

Influència de miRNAs de virus sobre la susceptibilitat a esclerosi múltiple

Estudiant: **Júlia Blay Cadanet**

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1928458@campus.udg.edu

Tutor: Carles Borrego More

Cotutor*: Ester Quintana Camps

Institució: Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)

Vistiplau tutor i cotutor:

Carles Borrego More
(Tutor)

Ester Quintana Camps
(Cotutora)

Institució: IDIBGI

Correus electrònics:

carles.borrego@udg.edu

equintana@idibgi.org

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

Índex de continguts

RESUM.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Esclerosi Múltiple.....	1
1.2 Etiologia i factors de risc	2
1.2.1 Factors genètics.....	2
1.2.2 Factors ambientals.....	3
1.3 microRNAs	3
1.4 EpsteinBarr	3
1.5 Marc de treball del projecte	5
2. OBJECTIVES.....	6
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1 Subjectes d'estudi, ètica i sostenibilitat	7
3.2 Variables clíniques i radiològiques.....	8
3.3 Selecció dels miRNAs candidats a analitzar.....	8
3.4 Selecció dels normalitzadors.....	9
3.5 Obtenció de les mostres, aïllament i purificació de l'RNA total	10
3.6 Síntesis de DNA complementari (cDNA).....	10
3.6.1 Addició d'una cua Poly (A)	11
3.6.2 Lligació	11
3.6.3 Retrotranscripció (RT)	12
3.6.4 Amplificació.....	13
3.7 Quantificació dels miRNAs	14
3.8 Estadística	15
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	16
4.1 Demografia	16
4.2 Selecció miRNAs candidats a analitzar	18
4.3 Anàlisi dels miRNAs	20
4.4 Correlació amb variables clíniques.....	21
5. CONCLUSIONS	25
6. BIBLIOGRAFIA.....	26

RESUM

ANTECEDENTS: L'esclerosi múltiple (EM) és una malaltia autoimmunitària i inflamatòria desmielinitzant que afecta al sistema nerviós central i la segona causa més comuna de disfunció neurològica en adults joves. Es coneix que la susceptibilitat a patir EM està regulada per un conjunt de factors genètics, ambientals i epigenètics, tot i que els mecanismes pels quals actuen segueixen essent una incògnita.

En el present estudi s'ha proposat investigar la relació entre un dels factors ambientals de risc en EM, el virus d'Epstein Barr (EBV) el qual infecta entre el 90 i el 95% de la població mundial, i un factor epigenètic com són els microRNAs (miRNAs). Els miRNAs són molècules petites d'RNA no codificants que participen en la regulació de l'expressió gènica a nivell post-transcripcional. Actualment es coneix que EBV té en el seu genoma gens codificants per miRNAs, els quals modifiquen els mecanismes cel·lulars de l'hoste per tal de dur a terme el seu cicle viral.

OBJECTIU: Molts estudis han investigat el paper regulatori dels miRNAs en el desenvolupament de l'EM. L'objectiu d'aquest projecte era relacionar l'expressió de miRNAs d'EBV amb la presència d'EM.

MÈTODES: S'han recollit mostres de plasma i capa leucocitària d'un total de 76 pacients d'EM de la unitat de neuroimmunologia i esclerosi múltiple de l'Hospital Dr. Josep Trueta i d'un conjunt de pacients com a controls. Els miRNAs s'han extret amb el kit d'extracció de miRNA *mirVana*TM *PARIS*TM RNA. Els miRNAs han estat retrotranscrits i pre-amplificats per tal de ser detectats i quantificats en una qRT-PCR.

RESULTATS: Per dur a terme l'estudi s'han seleccionat 8 miRNAs d'EBV dels 44 totals. En l'anàlisi d'aquests 8, només un d'ells, el ebv-miRBART22, ha presentat expressió al 100% de les mostres de capa leucocitària i 96,96% de les mostres de plasma.

L'estudi de l'expressió diferencial del ebv-miRBART22 entre pacients controls i pacients EM no ha mostrat diferències significatives.

Les variables bioquímiques i genètiques analitzades associades al desenvolupament d'EM estan més presents en els pacients d'EM que en els controls. L'expressió de ebv-miRBART22 ha mostrat tendència a significació entre els individus fumadors ($p=0.059$), essent en dones fumadores on s'observa sobreexpressió de ebv-miRBART22 ($p=0.010$).

CONCLUSIONS: Aquests resultats estableixen que el ebv-miR-BART22 es troba sobreexpressat en dones fumadores.

RESUMEN

ANTECEDENTES: La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune e inflamatoria desmielinizante que afecta al sistema nervioso central y la segunda causa más común de disfunción neurológica en adultos jóvenes. Se conoce que la susceptibilidad a padecer EM está regulada por un conjunto de factores genéticos, ambientales y epigenéticos, aunque los mecanismos por los que actúan siguen siendo una incógnita.

En el presente estudio se ha propuesto investigar la relación entre uno de los factores ambientales de riesgo en EM, el virus de Epstein Barr (EBV) el cual infecta entre el 90 y el 95% de la población mundial, y un factor epigenético como son los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son moléculas pequeñas de ARN no codificantes que participan en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Actualmente se conoce que EBV tiene en su genoma genes codificantes para miRNAs, los cuales modifican los mecanismos celulares del huésped para llevar a cabo su ciclo viral.

OBJETIVO: Muchos estudios han investigado el papel regulatorio de los miRNAs en el desarrollo de la EM. El objetivo de este proyecto era relacionar la expresión de miRNAs de EBV con la presencia de EM.

MÉTODOS: Se han recogido muestras de plasma y capa leucocitaria de un total de 76 pacientes de EM de la unidad de neuroinmunología y esclerosis múltiple del Hospital Dr. Josep Trueta y de un conjunto de pacientes como controles. Los miRNAs se han extraído con el kit de extracción de miRNA *mirVana*TM *PARIS*TM RNA. Los miRNAs han sido retrotranscritos y pre-amplificados para ser detectados y cuantificados en una qRT-PCR.

RESULTADOS: Para llevar a cabo el estudio se han seleccionado 8 miRNAs de EBV de los 44 totales. En el análisis de estos 8, sólo uno de ellos, el EBV-miRBART22, ha presentado expresión en el 100% de las muestras de capa leucocitaria y en el 96,96% de las muestras de plasma.

El estudio de la expresión diferencial del EBV-miRBART22 entre pacientes controles y pacientes EM no mostró diferencias significativas.

Las variables bioquímicas y genéticas analizadas asociadas al desarrollo de EM están más presentes en los pacientes de EM que en los controles. La expresión de EBV-miRBART22 ha mostrado tendencia a significación entre los individuos fumadores ($p=0.059$), siendo en mujeres fumadoras dónde se observan niveles más elevados de EBV-miRBART22 ($p = 0.010$).

CONCLUSIONES: Estos resultados establecen que el EBV-miR-BART22 se encuentra sobreexpresado en mujeres fumadoras.

ABSTRACT

BACKGROUND: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune and inflammatory demyelinating disease affecting the central nervous system and the second most common cause of neurological dysfunction in young adults. It is known that the susceptibility to MS is regulated by a set of genetic, environmental and epigenetic factors, although the mechanisms by which they act remain unknown.

In this study, we have investigated the relationship between one of the environmental risk factors in MS, Epstein Barr virus (EBV), which infects between 90 and 95% of the world population, and an epigenetic factor such as The microRNAs (miRNAs). The miRNAs are small molecules of non-coding RNA that participate in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level. It is currently known that EBV has in its genome coding genes for its own miRNAs, which modify some cellular mechanisms of the host to carry out its viral cycle.

OBJECTIVE: Many studies have investigated the regulatory role of miRNAs in the development of MS. The aim of this project was to relate the expression of certain EBV miRNAs to the presence of the disease.

METHODS: Plasma and leukocyte buffy coat samples were collected from a total of 76 MS patients from the unit of Neurimmunology and multiple sclerosis of the Dr. Josep Trueta Hospital and from a set of patients as controls. The miRNAs were extracted with the *mirVana*TM *PARIS*TM RNA miRNA extraction kit. The miRNAs have been retrotranscribed and pre-amplified to be detected and quantified in a qRT-PCR.

RESULTS: To carry out the study, eight EBV miRNAs were selected from the 44 totals. In the analysis of these 8 only one of them, the EBV-miRBART22, presented expression in 100% of buffy coat samples and in 96.96% of plasma samples.

The study of differential expression of EBV-miRBART22 between control patients and MS patients showed no significant differences.

The biochemical and genetic variables analyzed associated with the development of MS are more present in MS patients than in controls. The expression of EBV-miRBART22 has shown a tendency to be significant among smokers ($p=0.059$), where higher levels of EBV-miRBART22 ($p = 0.010$) were observed in women smokers.

