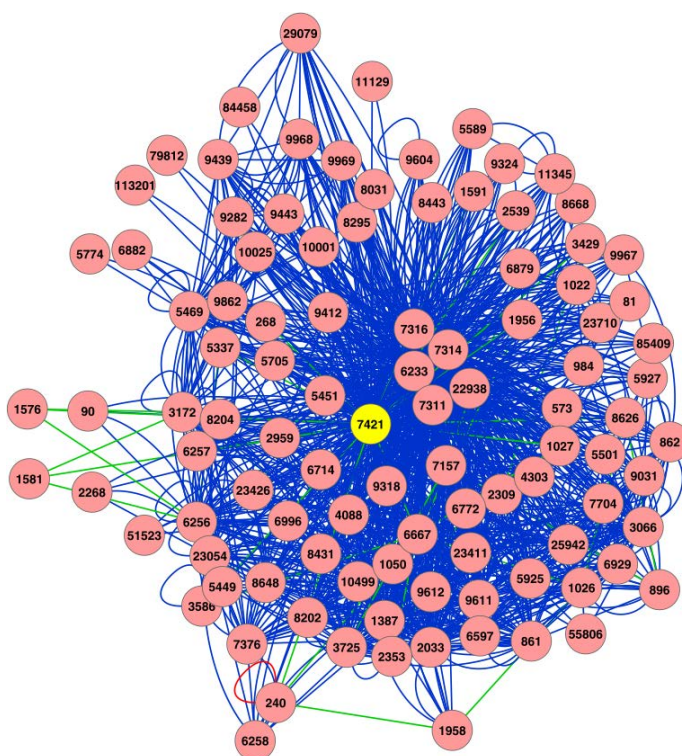


Figura 1: Rede de interação do receptor da vitamina D (destacado em amarelo) apresentando as interações que ocorrem por contato físico (azul), atividade transcricional (verde) e interação metabólica (vermelho)

Análise da expressão gênica pelo GALANT

Três análises foram feitas pelo GALANT a partir da projeção dos dados de expressão obtidos dos artigos selecionados sobre a rede do VDR (**figura 2**). A análise dos dados de A1 - “*Microarray analysis identifies altered regulation of nuclear receptor family members in the pre-disease state of multiple sclerosis*” - produziu as imagens 2a e 2b, que correspondem às relações de expressão entre *CIS1* e controles e *EM1* e controles, respectivamente. A análise dos dados de A2 - “*Prediction of acute multiple sclerosis relapses by transcription levels of peripheral blood cells*” – deu origem à imagem 2c, que corresponde ao resultado da relação da expressão entre os *EM2* e *CIS2*.

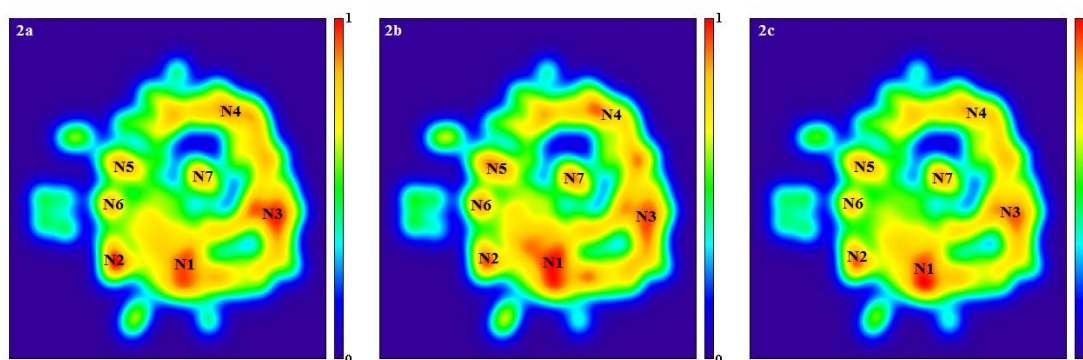


Figura 2: Conjunto de imagens obtidas pelo GALANT a partir da projeção de dados de expressão sobre a rede de interação do receptor de vitamina D. As análises 2a e 2b referem-se aos dados do estudo A1 (ACHIRON et al., 2010) e correspondem às comparações de expressão entre *CIS1* versus Controles e *EM1* versus Controles, respectivamente. A análise 2c é referente aos dados do estudo A2 (GUREVICH et al., 2009) e corresponde a relação de expressão entre *EM2* versus *CIS2*. Áreas avermelhadas (N1, N2, N3, N4, N5, N6 e N7) correspondem à evidência de hiperexpressão.

