

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

# **Linfócitos T: uma análise do perfil diferencial da expressão gênica na imunorregulação.**

ISABEL GARCIA SOUSA

Brasília  
2015

ISABEL GARCIA SOUSA

**Linfócitos T: uma análise do perfil diferencial  
da expressão gênica na imunorregulação.**

**Orientadora:** Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília  
2015

ISABEL GARCIA SOUSA

Linfócitos T: uma análise do perfil diferencial da expressão gênica na imunorregulação.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Queiroz Maranhão e Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido. Este trabalho teve apoio financeiro da CAPES, CNPq, Finep, FAP-DF e PRONEX.

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Andrea Queiroz Maranhão (Presidente da banca)

---

Dra. Cecília Beatriz Fiúza Favali (Membro titular)

---

Dra. Kelly Grace Magalhães (Membro titular)

---

Dra. Marília de Castro Rodrigues Pappas (Membro titular)

---

Dr. Rinaldo Wellerson Pereira (Membro titular)

---

Dra. Juliana Franco (Membro suplente)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”  
(Louis Pasteur)

# Apresentação

---

A presente Tese foi dividida em capítulos para facilitar a leitura de duas diferentes séries de experimentos realizados no decorrer do Curso de Doutorado.

O capítulo I foi escrito em formato convencional de Tese, contendo Justificativa e Objetivos, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Perspectivas.

O capítulo II está dividido em Justificativa e Objetivos, com os Métodos e Resultados em forma de artigo científico submetido ao *mAbs Journal*, sessões adicionais de Conclusões e Perspectivas foram adicionadas a este capítulo.

## Lista de abreviaturas

---

AICD	morte celular induzida por ativação
APCs	Antigen Presenting Cells
CD	<i>cluster of differentiation</i> (marcador de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
CDR	região determinante de complementariedade
CH	cadeia constante pesada de anticorpo
CHO	células de ovário de <i>hamster</i> chinês
C $\kappa$	porção constante <i>kappa</i> da cadeia leve
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
Cq	quantification cycle
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
FITC	fluoresceína isotiocianato
FSC	Forward Scatter
Fv	fragmento variável de anticorpo
FvFc	single chain Fv fragment fused to a human IgG1 Fc
gDNA	DNA genômico
HSP	heat shock protein
IFN	interferon
IL	Interleucina
mAb	Anticorpo monoclonal
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OKT3	anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
pb	par de base
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia de polimerização
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
SSC	Side Scatter
STAT	signal transducers and activators of transcription
TCR	T cell receptor
Th	T helper cell

# Índice de figuras

---

**Capítulo I:** *Transcritoma de linfócitos T no transplante renal humano: análise do perfil diferencial de expressão gênica em pacientes com diferentes níveis de tolerância.*

<b>Figura 1.</b> Análise do enriquecimento de células TCD3 <sup>+</sup> .	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Análise do RNA extraído.	<b>30</b>
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica da qualidade dos dados de RNA-Seq.	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b> Genes diferencialmente expressos em células T de pacientes renais transplantados.	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica após análise de enriquecimento GO dos dados do transcritoma.	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Perfil de expressão de genes avaliados em células T.	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Análise de correlação entre a expressão gênica diferencial em pacientes transplantados.	<b>41</b>
<b>Figura 8.</b> Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Th1.	<b>43</b>
<b>Figura 9.</b> Análise quantitativa da expressão de GATA3 envolvido na diferenciação de células Th2.	<b>44</b>
<b>Figura 10.</b> Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Treg.	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Th17.	<b>47</b>
<b>Figura 12.</b> Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos em apoptose.	<b>49</b>
<b>Figura 13.</b> Análise quantitativa da expressão de gênica.	<b>51</b>

**Capítulo II:** *Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3<sup>+</sup> humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos.*

<b>Figura 1.</b> miRNA expression profile in T cells.	<b>83</b>
<b>Figura 2.</b> Quantitative analysis of changes in miRNA expression in CD3 <sup>+</sup> T cells following stimulation with anti-human CD3 antibody.	<b>84</b>
<b>Figura 3.</b> Effects of anti-CD3 stimulation on the expression of genes involved in CD4 <sup>+</sup> Tcell differentiation.	<b>85</b>

# Índice de tabelas

---

**Capítulo I:** *Transcritoma de linfócitos T no transplante renal humano: análise do perfil diferencial de expressão gênica em pacientes com diferentes níveis de tolerância.*

<b>Tabela 1.</b> Características clínicas e demográficas dos pacientes envolvidos no estudo.	<b>27</b>
<b>Tabela 2.</b> Dados brutos obtidos através do <i>RNA-Seq</i> das células T.	<b>31</b>
<b>Tabela 3.</b> Dados estatísticos do tratamento realizado nas sequências.	<b>33</b>
<b>Tabela 4.</b> Dados estatísticos obtidos após mapeamento das sequências.	<b>34</b>
<b>Tabela 5.</b> Expressão relativa de genes envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica após análise de enriquecimento GO dos dados do transcritoma.	<b>36</b>
<b>Tabela 6.</b> Expressão relativa de genes diferencialmente expressos envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica validados por qPCR.	<b>39</b>
<b>Tabela 7.</b> Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de tolerância operacional.	<b>60</b>
<b>Tabela 8.</b> Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de Rejeição Crônica.	<b>61</b>
<b>Tabela 9.</b> Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto sob doses habituais de imunossupressores.	<b>62</b>
<b>Tabela 10.</b> Dados demográficos dos indivíduos saudáveis.	<b>62</b>
<b>Tabela 11.</b> Os genes listados abaixo são diferencialmente expressos em cada comparação ( $p \leq 0.001$ ).	<b>65</b>
<b>Tabela 12.</b> Genes diferencialmente expressos com $p \leq 0.001$ , para as três comparações: OTxCR; OTxST e OTxHE. Dados obtidos a partir do RNA-Seq.	<b>68</b>