CONCLUSIONS: These results establish that EBV-miR-BART22 is overexpressed in female smokers.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Esclerosi Múltiple

L'Esclerosi múltiple (EM) és considerada una malaltia autoimmunitària, inflamatòria i desmielinitzant que afecta al sistema nerviós central (SNC). La inflamació danya la mielina dels axons causant degeneració i discapacitat.

La malaltia és la segona causa de discapacitat neurològica en adults joves que afecta a més de 2 milions de persones a tot el món (Kingwell et al., 2013), amb una edat de debut entre els 20 i els 40 anys. L'EM és més freqüent en dones que en homes (ràtio de 3-2:1) com també s'observa en altres malalties de base autoimmunitària, i sembla que aquesta incidència augmenta a mesura que passa el temps (Harbo, Gold, & Tintoré, 2013). Tot i que és una malaltia estesa arreu, també s'observen patrons demogràfics trobant una prevalença més alta en zones situades a latituds més elevades.

El diagnòstic d'EM es basa en el resultat de la combinació de diverses dades provinents de la història clínica, d'un examen neurològic, de la ressonància magnètica (RM), i de l'extracció de líquid cefaloraquídi per detecció de síntesi intratecal d'immunoglobulines. Tot i això, l'eina més important pel diagnòstic de l'EM és la RM la qual permet detectar lesions desmielinitzants localitzades en diferents àrees (disseminació en l'espai) i determinar si han tingut lloc en diferents moments (disseminació temporal). La detecció de lesions actives a través de la RM es fa gràcies a l'administració d'un contrast, el gadolini (Gd+).

Els símptomes clínics de la malaltia són altament variables ja que qualsevol funció del SNC pot estar afectada. Existeixen dues formes inicials de la malaltia:

- RIS (*Radiologically Isolated Syndrome*) o SRA (Síndrome Radiològicament Aïllat) en la qual el pacient presenta lesions en una RM sense símptomes clínics (Okuda et al., 2009).
- CIS (*Clinically Isolated Syndrome*) o SCA (Síndrome Clínicament Aïllat) la qual es caracteritza per un primer episodi de símptomes neurològics (durant almenys 24 hores) i és causada per la inflamació i desmielinització en un lloc o més del SNC (Hurwitz, 2009).

Un alt percentatge d'aquests dos tipus de pacients acaben desenvolupant EM.

L'EM s'ha classificat tradicionalment des d'un punt de vista fenotípic clínic en:

- EM remitent-recurrent (EMRR): és la forma clínic més comuna afectant aproximadament el 85% dels pacients d'EM. Els pacients presenten nous brots de la malaltia que poden remetre totalment o deixar seqüeles.
- EM secundària progressiva (EMSP): gran part dels pacients d'EMRR acaben en EMSP. Després d'una fase de brots els pacients empitjoren lentament amb un increment progressiu de la discapacitat sense brots.
- EM primària progressiva (EMPP): els pacients presenten des de l'inici una forma progressiva de la malaltia sense brots. Actualment no hi ha tractament per aquesta forma clínic.
- EM progressiva recurrent (EMPR): és rar entre les formes d'EM, afectant un 5% dels pacients. Els brots apareixen de forma intermitent provocant un empitjorament progressiu sense períodes de recuperació (Hurwitz, 2009).

Degut a l'augment tant dramàtic de nous casos de pacients d'EM i pel fet que no es coneix encara una cura total, l'objectiu principal dels especialistes avui en dia és entendre les causes i els factors implicats en el seu desenvolupament.

1.2 Etiologia i factors de risc

Actualment l'etiologia de la malaltia és desconeguda, tot i que se sap que factors ambientals i factors genètics estan implicats en el seu desenvolupament.

1.2.1 Factors genètics

L'EM és una malaltia de genètica complexa. Actualment, s'associa l'EM a l'antigen leucocitari humà (HLA), dins del complex major d'histocompatibilitat classe II (MHCII), tot i que encara no està del tot entès com aquest contribueix genèticament al desenvolupament de la malaltia. Els primers estudis genètics van permetre identificar gens específics com HLA-DR, dels quals, els genotips HLA-DRB1*15:01 (Harbo et al., 2013) i HLA-DRB1*03 s'associen a més risc a desenvolupar la malaltia.

Tot i que la regió HLA és el locus de major susceptibilitat en EM, nous estudis de GWAS han identificat nous gens entre els quals destaquen *IL7R*, *IL2R*, *CLEC16*, *CD58*, *EVI5*, *TYK2*, *GPC5*, *PARK2*, *PDZRN4*, *CSMD1*, *METTL1*, *CD40*, *TNFRS1A*, *IRF8*, *CD6*, *RGS1*, *STAT3* i *CBLB*. Aquests es troben desregulats en pacients d'EM i poden contribuir a entendre el model genètic de la patologia (Oksenberg & Baranzini, 2010).

1.2.2 Factors ambientals

D'altra banda, tot i conèixer alguns gens de susceptibilitat, l'exposició a certs factors ambientals també juga un paper important en el desenvolupament de la malaltia. Els que han demostrat major associació en el desenvolupament de la malaltia són la infecció pel virus d'Epstein Barr (EBV), els nivells baixos de vitamina D (VitD) i el tabac.

Degut a què la combinació entre els factors genètics i ambientals mencionats anteriorment no són suficients per entendre'n l'etiologia, es creu que, a més, cal sumar-li el factor de l'herència perduda, l'epigenètica, la qual podria tenir un paper fonamental per respondre moltes de les preguntes que fins ara se'n desconeix la resposta. L'epigenètica, és l'estudi dels mecanismes que alteren l'expressió dels gens sense alterar la seqüència de DNA, dins els quals, els tres mecanismes més estudiats són la metilació del DNA, la modificació de les histones i els microRNAs associats al silenciament post-transcripcional de gens (Koch, Metz, & Kovalchuk, 2013).

1.3 **microRNAs**

Els microRNAs (miRNAs) han estat recentment relacionats amb la modulació de l'expressió de molts gens, controlant la síntesi proteica, eliminant-la o reprimint-la a nivell post-transcripcional. Els miRNAs són molècules d'RNA d'uns 22-25nt, no codificants i altament conservades entre espècies que participen a molts processos biològics de la cèl·lula com el desenvolupament, la proliferació cel·lular, la diferenciació, l'apoptosi, el metabolisme, i la inflamació, entre d'altres (Tufekci, Oner & Genc, 2011).

La biogènesis d'aquestes molècules té lloc en diferents etapes i en diferents llocs dins la cèl·lula, són transcrites per les RNA polimerases (II i III), i processades a partir de transcrits primaris (pri-miRNAs), els quals hauran de madurar i transformar-se a miRNAs funcionals.

Molts estudis recents han relacionat gran quantitat de miRNAs cel·lulars al desenvolupament de malalties. D'altres, han demostrat que els miRNAs també poden ser sintetitzats per alguns virus, entre ells els Herpesvirus, com l'Epstein Barr, manipulant o modificant l'expressió de miRNAs cel·lulars per facilitar els seus cicles de replicació (Cameron et al., 2008) (Giudice et al., 2016).

1.4 **Virus d'Epstein-Barr**

Epstein Barr (EBV), també conegut com herpesvirus 4 humà, és un gammaherpesvirus, membre de la família dels *Herpesviridae*. Actualment s'estima que infecta entre el 90 i el 95% de la població mundial adulta contribuint en un elevat nombre de patologies, el càncer, com el Limfoma de Burkitt (BL), o d'altres malalties autoimmunes com el Lupus Eritematós Sistèmic (LES), l'Artritis Reumatoide (AR), el Síndrome de Sjörgen i l'Esclerosi Múltiple (Giudice et al., 2016)(Dittfeld, Gwizdek, Michalski, & Wojnicz, 2016).

La infecció per EBV acostuma a ser durant la infància i es presenta de manera asimptomàtica, mentre que una infecció del virus en l'adolescència o en una l'edat més adulta causa la mononucleosis infecciosa (Price & Luftig, 2015). El risc de patir EM augmenta 20 vegades en aquelles persones que han patit la mononucleosis infecciosa en edats més avançades (Villoslada, 2010).

Després de la primera infecció, el genoma viral roman en el nucli però sense integrar-se en el cromosoma de les cèl·lules B de l'hoste en forma d'episoma, el qual és metilat per mecanismes moleculars d'aquest i només li permet expressar un grup reduït de gens, incloent proteïnes latents, com EBNA1, i miRNAs (Giudice et al., 2016). El seu cicle viral es divideix en dues fases, el cicle lític i el cicle lisogènic. Aquesta forma de latència, els permet evadir el sistema immunitari de l'hoste i persistir llargs períodes de temps (Arvin et al., 2007).