Considerando a escala de cores definida pelo GALANT, encontramos sete núcleos (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7) de coloração avermelhada sugerindo hiperexpressão de seus componentes. Os 50 genes distribuídos nessas sete áreas foram identificados pelo EntrezID e símbolo , e agrupados em seus respectivos núcleos (**tabela 1**). Nesta, os principais processos biológicos relacionados a cada núcleo também foram incluídos. Informações adicionais sobre localização cromossômica, proteína codificada e função de cada gene encontram-se disponíveis no **material suplementar II**.

Segundo a análise ontológica dos processos biológicos, cinco núcleos (N1, N2, N3, N5 e N6) apresentaram genes relacionados ao processo transcricional e sua regulação. O N2 apresentou também genes envolvidos com apoptose. Interessantemente, o N3 apresentou também genes relacionados ao sistema imune e à resposta inflamatória, O N4 apresentou genes importantes na sinalização das vias dos hormônios esteroides. A composição gênica do N7 mostrou relação com transmissão do impulso nervoso pela junção neuromuscular; sinapses e mecanismos regeneração e plasticidade axonal.

Todos os núcleos, exceto N1, apresentaram composição similar, independente do grupo ou estudo avaliado. Isto é, encontramos os mesmos genes nas diferentes análises de *CIS1 versus CTRL1*, *EM1 versus CTRL1* e *EM2 versus CIS2*. Em contraste, a intensidade de coloração dos núcleos apresentou variação. Houve acréscimo de cinco genes na composição do N1 resultante da análise entre *EM1 e CTRL1*: *nuclear receptor corepressor 1* (NCOR1), *Sp1 transcription factor* (SP1), *SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily a member 4* (SMARCA4), *nuclear receptor subfamily 0 group B member 2* (NR0B2) e *SMAD family member 3* (SMAD3). Estes genes apresentaram relação com o mesmos processos biológicos que os demais constituintes do núcleo.

Dentre os 50 genes destacados na rede do VDR, seis apresentaram relação prévia com a EM, segundo banco de dados do GeneCards. Foram eles: Jun Proto-Oncogene (JUN) CREB Binding Protein (CREBBP), Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Polypeptide 1 (CYP24A), Interleukin 10 (IL-10), Interferon Alpha-Inducible Protein 27 (IFI27) e Cyclin-Dependent Kinase 7 (CDK7).

Ainda segundo o banco de dados do *GeneCards*, alguns genes, entre eles o *Retinoid X Receptor Alpha* (RXRA), *Sp1 Transcription Factor* (SP1) e *Phospholipase D1 Phosphatidylcholine-Specific* (PLD1) foram identificados em estudos experimentais relacionados com doenças autoimunes como a encefalomielite aguda experimental (EAE), lúpus eritromatoso sistêmico (LES) e diabetes mellitus tipo 1.

Núcleos							
	Núcleo 1	Núcleo 2	Núcleo 3	Núcleo 4	Núcleo 5	Núcleo 6	Núcleo 7
EntrezID – Gene	3725 – JUN**	8626 - TP63	3586 - IL10**	1591 - CYP24A1**	5469 - MED1	3172 - HNF4A	7316 - UBC
	10499 - NCOA2	3066 - HDAC2	8648 - NCOA1	9324 - HMG3	9862 - MED24	8204 - NRIP1	7314 - UBB
	9612 - NCOR2	9031 - BAZ1B	5449 - POU1F1	2539 - G6PD	268 - AMH	6257 - RXRB	6233 - RPS27A
	2353 – FOS	862 - RUNXIT1	6256 - RXRA	11345 - GABARAPL2	5337 - PLD1		22938 - SNW1
	1387 – CREBBP**	573 - BAG1	23054 - NCOA6	8668 - EIF3I	5705 - PSMC5		
	1050 – CREBPA	7704 - ZBTB16		3429 - IFI27**			
	2033 - EP300	1027 - CDKN1B		1022 - CDK7**			
	9611 – NCOR1	5501 - PPP1CC		23710 - GABARAPL1			
	6667 – SP1			8443 – GNPAT			
	6597 – SMARCA4			9604 - RNF14			
	8431 – NROB2			9969 - MED13			
	4088 – SMAD3			8031 - NCOA4			
				8295 – TRRAP			
Processos biológicos	Regulação da transcrição e da expressão gênica	Regulação da transcrição, morte celular programada	Regulação da transcrição e da expressão gênica, resposta inflamatória	Cascata de sinalização intracelular, via de sinalização dos hormônios esteroides	Regulação da transcrição	Regulação da transcrição e da expressão gênica	Neurotransmissão na junção neuromuscular, regulação e organização sináptica