S'ha vist, que els miRNAs de EBV es troben organitzats en el genoma en dos clusters, BART i BHRF1. Tot i això, l'expressió dels diferents miRNAs està regulada en funció de la forma de latència. Els últims anys s'han descrit diferents formes de latència les quals el virus utilitza en les diferents etapes del seu cicle víric (fig. 1). El cluster BART s'expressa predominantment en latència I i/o II, mentre que el BHRF1 s'associa a la forma de latència III. Tot i així, la importància d'aquests perfils diferencials actualment no està clara, com tampoc ho està la funció dels miRNAs condicants d'EBV.

Actualment no hi ha evidències de cap virus animal que codifiqui per mecanismes processadors de miRNAs o components RISC i per això s'aprofita dels enzims i les proteïnes de l'hoste.

La majoria de miRNAs del virus no presenten una homologia amb els seus gens virals. Això porta a plantejar la hipòtesi que s'assemblen més a gens cel·lulars i que per tant participen en la inhibició post-transcripcional (Arvin et al., 2007).

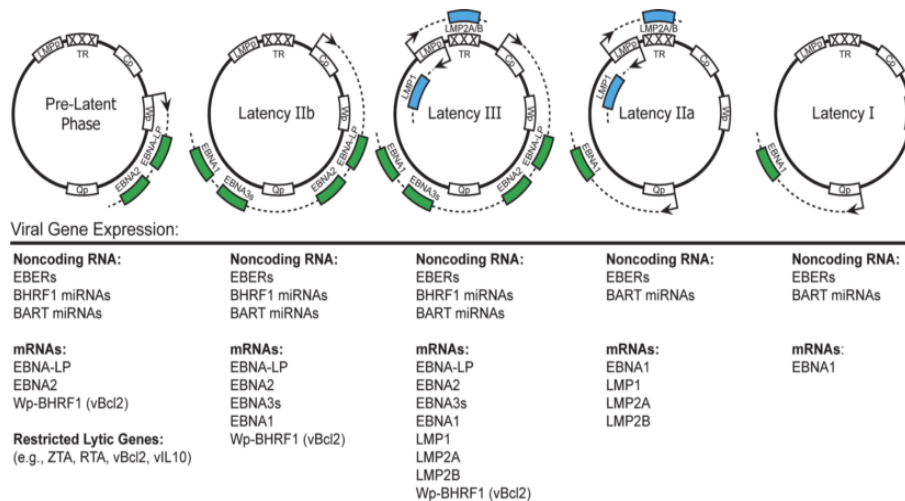


Figura 1. Expressió gènica de EBV en les diferents etapes de latència on el genoma d'EBV està representat en forma d'episoma. Adaptat de (Price & Luftig, 2015).

1.5 Marc de treball del projecte

He realitzat aquest treball col·laborant amb el grup de recerca d'EM de la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple (UNIEM) que pertany al Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI) localitzat a Parc Hospitalari Martí i Julià (Salt, Girona).

El projecte es basa en identificar un patró d'expressió de miRNAs circulants del virus d'Epstein Barr en pacients d'esclerosi múltiple que pugui ser utilitzat com un biomarcador de la malaltia.

El grup de recerca de UNIEM centra la seva recerca en la búsqueda de marcadors genètics en l'EM. Des de l'any 2013 ha obert una línia d'investigació de factors epigenètics relacionats amb el desenvolupament d'aquesta malaltia. Aquest treball s'emmarca dins el projecte *"Papel de los miRNAs en la esclerosis múltiple. Estudio de miRNAs en líquido cefalorraquídeo específicos para cada uno de los subtipos clínicos y de la respuesta a tratamiento"* de FIS (PI13/01782) finançat per El Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) dins un projecte d'investigació en salut. Aquesta línia d'investigació pretén descriure un patró de miRNAs específic per a cadascuna de les diferents formes clíniques associades a EM. L'estudi s'ha ampliat a la caracterització dels miRNAs presents en pacients amb una forma activa de la malaltia. Finalment, s'investiga amb el patró de miRNAs virals que poden estar relacionats amb el desenvolupament de EM.

Actualment el grup continua investigant en aquesta trajectòria i ha ampliat la recerca en un altre àmbit de l'epigenètica centrada en l'estudi de metilacions relacionada amb la presència de la malaltia.

2. OBJECTIVES

As the Epstein Barr virus is a risk factor for multiple sclerosis (MS), we hypothesized that there is a different circulating expression pattern of ebv-miRNAs comparing patients affected of MS versus non-inflammatory controls in a qRT-PCR analysis.

In the process of validation of our hypothesis we have planned the following objectives:

- Identify ebv-miRNAs that could have a point in the development of the MS.
- Compare the expression of the ebv-miRNAs between MS patients and controls.
- Correlate the expression of the ebv-miRNAs to other biochemical and genetic parameters.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Subjectes d'estudi, ètica i sostenibilitat

El treball es basa en l'estudi de mostres d'un total de 76 pacients, els quals han estat escollits seguint els següents criteris d'inclusió:

- Disposar de la mostra recollida en el moment del diagnòstic de la malaltia.
- Pacients afectats d'EM amb forma clínica RR diagnosticats segons els criteris de McDonald 2010.
- Pacients d'anestèsia espinal i altres malalties neurològiques no inflamatòries considerats com a controls segons les definicions consens de BioMS (Teunissen, C., et al, 2013).
- Pacients portadors de EBV valorat per la presència de EBNA-1.
- Ètnia caucàsica.

UNIEM té una col·lecció de mostres, recollides des de 2011, per tots els seus projectes d'investigació conservades a -80°C i codificades mitjançant un codi numèric per tal de mantenir l'anonimat dels pacients.

Aquest estudi s'ha dut a terme segons el Codi de Bones Pràctiques en la Recerca de l'Institut de recerca biomèdica de Girona i ha estat revisat i aprovat pel Comitè Ètic de Investigació Clínica (CEIC) de l'Hospital Josep Trueta. Tots els pacients van signar el consentiment informat sobre el projecte conjuntament amb la seva contribució voluntària abans de la recol·lecció de les mostres. S'han respectat tots els principis fonamentals de la Declaració d'Hèlsinki (1975), així com la confidencialitat de les dades personals i les normes ètiques sobre els estudis clínics. El tractament, la comunicació i la cessió de les dades de caràcter personal de tots els participants s'ajusta a la Llei Orgànica 15/1999, de 13 de desembre de protecció de dades de caràcter personal. Aquest projecte ha estat finançat per l'ISC-III (PI13/01782) i també per l'empresa *Friselva S.A.*

Per a cada una de les tècniques emprades, els residus i el material corresponent, així com els fluids humans i els residus tòxics, han estat dispensats als contenidors especialitzats.

3.2 Variables clíniques i radiològiques

L'estudi dels miRNAs està complementat amb un seguit de variables clíniques que també es relacionen amb la malaltia com són els bandes oligoclonals IgG (BOCG), les bandes oligoclonals IgM lipido-específiques (BOCM-LE), la vitamina D (VitD) i el tabaquisme.

Les BOCG obtingudes a partir de líquid cefaloraquídi (LCR) són una forma sensible i específica per demostrar síntesi intratecal d'immunoglobulina G (IgG). La presència de dues bandes en LCR no presents en sèrum indica síntesi intratecal d'IgG i té lloc en el 96% de pacients d'EM per aquest motiu s'ha convertit en un biomarcador pel diagnòstic d'EM (Villoslada, 2010).

Les BOCM-LE també obtingudes a partir del LCR ajuden a predir l'aparició de nous brots, una pitjor evolució de la malaltia i una major probabilitat de conversió dels CIS a EM .

S'han recollit els nivells de vitamina D en el moment de l'analítica per l'associació a l'EM com a factor ambiental que aquest representa. S'ha determinat el nivell de 25(OH) D, un precursor estable de la VitD mitjançant electroquimioluminiscència en el laboratori clínic de l'hospital Santa Caterina de Salt. Els nivells de VitD s'han classificat en dues categories: deficiència (0-30ng/mL) i suficiència (>30ng/mL).

El tabac és un alt factor de risc en moltes malalties, entre elles l'EM. El fum del tabac causa estrès oxidatiu i respostes pro-inflamatòries a les cèl·lules dels pulmons on hi ha presents moltes cèl·lules autoimmunes de memòria, les quals poden estimular-se i acabar afectant el CNS (Hedström, Bäärnhielm, Olsson, & Alfredsson, 2011)..

3.3 Selecció dels miRNAs candidats a analitzar

Mirant a la base de dades miRBase es va fer un llistat de tots els miRNAs d'EBV que es coneixen per tal de seleccionar quins d'aquests serien més interessants d'analitzar. Els criteris per escollir els candidats a ser analitzats d'entre els 44 miRNAs totals va ser en funció de les seves dianes o *targets* extretes de la base de dades VIRmiRNA (Qureshi, Thakur, Monga, Thakur, & Kumar, 2014) i es van escollir aquells que presenten com a diana gens de susceptibilitat per EM descrits prèviament (Oksenberg & Baranzini, 2010). Es va fer aquesta prioritització tenint en compte la funció reguladora dels miRNAs pensant que la seva funció podria estar relacionada amb el desenvolupament de la malaltia. Durant l'estada he après a examinar la funció i la implicació dels gens.

URL de la base de dades miRBase: www.mirbase.org

URL de la base de dades VIRmiRNA: <http://crdd.osdd.net/servers/virmirna/>

3.4 Selecció dels normalitzadors

És clau, per a una bona interpretació dels nivells dels miRNAs d'interès, una estratègia de normalització adequada. S'acostuma a utilitzar més d'un normalitzador endogen el qual s'expressi de forma uniforme en el teixit o cèl·lula d'interès, que tingui una extracció i una quantificació eficient i que es mantingui estable durant l'emmagatzematge de les mostres, ja que l'expressió dels diferents miRNAs varia en funció del teixit o fluids corporals, entre individus i sota diferents condicions experimentals.

Per a fer una selecció dels normalitzadors endògens a utilitzar en aquest estudi s'ha tingut en compte el tipus de mostra de la qual es partia ja que l'expressió de miRNAs cel·lulars humans difereix lleugerament en funció del teixit o mostra del qual s'extreu (Peltier & Latham, 2008). Per tal de trobar els normalitzadors més adients d'entre els escollits per la casa *Applied biosystems*, d'expressió relativament estable, s'ha fet una selecció dels hsa-miRNAs següents:

Taula 1. Normalitzadors escollits per la casa *Applied biosystems* per a diferents tipus de mostres biològiques.

Teixits humans	Sèrum i plasma
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-16-5p
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-24
hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-126-3p
hsa-miR-191-5p	hsa-miR-191-5p
	hsa-miR-484

Per dur a terme aquest projecte s'han escollit els miRNAs: hsa-miR-16-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-103a-3p i hsa-miR-191-5p com a normalitzadors tant per a les mostres de plasma com per a les de BC.

Per tal de procedir amb l'anàlisi dels resultats els valors obtinguts s'han normalitzat amb els normalitzadors cel·lulars anteriorment descrits, aplicant la fórmula següent:

$$R = 2^{-[Ct \text{ mostra} - Ct \text{ mitjana dels normalitzadors}]} \rightarrow R = 2^{-Ct}$$

3.5 Obtenció de les mostres, aïllament i purificació de l'RNA total

S'han seleccionat 76 mostres de plasma i 75 de capa leucocitària o *buffy coat* (BC) d'un total de 76 pacients (45 controls i 31 pacients amb EM). La col·lecció de mostres d'UNIEM s'obté a partir d'extraccions de sang per punció venosa per part d'un infermer i recollides en un tub d'extracció de sang de 10mL amb anticoagulant EDTA (BD Vacutainer™). El plasma i el BC s'aconsegueix un cop centrifugats els tubs d'extracció a 19°C, 2000g durant 10 minuts. Es separen el plasma i el BC i es conserven les mostres a -80°C per posteriorment ser analitzades.

L'extracció dels miRNAs de les mostres es realitza amb el kit d'extracció de miRNA *mirVana™ PARIS™* RNA (*Applied Biosystems*) seguint les instruccions del protocol establert (fig. 2).

Es parteix d'un volum 300µL de plasma o BC i 300µL de *2x Denaturing Solution*. S'afegeix un volum de 600µL de Fenol àcid:Cloroform i es vorteja durant aproximadament 60s. Després de deixar reposar la solució 2-3 minuts i centrifugar durant 10 minuts a $\geq 10,000g$ a temperatura ambient s'observen dues fases. La fase superficial (cloromform+aigua) contenint l'RNA total, es transfereix a un nou tub de microcentrífuga al qual se li addiciona un volum de 1.25 d'etanol absolut. Després de tres etapes de rentat amb els tampons i les centrifugacions corresponents s'elueix la mostra amb aigua RNasa-free pre-escalfada a 95°C amb un volum total de 40µL.

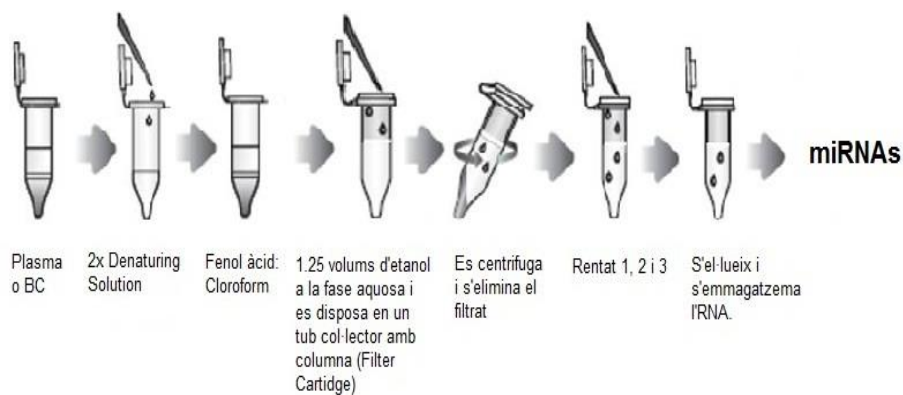


Figura 2. Protocol adaptat de *mirVana™* miRNA Isolation Kit

Finalment es quantifiquen amb el NanoDrop® les concentracions de les mostres de BC extretes per tal de partir de la mateixa quantitat d'RNA (10µg segons el protocol a seguir).

3.6 Síntesis de DNA complementari (cDNA)

Pel procés de preparació de les mostres es segueix el protocol de *TaqMan Advanced miRNA Assays*, (*Applied Biosystems*), que consta de 4 etapes totals:

3.6.1 Addició d'una cua Poly (A)

La poliadenilació és mètode enzimàtic el qual consisteix en addicionar una polimerasa poly-A que afegeix una cua poli-A a l'extrem 3' dels miRNAs madurs de la mostra d'RNA total amb l'objectiu de millorar l'eficiència de la reacció. Aquesta etapa permet agilitzar el clonatge dels productes de la PCR utilitzant l'extensió a partir d'una sola base A (adenosina) per complementaritat amb la T (timidina).

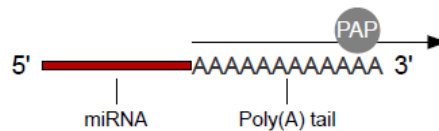


Figura 3. Reacció de lligació d'una cua poli-A al miRNA madur. Obtingut del protocol de TaqMan® *Advanced miRNA Assays User Guide* (Single-tube Assays)

Es prepara una màster mix pel total de mostres, i un cop homogeneïtzada, s'afegeix, a cada pou d'una placa de 96: 3µL de mix i 2µL de mostra d'RNA. Els components de la màster mix es troben a la taula 2. Seguidament s'introdueix la placa al termociclador amb el programa següent (fig. 4):

Taula 2. Reacció de poliadenilació	
Components de la mix	Volum (µL)/Rx
Buffer 10X Poly(A)	0.5
ATP	0.5
Enzim Poly A	0.3
Aigua RNAsa-free	1.7
Volum total	3

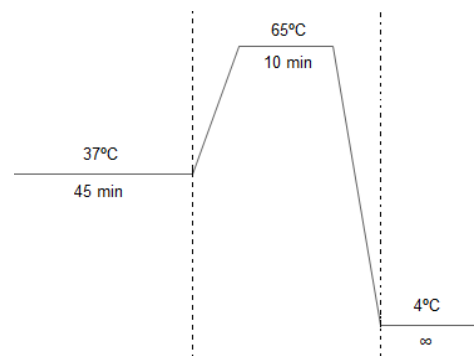


Figura 4. Programa del termociclador per a l'etapa de lligació de la cua poli-A

3.6.2 Lligació

En aquesta etapa, s'afegeix una seqüència extra als miRNAs (un adaptador), necessària per reconèixer específicament els miRNAs madurs que hi ha presents a la mostra i que facilitarà la retrotranscripció i l'amplificació en etapes posteriors.