Tabela 1: Composição dos sete núcleos obtidos pelo GALANTE descrição dos seus principais processos biológicos. Os genes destacados em negrito estão presentes somente na análise resultante da comparação dos dados entre pacientes com esclerose múltipla (EM) e controles (Achiron et al., 2010).

** Genes relacionados à EM segundo o GeneCards (www.genecards.org)

DISCUSSÃO

Neste estudo, aplicamos o GALANT para conhecer a rede de interação física, transcricional e metabólica do VDR e seu padrão de expressão em pacientes com EM e CIS. A maioria dos estudos relacionados ao VDR refere-se a mecanismos de regulação gênica e às redes de interação transcricionais (31). Para nosso conhecimento, esta é a primeira vez que uma rede do VDR envolvendo três tipos de interações é apresentada com a finalidade de reproduzir o padrão de expressão gênica por meio de imagens funcionais.

As imagens obtidas pela projeção dos dados de *CIS1 x Controles*, *EM1 x Controles* e *EM2 x CIS2* apresentam discretas diferenças, sugerindo que a assinatura da doença na rede de interações do VDR é similar entre os pacientes que apresentaram apenas um episódio clínico isolado e aqueles que converteram para a forma clínica definida. Essa similaridade de expressão observada em análise *in silico* corrobora com achados em análise de líquido (32), ressonância magnética (33) e de expressão gênica (23) previamente relatados.

Considerando os processos biológicos ativos, o controle do processo transcricional predominou entre os núcleos. Porém quatro núcleos destacaram-se por apresentar componentes importantes no desempenho de outros processos biológicos: morte celular programada pelo N2, resposta imune pelo N3, sinalização dos hormônios esteroides pelo N4 e transmissão sináptica na junção neuromuscular pelo N7.

O mecanismo de morte celular desempenha funções importantes e contraditórias na patogenia da EM. De um lado, induzida por fatores pró-inflamatórios infiltrados no SNC, a apoptose causa a destruição dos oligodendrócitos e desmielinização (34). De outro, a inativação da célula T por morte celular é um importante caminho para a remissão dos surtos. Esses eventos ocorrem por uma variedade de vias e o conhecimento de seus mediadores possibilita novas abordagens experimentais. Um estudo populacional que avaliou o perfil de expressão de indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento da EM apontou a apoptose como o principal processo comprometido em todos os grupos. A baixa expressão do VDR e de outros genes correlacionados resultou na supressão da maquinaria apoptótica. Os autores ainda sugeriram o possível uso terapêutico da vitamina D nos pacientes que tenham o mecanismo de apoptose deficiente (35).

A via das citocinas também tem sua importância bem estabelecida na EM. A IL-10, citocina antiinflamatória produto do gene *IL-10*, tem como alvo principal os macrófagos e as células dendríticas. Sua função principal é impedir a apresentação de antígenos e a ativação das células T por meio da redução da expressão do MHC de classe II na membrana plasmática das células apresentadoras de antígeno (36) e supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-12 e TNF- α . Adicionalmente, regula o crescimento e/ou diferenciação de células B e parece ter papel sobre a diferenciação dos linfócitos Treg (37). O gene da IL-10 está associado à EM (38). Células mononucleares expressando maior quantidade de RNA mensageiro de IL-10 foram encontradas em pacientes com EM (39). Na EAE, a expressão de IL-10 aumenta gradativamente contribuindo para a remissão do surto e diminuição do processo inflamatório no SNC (40). A vitamina D ativa, mediada pela ação regulatória de seu receptor, potencializou o desenvolvimento e a quantidade de células produtoras de IL-10 em pacientes com EM, agindo em sinergismo com a própria citocina (41). Essas observações foram amparadas pela experimentação no modelo animal, na qual a vitamina D inibiu a resposta inflamatória apenas em ratos que possuíam a via de sinalização da IL-10 inalterada (42).