Figura 5. Reacció de lligació d'un adaptador als miRNAs madurs. Obtingut del protocol de TaqMan® *Advanced miRNA Assays User Guide* (Single-tube Assays)

Es prepara una segona màster mix pel total de mostres i s'afegeixen, a cada pou de la placa de 96, 10µL de mix. Els components de la màster mix es recullen a la taula 3. Després de vortejar per homogeneïtzar els components es posa la placa al termociclador amb el programa següent (fig. 6):

Components de la mix	Volum (µL)/Rx
Buffer 5X DNA lligasa	3
50% PEG 8000	4.5
Adaptador de lligació 25X	0.6
RNA lligasa	1.5
Aigua RNAsa-free	0.4
Volum total	10

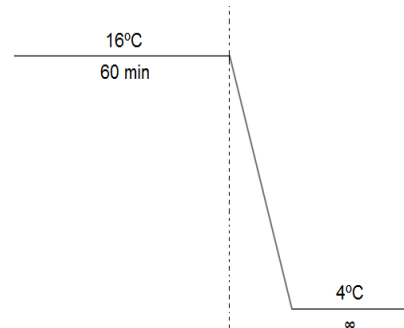


Figura 6. Programa del termociclador per a l'etapa de lligació de l'adaptador

3.6.3 Retrotranscripció (RT)

L'àcid ribonucleic (RNA) és una molècula químicament inestable i susceptible a ser fàcilment degradada per RNAses, un tipus d'enzims molt abundants en els ambients de treballs, especialment en els humans.

L'extracció de l'RNA total, acostuma a contenir diferents molècules d'RNA com subunitats d'rRNA, mRNA, tRNA i altres RNAs petits (*Bitesize Bio, 2017*). En aquest estudi, els RNAs d'interès són els miRNAs.

La retrotranscripció permet, a partir d'un enzim, sintetitzar DNA complementari (cDNA), el qual és molt més estable, de les molècules de RNA. S'afegeixen a la mix uns *primers* universals de RT que reconeixen les seqüències universals presents als extrems ampliat 3' (etapa de poliadenilació) i 5' (etapa de lligació) dels miRNAs, de manera que tots els miRNAs madurs de la mostra es transcriuen a cDNA.



Figura 7. Etapa de retrotranscripció dels miRNAs madurs. Obtingut del protocol de TaqMan® *Advanced miRNA Assays User Guide* (Single-tube Assays)

Es prepara una màster mix pel total de mostres i s'afegeix, a cada pou de la placa de 96, 15µL de mix. Els components de la màster mix es troben a la taula 4. Després de vortejar per homogeneïtzar els components es posa la placa al termociclador amb el programa següent (fig. 8):

Taula 4. Reacció de retrotranscripció	
Components de la mix	Volum (µL)/Rx
<i>Buffer 5X RT</i>	6
Mix de dNTP (25mM cada un)	1.2
Primers 20X RT Universals	1.5
Mix d'enzim 10X RT	3
Aigua RNAsa-free	3.3
Volum total	15

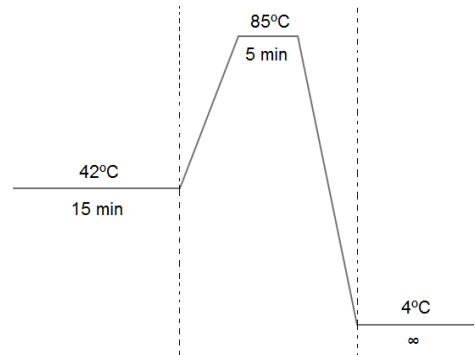


Figura 8. Programa del termociclador per a l'etapa retrotranscripció

3.6.4 Amplificació

Per tal de millorar la detecció dels miRNAs que es puguin expressar a nivells baixos i mantenir així els nivells relatius d'expressió diferencials, s'amplifica el cDNA de manera uniforme a partir dels primers miR-Amp universals. Aquests primers universals reconeixen els seqüències que prèviament s'han afegit als extrems 3' i 5' dels miRNAs madurs.

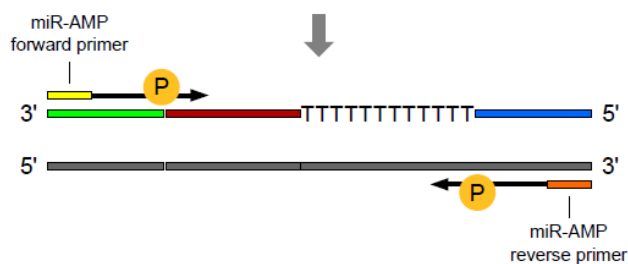


Figura 9. Reacció d'amplificació del miRNA madur. Obtingut del protocol de TaqMan® *Advanced miRNA Assays User Guide* (Single-tube Assays)

Seguidament es prepara una màster mix pel total de mostres i s'afegeix, a cada pou d'una nova placa de 96: 45µL de mix de reacció d'amplificació i 5µL del producte de la reacció de retrotranscripció. Els components de la màster mix es troben a la taula 5. Després de vortejar per homogeneïtzar els components es posa la placa al termociclador amb el programa següent (fig.10):

Taula 5. Reacció d'amplificació	
Components de la mix	Volum (µL)/Rx
Master Mix miR-Amp 2X	25
Primer Mix miR-Amp 20X	2.5
Aigua RNAsa-free	17.5
Volum total	45

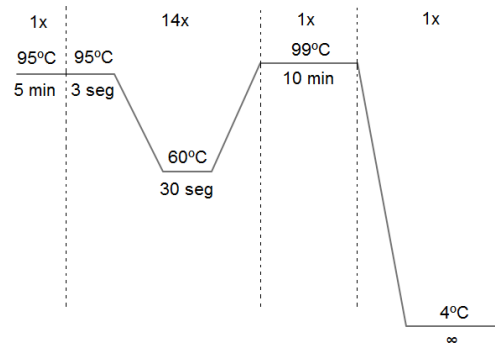


Figura 10. Programa del termociclador en l'etapa d'amplificació

3.7 Quantificació dels miRNAs

La detecció dels miRNAs d'interès es fa a partir de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que consisteix en a mesurar quantitativament a temps real l'amplificació del cDNA utilitzant sondes fluorescents.

S'ha utilitzat la tecnologia TaqMan qRT-PCR la qual per a la detecció emprava una sonda que s'aparella complementàriament a una regió del miRNA específica entre els primers forward i revers formada per una molècula reporter (FAM) a l'extrem 5' de la sonda, i un quencher no fluorescent (NFQ) i una minor groove binder (MGB) a l'extrem 3'. Durant la PCR, els primers forward i reverse s'uneixen a les seqüències complementàries al llarg dels fragments de cDNA per amplificar els miRNAs.

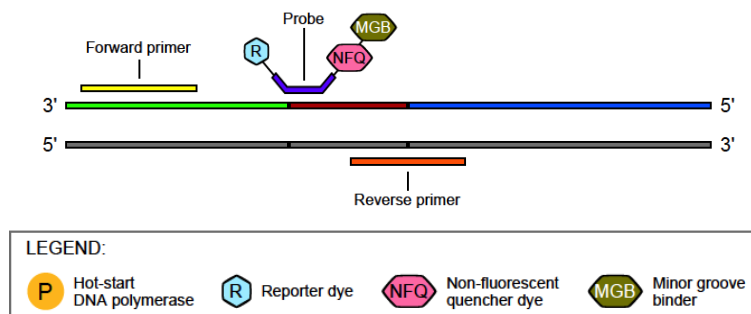


Figura 11. Etapa d'anellament de la sonda i els primers al miRNA. TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (Single-tube Assays)

La finalitat d'aquesta tècnica es troba en què quan la sonda està intacta unida al miRNA, la proximitat del reporter amb el quencher anul·la la fluorescència del reporter. En l'etapa de polimerització, la polimerasa de DNA desestabilitza la sonda, la trenca, i permet que el reporter emeti fluorescència quan es separa del quencher.

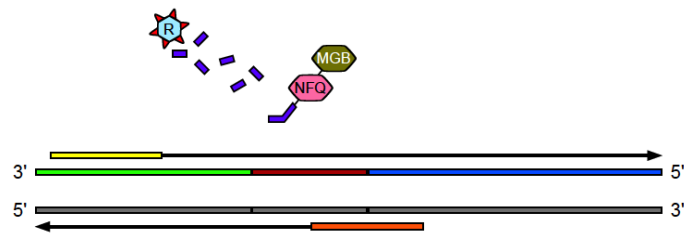


Figura 12. Etapa final de la polimerització. L'enzim fragmenta la sonda, separa el *quencher* del *reporter* i permet detectar l'amplificació dels fragments per emissió de fluorescència. TaqMan® *Advanced miRNA Assays User Guide* (Single-tube Assays)

Per tal de realitzar la qRT-PCR es prepara una dilució 1:10 de les mostres de cDNA obtingudes en l'etapa d'amplificació. Posteriorment es prepara la mix amb els components que es recullen a la taula 6 pel total de mostres i s'afegeixen a cada pou d'una placa de 384 pous 10µL totals: 7.5µL de la mix i 2.5µL de les dilucions 1:10. Es fa córrer el programa Fast amb l'equip QuantStudio™ 7 Flex System, el qual calcula la concentració dels miRNAs amb el valor de doble CT ($\Delta\Delta CT$).

Taula 6. Quantificació dels miRNAs	
Components de la mix	Volum (µL)/Rx
<i>Fast Advanced Master Mix</i>	5
<i>Advanced TaqMan assay</i>	0.5
Aigua RNAsa-free	2
Volum total	7.5

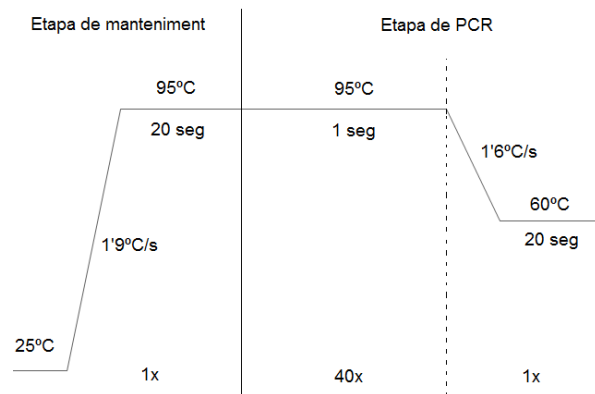


Figura 13. Programa del termociclador en la reacció de detecció dels ebv-miRNAs en una qRT-PCR.

3.8 Estadística

Per comprovar si hi ha diferències significatives entre els dos grups de pacients estudiats es realitza un anàlisi estadístic mitjançant el programa *IBM SPSS Statistics 21*.

Pel fet que els valors normalitzats de l'expressió dels miRNAs no segueixen una distribució normal, l'expressió dels ebv-miRNAs s'han avaluat amb el test no paramètric *U-Mann Whitney*. Les variables numèriques com l'edat que segueixen una distribució normal s'han avaluat amb el test t-Student. Les variables categòriques (sexe, tabac, nivells de VitD, BOCiG, BOCiG-M-LE i HLADRB 15/3) s'han analitzat pel test de *Fisher* o test de *Pearson* en funció del nombre d'individus a cada grup.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Demografia

La cohort del projecte consisteix en un total de 76 pacients; dels quals 45 són controls (No EM) i els 31 restants són pacients d'EM. A la taula 6 es descriuen les variables ambientals, bioquímiques i genètiques relacionades amb l'EM.

Taula 6. Variables clíniques relacionades amb l'EM

Variables	No EM		EM		p valor
	n	Percentatge (%)	n	Percentatge (%)	
Sexe					0.161
Homes	17	37.8	7	22.6	
Dones	28	62.2	24	77.4	
Edat	39.18 ± (12.42)		38.74 ± (11.28)		0.876
Tabac					0.301
Fumadors	12	38.7	7	25.9	
No fumadors	19	61.3	20	74.1	
Nivells VitD					0.027
Dèficit	25	80.6	26	100	
Suficiència	6	19.4	0	100	
BOCIgG					<0.001
Absència	31	96.9	3	10.3	
Presència	1	3.1	26	89.7	
BOCIgM-LE					0.011
Absència	30	96.8	21	72.4	
Presència	1	3.2	8	27.6	
HLA-DRB1 15/3					0.002
No	23	76.7	10	37.0	
Si	7	23.3	17	63.0	

Per a les variables numèriques s'indica mitjana i desviació estàndard. S'han avaluat les diferències amb el test t-Student. Per a les variables categòriques s'indica el nombre d'individus a cada grup i el % que representen. Les diferències s'han avaluat amb el test *Chi quadrat*.

Tot i no trobar diferències significatives per a la variable sexe entre els dos grups d'estudi, tal i com s'ha mencionat anteriorment (*Harbo et al., 2013*), entre els pacients d'EM la freqüència de dones afectades respecte els homes és de 2-3 vegades més elevada (fig. 14).

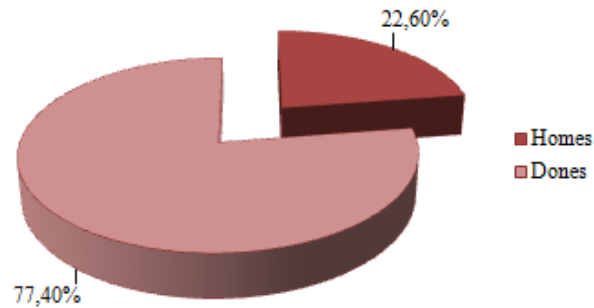


Figura 14. Representació gràfica del nombre de dones respecte els homes afectats d'EM. S'observa que es manté la proporció esperada (3-2:1) en la nostra població d'estudi.

Cal comentar que les diferències significatives entre No EM i EM obtingudes per a la resta de variables estudiades eren d'esperar. Tots els pacients d'EM tenen nivells baixos de VitD (deficiència), no obstant, més del doble dels pacients No EM també presenten insuficiència. Pel que fa a les bandes oligoclonals de IgG i IgM-LE, com són marcadors de diagnòstic per la malaltia, també són molt més predominants en afectats d'EM. La presència del genotip HLADRB*15:01 i/o HLADRB*03 és el més àmpliament conegut com a gen de susceptibilitat a EM per això també s'esperava obtenir una proporció més elevada de portadors d'aquest al·lel en pacients d'EM. Veient que no s'observen diferències significatives entre els grups d'estudi per a la variable d'edat se segueix amb l'anàlisi dels miRNAs.

4.2 Selecció miRNAs candidats a analitzar

Del total de 44 miRNAs presents en EBV es selecciona un grup reduït, les dianes dels quals són gens de susceptibilitat a EM (Oksenberg et al., 2010). Els 8 miRNAs seleccionats i les seves dianes es recullen a la taula 7:

Taula 7. Llistat de 8 dels 44 miRNAs d'EBV analitzats a l'estudi

miRNA	Targets
	MALT1
Ebv-miRBHRF-1-2-5p	MYC
	BACH2
	RGS1
Ebv-miRBART1-3p	TNFAIP3
Ebv-miRBART1-5p	CLEC16A
	MAPK1
Ebv-miRBART5_-1_5	MYC
	MYC
Ebv-miRBART6-5p	STAT3
	FOXP1
	MAPK1
Ebv-miRBART7	TET2
	EVI5
	IKZF1
	SLAMF7
Ebv-miRBART19-3p	ZFP36L1
Ebv-miRBART22	RGS1

Els processos biològics en els que participen els gens diana dels miRNAs es recullen a la taula 8:

Taula 8. Dianes dels ebv-miRNAs candidats a analitzar

	Gen diana	Procés/processos biològic(s) implicat(s)
BACH2	<i>BTB domain and CNC homolog 2</i>	Regulació de la transcripció
CLEC16A	<i>C-type lectin domain containing 16A</i>	Autofàgia
EVI5	<i>Ecotropic viral integration site 5</i>	Activació de l'activitat GTPasa
FOXP1	<i>Forkhead box P1</i>	Regulació negativa del procés d'apoptosi de cèl·lules B Regulació de la resposta inflamatòria Diferenciació de cèl·lules T helper Regulació de la producció del factor de necrosi tumoral Activació dels macròfags
IKZF1	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>	Diferenciació dels limfòcits Cicle cel·lular
MALT1	<i>MALT1 lymphoma-associated translocation</i>	Activació de l'activitat quinasa dels inductors NF-kappaB Diferenciació de cèl·lules B-1 B Participació en la resposta immune innata
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	Procés d'apoptosi; Via de senyalització del receptor de cèl·lules B Regulació positiva de la proliferació cel·lular Via de senyalització de receptor cèl·lules T fol·liculars Procés viral
MYC	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>	Regulació negativa del procés d'apoptosi
RGS1	<i>Regulator of G protein signaling 1</i>	Via de senyalització del receptor d'inhibició de l'adenilat ciclasa acoblada de la proteïna G Participació en la resposta immune
SLAMF7	<i>SLAM family member 7</i>	Resposta immune adaptativa L'adhesió cel·lular Activació de les cèl·lules assassines naturals
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	Resposta de fase aguda La proliferació cel·lular Participa en la resposta inflamatòria miRNA inhibició de la traducció intervinguda Procés viral
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>	Cicle cel·lular; Desmetilació de l'ADN
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3</i>	Procés d'apoptosi; homeòstasi de cèl·lules B-1 B Regulació negativa de la resposta inflamatòria Regulació negativa de la ruta de senyalització de CD40 Regulació de la resposta inflamatòria
ZFP36L1	<i>ZFP36 ring finger protein like 1</i>	Procés d'apoptosi La proliferació cel·lular La resposta cel·lular al factor de necrosi tumoral Regulació de la diferenciació de cèl·lules B