O processo de transmissão nervosa na junção neuromuscular é fundamental para todas as ações motoras na vida diária. A disfunção da JNM é a marca da Miastenia gravis, pela presença de anticorpos anti receptor de acetilcolina, causando fadiga e fraqueza flutuante. A fadiga também é um típico sintoma da EM que, segundo estudos, apresenta transmissão neuromuscular anormal (43). No que se refere aos efeitos neuromusculares da vitamina D, sabe-se suas ações *via VDR* envolvem desde a síntese protéica até o mecanismo de contração muscular (44,45). Pouco se conhece sobre a relação entre a vitamina D e a junção neuromuscular na patogenia da EM. Entretanto, a 1,25(OH) $_2$ D tem sido relacionada a diminuição da força e da massa muscular (46,47).

Em três dos sete núcleos foram identificados cinco genes hiperexpressos na rede do VDR que já evidenciaram relação com a EM de acordo com o banco de dados do GeneCards. Os genes CREBBP e CYP24A1, sendo o último associado previamente a EM (48), fazem parte do metabolismo da vitamina D. CYP24A1 tem sua expressão aumentada pelo SNP rs2248359, um alelo de susceptibilidade associado a EM. (49); o IFI27 codifica uma proteína de função desconhecida, mas que foi identificada como um biomarcador da resposta positiva ao tratamento com betainterferona na EM (50); o JUN

foi encontrado expresso em neurônios da periferia das placas na fase aguda da doença e pode estar associado à capacidade regenerativa dos neurônios (51); o gene CDK7 está relacionado no bando de dados do GeneCards, mas não encontramos trabalhos publicados sobre sua relação com a EM. A associação do gene IL-10 com a EM já foi discutida nesta sessão.

Alguns componentes dos núcleos, entre eles o PLD1, o RXRA e o SP1, já foram observados em estudos experimentais em modelo animal de doenças autoimunes como EAE (52), lúpus eritromatoso sistêmico (53) e diabetes mellitus (54), respectivamente. Considerando que a EM é uma doença autoimune, esses genes poderão ter importância na patogenia da doença. Observamos também que muitos genes não estão envolvidos em outros mecanismos patológicos, como por exemplo, os componentes do N2 que estão em sua maioria envolvidos com processos neoplásicos (55–57)

Neste estudo, cerca de 10% dos genes presentes na composição dos núcleos foram relacionados à EM. Portanto, temos por volta de 40 genes identificados por esse método que ainda não foram associados à doença em estudos casos-controles. O GALANT sugere que esses genes podem não estar associados diretamente à EM, mas sim com processos biológicos envolvidos em sua patogenia. A análise *in silico* possui um limitante pertinente ao método que somente apresenta potencial de predição para os eventos relacionados. Portanto, para a validação dos achados é indispensável a realização de estudos de genômica funcional. Somente após essa etapa o poder de predição do método poderá ser inferido.