URL: <https://www.nextprot.org/>

4.3 Anàlisi dels miRNAs

Taula 9. Percentatge d'amplificació de cada un dels miRNAs pel total de mostres

miRNAs	% BC	% P
Ebv-miRBHRF-1-2-5p	1.74	0
Ebv-miRBART1-3p	3.91	0
Ebv-miRBART1-5p	0	0
Ebv-miRBART5_-1_5	0	0
Ebv-miRBART6-5p	2.17	0
Ebv-miRBART7	0.43	0
Ebv-miRBART19-3p	2.17	0
Ebv-miRBART22	100	96.96

A la taula 9 es recullen els miRNAs analitzats i el percentatge d'amplificació de cadascun d'ells en les mostres emprades. S'analitzen en els dos tipus de mostra per tal de determinar si l'expressió d'aquests miRNAs és detectada únicament en cèl·lules (BC), i per tant treballen o actuen a nivells del mecanisme de les cèl·lules B, o bé, si es troba circulat (detecció en plasma) i per tant pot afectar a altres cèl·lules del sistema.

L'únic que es tindrà en compte per a l'anàlisi dels resultats és el ebv-miRBART22, ja que ha amplificat tant en les mostres de BC com les de plasma.

Per tal de seguir l'anàlisi estadístic del ebv-miRBART22, es fa una prova de normalitat amb el mètode Kolmogorov-Smirnov:

Taula 10. Resultats estadístics de la prova de normalitat amb el test de Kolmogorov-Smirnov

miRNA	<i>p</i> valor	Observació
BART22_BC	0.001	Distribució no normal
BART22_Plasma	<0.001	Distribució no normal

Degut a què els valors normalitzats de l'expressió dels miRNAs no presenten una distribució normal s'utilitzaran mètodes no paramètrics per a l'estudi de les dades.

Com a objectiu principal de l'estudi es procedeix a determinar si hi ha diferents nivells d'expressió del ebv-miRBART22 entre pacients No EM i EM:

Taula 11. Estudi de la diferència d'expressió de ebv-miRBART22 entre No EM i EM.

	No EM (n=35)	EM (n=23)	p valor
ebv-miRBART22 BC	0.195 (0.134)	0.248(0.460)	0.950
ebv-miRBART22 Plasma	0.222 (0.482)	0.462 (0.572)	0.690

S'utilitza el test estadístic U-Mann Whitney. Es donen els valors de mediana (rang interquartilic).

No s'observen diferències estadísticament significatives entre pacients No EM i EM. Encara que el virus d'EBV és un factor de risc en EM, els resultats obtinguts fins ara en aquest estudi no ens permeten relacionar l'expressió d'aquest ebv-miRNA amb el desenvolupament de la malaltia.

4.4 Relació amb variables clíniques

Es planteja analitzar si hi ha diferent expressió del ebv-miRBART22 relacionat amb altres variables clíniques recollides associades a l'EM:

Taula 12. Estudi de la diferència d'expressió del ebv-miRBART22 en *buffy coat* (BC) i plasma (P) relacionat amb algunes variables clíniques.

	n	BART22 (BC)	p valor	BART22 (P)	p valor
Sexe			0.757		0.349
Home	17	0.199 (0.101)		0.278 (0.604)	
Dona	41	0.206 (0.189)		0.306 (0.440)	
BOCG			0.570		0.127
BOCG-	24	0.221 (0.145)		0.274 (0.454)	
BOCG+	22	0.201 (0.416)		0.495 (0.736)	
BOCM-LE			0.923		0.174
BOCM-LE-	39	0.207 (0.179)		0.319 (0.481)	
BOCM-LE+	7	0.248 (204)		0.757 (1.703)	
VitD			0.082		0.385
Deficiència	36	0.307 (0.353)		0.426 (0.597)	
Suficiència	5	0.123 (0.087)		0.125 (0.554)	
HLADRB15/3			0.973		0.316
No	23	0.207 (0.166)		0.387 (0.632)	
Sí	21	0.226 (0.442)		0.393 (0.930)	
Tabaquisme			0.387		0.059
No fumadors	14	0.159 (0.457)		0.223 (0.370)	
Fumadors	30	0.240 (0.117)		0.488 (0.614)	

S'utilitza el test estadístic U-Mann Whitney. Es donen els valors de mediana (rang interquartilic).

En la taula 12 s'observa que no s'han obtingut diferències significatives entre l'expressió d'aquest miRNA del virus i el fet de presentar de les variables bioquímiques, genètiques i ambientals relacionades amb la malaltia. No obstant, el p valor de la variable Tabaquisme mostra una tendència a la significació ($p=0.059$) mostrant nivells més elevats de ebv-miRBART22 entre els individus fumadors.

Es planteja la hipòtesi que el tabac pot afectar de manera diferent a pacients amb EM pel què fa a l'expressió de ebv-miRBART22 (taula 13):

Taula 13. Estudi de la diferència d'expressió entre fumadors i no fumadors per grups d'individus.

	No EM			EM		
	n	BART22 (BC)	BART22 (P)	n	BART22 (BC)	BART22 (P)
p valor		0.367	0.301		0.668	0.149
No fumadors	9	0.124 (0.171)	0.172 (0.467)	5	0.644 (0.959)	0.319 (0.791)
Fumadors	16	0.229 (0.117)	0.430 (0.560)	14	0.250 (0.307)	0.585 (1.568)

S'utilitza el test estadístic U-Mann Whitney. Es donen els valors de mediana (rang interquartílic).

No s'observa diferent expressió del ebv-miRBART22 relacionada amb el tabac en el grup No EM ni en el de pacients amb EM.

També es va estudiar si l'expressió de ebv-miRBART22 es comportava diferent entre homes i dones en relació amb el tabac:

Taula 14. Taula de contingència de les variables categòriques sexe i tabac

Sexe	Tabac	
	No fumadors	Fumadors
Home	$n = 4$	$n = 13$
Dona	$n = 15$	$n = 26$

En aquesta fase de l'anàlisi la n d'estudi és molt reduïda la qual no ens permet realitzar càlculs estadístics per a la població masculina. Així doncs, es fa un càlcul estadístic entre el fet de fumar o no i el de ser dona.

Taula 15. Estudi de la diferència d'expressió entre dones fumadores i no fumadores.

DONES	n	BART22 (BC)	BART22 (P)
p valor		0.547	0.010
No fumadors	13	0.124 (0.487)	0.182 (0.282)
Fumadors	20	0.240 (0.155)	0.530 (1.118)

S'utilitza el test estadístic U-Mann Whitney. Es donen els valors de la mediana i el rang interquartílic.

Els resultats obtinguts en aquest anàlisi mostren com el fet de fumar, en dones, està relacionat a un augment de l'expressió del ebv-miRBART22 (fig. 15).

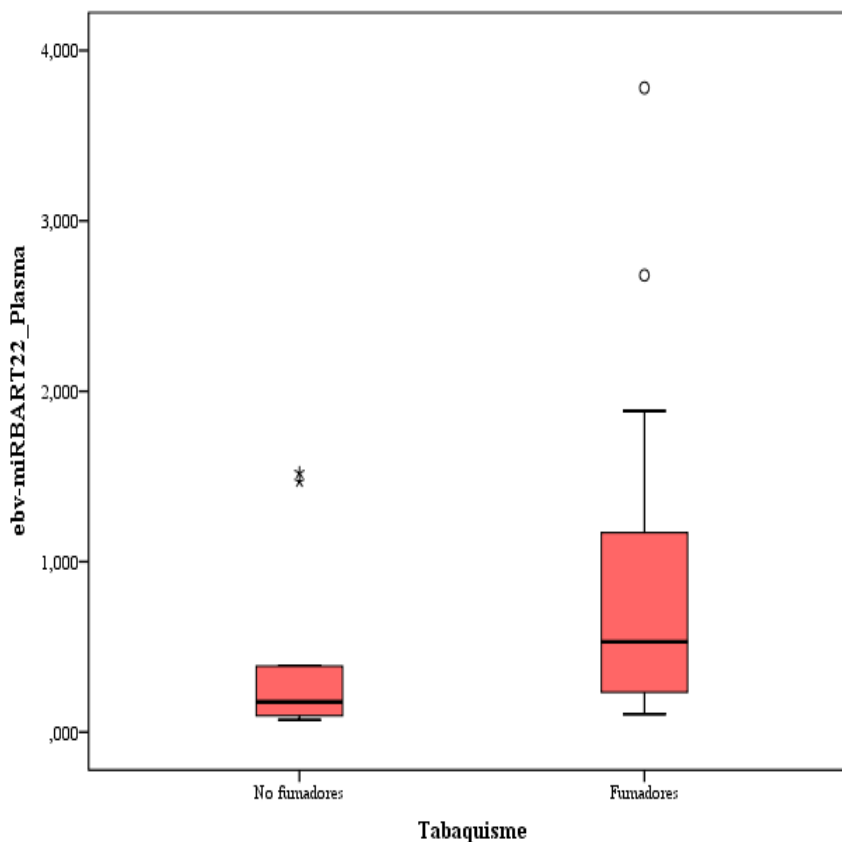


Figura 15. Diagrama de caixes. Representa la distribució significativa entre el fet de ser dona fumadora o no fumadora i l'expressió del ebv-miRBART22. La caixa rectangular està dividida per un segment horitzontal que indica la mediana i la seva relació amb els quartils (primer i tercer). Sobre la caixa es mostren els extrems, els bigotis, que tenen un límit de prolongació (valors mínim i màxim) de la variable.

Finalment l'anàlisi estadístic a realitzar dins la cohort femenina és si el fet de fumar contribueix a desenvolupar EM (taula 16):

Taula 16. Resultats estadístics correlacionant l'expressió de ebv-miRBART22 i la variant Tabaquisme en les dones No EM i EM.

	Dones No EM			Dones EM		
	n	BART22 (BC)	BART22 (P)	n	BART22 (BC)	BART22 (P)
p valor		0,447	0,130		0,603	0,102
No fumadors	8	0,113 (0,198)	0,149 (0,256)	5	0,644 (0,959)	0,319 (0,791)
Fumadors	8	0,243 (0,139)	0,477 (1,160)	12	0,212 (0,248)	0,585 (1,294)

S'utilitza el test estadístic U-Mann Whitney. Es donen els valors de la mediana i el rang interquartilic.

Els resultats no mostren relació entre el tabaquisme i l'expressió del ebv-miRBART22 en dones. Es pot observar que el grau d'expressió de ebv-miRBART22 en plasma és més elevat en dones fumadores que en no fumadores tot i que no es troben diferències significatives, possiblement degut al baix nombre d'individus a cada grup.

Entre les possibles dianes de ebv-miRBART22 trobem RGS1 (taula 7). El gen RGS1, ha estat associat a malalties autoimmunes com l'artritis i la psoriasis (Perga et al., 2015) i categoritzat com a gen anti-inflamatori. Aquest gen codifica per una proteïna de la família RGS (G-protein signaling). RGS és una família de proteïnes implicades en la migració dels limfòcits i que poden influir en el transport cel·lular tant durant el desenvolupament del sistema immune com en les respostes contra agents externs o infecciosos. Alguns estudis porten a especular que alteracions en aquest gen poden dificultar la mobilitat de les cèl·lules B i per tant, impedir que arribin al SNC (The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), 2010).

Analitzar l'expressió d'aquesta proteïna seria interessant per conèixer si els seus nivells estan disminuïts en individus fumadors que han presentat nivells més alts d'aquest miRNA.

Finalment, caldria ampliar el nombre de ebv-miRNAs a estudiar per observar noves dianes possibles i nous mecanismes de regulació del virus d'EBV.

Les infeccions d'EBV i el fet de ser fumador són factors de risc per EM malgrat desconèixer els mecanismes pels quals exerceixen la seva susceptibilitat. Els resultats d'aquest estudi proposen que el fet de fumar pot modular el comportament d'EBV suggerint un possible mecanisme d'acció del tabac sobre la salut.

5. CONCLUSIONS

1. To carry out the study, 8 out of 44 ebv-miRNAs were selected: ebv-miRBART1-3p, ebv-miRBART1-5p, ebv-miRBART_-1_5p, ebv-miRBART6-5p, ebv-miRBART7, ebv-miRBART19-3p ebv-miRBART22 and ebv-miRBHRF1-2-5p due to the association of their targets to MS.
2. ebv-miRBART22 was the only ebv-miRNA out of 8 detected in all patients in both buffy coat and plasma samples.
3. evb-miRBART22 did not show different expression pattern between MS patients and controls.
4. The biochemical and genetic analyzed parameters associated to MS showed no differential expression of ebv-miRBART22; VitD ($p=0.385$), BOCiG ($p=0.127$), BOCiGM-LE ($p=0.174$), HLA-DRB1*15:01 i/o *03 ($p=0.316$) and cigarette smoking ($p=0.059$). Only cigarette smoking demonstrated slightly tendency to higher expression.
5. ebv-miRBART22 showed overexpression in smoker women.

6. BIBLIOGRAFIA

- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P., Roizman, B., Whitley, R. And Yamanishi, K. (2007). *Human Herpesviruses*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bitesize Bio. (2017). *qPCR: RNA quality and why it matters - Bitesize Bio*. [online] Available at: <http://bitesizebio.com/20778/the-importance-of-rna-quality/> [Accessed 16 Apr 2017].
- Cameron, J. E., Fewell, C., Yin, Q., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., & Flemington, E. K. (2008). Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.018>
- Dittfeld, A., Gwizdek, K., Michalski, M., & Wojnicz, R. (2016). A possible link between the Epstein-Barr virus infection and autoimmune thyroid disorders, *41*(3), 297–301. <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.63130>
- Giudice, A., Arena, G. D., Crispo, A., Tecce, M. F., Nocerino, F., Grimaldi, M., ... Montella, M. (2016). Role of Viral miRNAs and Epigenetic Modifications in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinogenesis, *2016*.
- Harbo, H. F., Gold, R., & Tintoré, M. (2013). Sex and gender issues in multiple sclerosis, 237–248. <https://doi.org/10.1177/1756285613488434>
- Hedström, A., Bäärnhelm, M., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2011). Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, *17*(7), 788–793. <https://doi.org/10.1177/1352458511399610>
- Hurwitz, B. J. (2009). The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes. *Ann Indian Acad Neurol Oct-Dec*., *12*(4), 226–230. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.58276>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2010). IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes and immunity*, *11*(5), 397.
- Kingwell, E., Marriott, J. J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S. A., ... Marrie, R. A. (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurology*, *13*. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-128>
- Koch, M. W., Metz, L. M., & Kovalchuk, O. (2013). Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, *9*(1), 35–43. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.226>
- Leahy, H., & Garg, N. (2013). Radiologically Isolated Syndrome: An Overview. *Neurological Bulletin*, 22-26. http://dx.doi.org/10.7191/neurol_bull.2013.1044
- Oksenberg, J. R., Oksenberg, J. R., & Baranzini, S. E. (2010). Multiple sclerosis genetics—is the glass half full, or half empty? *Nature Publishing Group*, *6*, 429–437. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.91>
- Okuda, D., Mowry, E., Beheshtian, A., Waubant, E., Baranzini, S., Goodin, D., ... Pelletier, D. (2009). Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*, *72*(9), 800–5.
- Peltier, H. J., & Latham, G. J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna*, *14*(5), 844–852. <https://doi.org/10.1261/rna.939908>
- Perga, S., Montarolo, F., Martire, S., Berchiolla, P., Malucchi, S., & Bertolotto, A. (2015). Anti-in fl

- ammatory genes associated with multiple sclerosis: A gene expression study. *Journal of Neuroimmunology*, 279, 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.01.004>
- Price, A. M., & Luftig, M. A. (2015). To Be or Not Iib: A Multi-Step Process for Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Consequences for B Cell Tumorigenesis. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004656>
- Qureshi, A., Thakur, N., Monga, I., Thakur, A., & Kumar, M. (2014). VIRmiRNA: a comprehensive resource for experimentally validated viral miRNAs and their targets. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1093/database/bau103>
- Teunissen, C., Menge, T., Altintas, A., Álvarez-Cermeño, J., Bertolotto, A., Berven, F., Brundin, L., Comabella, M., Degen, M., Deisenhammer, F., Fazekas, F., Franciotta, D., Frederiksen, J., Galimberti, D., Gnanapavan, S., Hegen, H., Hemmer, B., Hintzen, A. (2013). Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarkers in MS 2013. *Multiple Sclerosis Journal*. <https://doi.org/10.1177/1352458513488232>
- Tufekci, K. U., Oner, M. G., Genc, S., & Genc, K. (2011). MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Diseases*, 2011, 807426. <https://doi.org/10.4061/2011/807426>
- Villoslada, P. (2010). *Esclerosis múltiple*. 1st ed. Barcelona: Marge Médica Books. ISBN: 978-84-92442-93-5