CONCLUSÃO

A criação de uma rede de interações específica do VDR e a aplicação do GALANT para análise dos dados de expressão gênica de pacientes com EM evidenciaram-se ferramentas com potencial de identificar novos genes relacionados com a doença. Experimentos de genômica funcional poderão confirmar o envolvimento dos novos genes nos mecanismos moleculares da patogenia da EM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prosdocimi F, Coutinho G, Ninnecw E, Silva AF, dos Reis AN, Martins AC, et al. Bioinformática: manual do usuário. *Biotechnol Ciênciã Desenvolv*. 2002;29:12–25.
2. Palsson B. The challenges of in silico biology. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2000 Nov [cited 2014 Jun 27];18(11):1147–50.
3. Rybarczyk-Filho JL. Medidas de performance metabólica usando a expressão gênica de genoma completo [Internet]. 2011. p. 84.
4. Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2002 Jan [cited 2014 May 27];4:129–53.
5. Baranzini SE, Galwey NW, Wang J, Khankhanian P, Lindberg R, Pelletier D, et al. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2014 Jun 5];18(11):2078–90.
6. Satoh JI, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2014 Jun 16];15(5):531–41.
7. Menon R, Farina C. Shared molecular and functional frameworks among five complex human disorders: a comparative study on interactomes linked to susceptibility genes. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jun 16];6(4):e18660.
8. Castro MAA, Filho JLR, Dalmolin RJS, Sinigaglia M, Moreira JCF, Mombach JCM, et al. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2013 Nov 14];25(11):1468–9.
9. Camilo E, Bovolenta LA, Acencio ML, Rybarczyk-Filho JL, Castro MAA, Moreira JCF, et al. GALANT: a Cytoscape plugin for visualizing data as functional landscapes projected onto biological networks. *Bioinformatics* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2013 Nov 14];29(19):2505–6.
10. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2014 Jun 5];343(13):938–52.
11. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2014 May 31];50(1):121–7.
12. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2014 Jun 27];74(5):427–34.
13. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* [Internet]. 1993 Mar [cited 2013 Dec 5];33(3):281–5.
14. Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* [Internet]. 1991 Jul [cited 2013 Dec 9];38(1):1–15.
15. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* [Internet]. 1979 Sep 1 [cited 2013 Dec 9];29(9, Part 1):1228–1228.
16. Ramagopalan S V, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2014 May 29];9(7):727–39.
17. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* [Internet]. Elsevier; 2013 Jul 7 [cited 2014 May 23];88(7):720–55.
18. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 May 23];9(6):599–612.

19. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2014 Mar 26];97(1-2):93–101.
20. Agmon-Levin N, Theodor E, Segal RM, Shoenfeld Y. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 May 30];45(2):256–66.
21. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2004 Mar [cited 2014 Jun 27];79(3):362–71.
22. Krizova L, Kollar B, Jezova D, Turcani P. Genetic aspects of vitamin D receptor and metabolism in relation to the risk of multiple sclerosis. *Gen Physiol Biophys* [Internet]. 2013 Sep 26 [cited 2013 Oct 5];
23. Achiron A, Grotto I, Balicer R, Magalashvili D, Feldman A, Gurevich M. Microarray analysis identifies altered regulation of nuclear receptor family members in the pre-disease state of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 May [cited 2014 Jun 5];38(2):201–9.
24. Gurevich M, Tuller T, Rubinstein U, Or-Bach R, Achiron A. Prediction of acute multiple sclerosis relapses by transcription levels of peripheral blood cells. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jun 11];2:46.
25. Schaefer MH, Fontaine J-F, Vinayagam A, Porras P, Wanker EE, Andrade-Navarro MA. HIPPIE: Integrating protein interaction networks with experiment based quality scores. Deane CM, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 Jan [cited 2014 Jun 1];7(2):e31826.
26. Bovolenta LA, Acencio ML, Lemke N. HTRIdb: an open-access database for experimentally verified human transcriptional regulation interactions. *BMC Genomics* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jun 2];13(1):405.
27. Duarte NC, Becker SA, Jamshidi N, Thiele I, Mo ML, Vo TD, et al. Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Feb 6 [cited 2014 Jun 2];104(6):1777–82.
28. Acencio ML, Bovolenta LA, Camilo E, Lemke N. Prediction of oncogenic interactions and cancer-related signaling networks based on network topology. Vera J, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2013 Jan [cited 2014 May 28];8(10):e77521.
29. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2014 May 23];13(11):2498–504
30. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2014 Jun 2];33(Database issue):D54–8.
31. Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D₃ receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* [Internet]. 2000 Apr [cited 2014 Jun 16];246(1-2):9–21.
32. Andreadou E, Chatzipanagiotou S, Constantinides VC, Rombos A, Stamboulis E, Nicolaou C. Prevalence of cerebrospinal fluid oligoclonal IgG bands in Greek patients with clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Jun 26];115(10):2094–8.
33. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2005 May [cited 2014 Jun 26];4(5):281–8.
34. Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1999 Jul 1 [cited 2014 Jun 7];98(1):49–56.
35. Achiron A, Feldman A, Gurevich M. Characterization of multiple sclerosis traits: nuclear receptors (NR) impaired apoptosis pathway and the role of 1- α 25-dihydroxyvitamin D₃. *J Neurol Sci* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2014 Jun 7];311(1-2):9–14.

36. Koppelman B, Neeffjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* [Internet]. Elsevier; 1997 Dec 12 [cited 2014 Apr 14];7(6):861–71.
37. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* [Internet]. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2001 Jan 28 [cited 2014 Mar 20];19:683–765.
38. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* [Internet]. 1995 Apr [cited 2014 Jun 25];37(4):424–35.
39. Navikas V, Link J, Palasik W, Söderström M, Fredrikson S, Olsson T, et al. Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Scand J Immunol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2014 Apr 6];41(2):171–8.
40. Issazadeh S, Ljungdahl A, Höjeberg B, Mustafa M, Olsson T. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1995 Sep [cited 2014 Apr 3];61(2):205–12.
41. Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2014 Apr 1];132(Pt 5):1146–60.
42. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. American Association of Immunologists; 2006 Nov 1 [cited 2014 Feb 5];177(9):6030–7.
43. Patten BM, Hart A, Lovelace R. Multiple sclerosis associated with defects in neuromuscular transmission. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1972 Jun [cited 2014 Jun 9];35(3):385–94.
44. Birge SJ, Haddad JG. 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. 1975 Nov [cited 2014 Jun 25];56(5):1100–7.
45. CURRY OB, BASTEN JF, FRANCIS MJO, SMITH R. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D-deficient rabbits. *Nature* [Internet]. 1974 May 3 [cited 2014 Jun 25];249(5452):83–4.
46. Bischoff HA, Stahelin HB, Urscheler N, Ehrensam R, Vonthein R, Perrig-Chiello P, et al. Muscle strength in the elderly: its relation to vitamin D metabolites. *Arch Phys Med Rehabil* [Internet]. 1999 Jan [cited 2014 Jun 25];80(1):54–8.
47. Visser M, Deeg DJH, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2003 Dec [cited 2014 May 29];88(12):5766–72.
48. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 11 [cited 2014 May 24];476(7359):214–9.
49. Ramasamy A, Trabzuni D, Forabosco P, Smith C, Walker R, Dillman A, et al. Genetic evidence for a pathogenic role for the vitamin D3 metabolizing enzyme CYP24A1 in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Jun 8];3(2):211–9.
50. Sellebjerg F, Krakauer M, Hesse D, Ryder LP, Alsing I, Jensen PEH, et al. Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation. *Eur J Neurol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Jun 8];16(12):1291–8.
51. Martín G, Seguí J, Díaz-Villoslada P, Montalbán X, Planas AM, Ferrer I. Jun expression is found in neurons located in the vicinity of subacute plaques in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* [Internet]. 1996 Jul 12 [cited 2014 Jun 8];212(2):95–8. 7

52. Göbel K, Schuhmann MK, Pankratz S, Stegner D, Herrmann AM, Braun A, et al. Phospholipase D1 mediates lymphocyte adhesion and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* [Internet]. 2014 May 8 [cited 2014 Jun 20];
53. Roszer T, Menéndez-Gutiérrez MP, Lefterova MI, Alameda D, Núñez V, Lazar MA, et al. Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2014 May 30];186(1):621–31.
54. Klötting N, Follak N, Klötting I. Is there an autoimmune process in bone? Gene expression studies in diabetic and nondiabetic BB rats as well as BB rat-related and -unrelated rat strains. *Physiol Genomics* [Internet]. 2005 Dec 14 [cited 2014 Jun 19];24(1):59–64.
55. Zhang N, Huo Q, Wang X, Chen X, Long L, Guan X, et al. A genetic variant in p63 (rs17506395) is associated with breast cancer susceptibility and prognosis. *Gene* [Internet]. 2014 Feb 10 [cited 2014 Jun 26];535(2):170–6.
56. Zhou K, Jin H, Zhou T, Luo Y. BAG-1 expression in human meningioma and correlation with clinical characteristics. *Med Oncol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Jun 26];30(1):458.
57. Xiang H, Li H, Ge W, Wu W, Gao M, Wang W, et al. Association of CDKN1B gene polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2013 Nov [cited 2014 Jun 26];40(11):6371–7.