**Capítulo II:** *Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3<sup>+</sup> humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos.*

<b>Tabela 1.</b> Differentiation of CD3 <sup>+</sup> T cell subsets following stimulation with anti-human CD3 antibodies.	<b>86</b>
<b>Tabela 2.</b> MicroRNA ranking in CD3 <sup>+</sup> T cells according to p-value.	<b>87</b>
<b>Tabela 3.</b> Donors data	<b>88</b>

# Sumário

---

<b>RESUMO</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Células T: diferenciação e função	1
1.2. Aspectos gerais do transplante renal	4
1.2.1. Resposta imune ao transplante	5
1.2.2. Estágios clínicos da rejeição ao transplante	6
1.2.3. Estágios de tolerância ao transplante	7
1.2.4. Tolerância operacional	8
1.2.5. Imunoterapia	9
1.2.6. Terapia com anticorpos anti-CD3	10
1.2.7. Biomarcadores no transplante renal	11
1.2.8. microRNAs como biomarcadores	12
1.3. Trabalhos publicados com a coorte brasileira de pacientes transplantados renais	14
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>17</b>
Transcritoma de linfócitos T no transplante renal humano: análise do perfil diferencial de expressão gênica em pacientes com diferentes níveis de tolerância	17
<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1. Sujeitos da pesquisa	19
3.2. Critérios para a escolha dos pacientes	20
3.3. Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue	20
3.4. Congelamento e descongelamento de células	21
3.5. Separação das células para obtenção dos linfócitos T	21
3.6. Citometria de fluxo	22
3.7. Obtenção do RNA	23
3.8. Quantificação e qualificação do RNA	24

<b>3.9. Tratamento com DNase</b>	<b>24</b>
<b>3.10. Transcritoma de células T</b>	<b>24</b>
3.10.1. Sequenciamento de alto desempenho	24
3.10.2. Análise computacional dos dados transcritômicos	25
<b>3.11. Validação experimental dos dados de transcritômica</b>	<b>28</b>
3.11.1. Ensaio de qPCR	28
3.11.2. Ensaio de PCR Array (placa customizada)	29
3.11.3. Ensaio de expressão individual	29
<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes renais transplantados</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Eficiência e pureza do enriquecimento das células T</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Análise da extração de RNA</b>	<b>35</b>
<b>5.4. Transcritoma das células T</b>	<b>35</b>
5.4.1. Sequenciamento de alto desempenho	35
5.4.2. Análise da qualidade dos dados de RNA-Seq	36
<b>5.5. Análise da expressão gênica global de Linfócitos T</b>	<b>38</b>
<b>5.6. Genes envolvidos com a regulação do sistema imune e tolerância imunológica</b>	<b>40</b>
<b>5.7. Expressão diferencial de genes envolvidos com a regulação do sistema imune</b>	<b>42</b>
<b>5.8. Regulação de genes envolvidos na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup></b>	<b>47</b>
5.8.1. Genes envolvidos na diferenciação de células T CD4 <sup>+</sup> Th1 e Th2	47
5.8.2. Genes envolvidos na diferenciação de células T reg	49
5.8.3. Genes envolvidos na diferenciação de células T CD4 <sup>+</sup> Th17	51
<b>5.9. Genes envolvidos na morte celular por células T</b>	<b>52</b>
<b>5.10. Proteínas de ligação a TGF-<math>\beta</math></b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>72</b>
Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3 <sup>+</sup> humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos	72
<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>73</b>

<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>74</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>99</b>

# Resumo

---

As células T CD3<sup>+</sup> desempenham um papel importante nas respostas imunológicas associadas à doença autoimune e ao transplante de órgãos. Dados clínicos sugerem que a terapia anti-CD3 é uma opção de tratamento promissora para estas situações, entretanto o mecanismo imunoregulador ainda é incerto. O transplante de órgãos é uma terapia que vem se difundindo como o avanço da medicina. O desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas associadas a drogas imunossupressoras tornou rotineiro o transplante de órgãos. Não obstante, a sobrevivência do enxerto em longo prazo geralmente requer imunossupressão ao longo da vida, e raramente, os receptores exibem uma espontânea " tolerância operacional " com função do enxerto estável na ausência de imunossupressão. A falta de marcadores biológicos desse fenômeno se opõe a identificação de pacientes potencialmente tolerantes em que a imunossupressão poderá ser diminuída, e impede o desenvolvimento de novas estratégias de indução de tolerância. Em casos de transplantes de rins a tolerância operacional tem sido associada com a regulação de genes de diferenciação de células T e um aumento do número de células T periféricas totais, *naïve* e efetoras. Assim, o nosso objetivo foi avaliar biomarcadores de tolerância em diferentes grupos clínicos com transplantes renais: enxerto estável sob imunossupressão (ST), rejeição crônica do transplante renal (CR) e enxerto estável sem imunossupressão (OT). O perfil de expressão gênica de células T do sangue periférico de 15 pacientes renais transplantados (tolerantes operacional, rejeição crônica, função do enxerto estável com imunossupressão) e cinco indivíduos saudáveis foi analisado. Um subconjunto das amostras foi usado para análise de RNA-Seq. Três comparações entre os diferentes grupos de pacientes possibilitou a identificação de alguns genes diferencialmente expressos. Nós confirmamos a expressão desses genes por qPCR em tempo real. Estes biomarcadores foram aplicados na predição de tolerância por qPCR em tempo real em outros pacientes. Nós identificamos um pequeno painel de biomarcadores usando um perfil de expressão gênica em células T do sangue periférico de pacientes transplantados renais espontaneamente tolerantes. A rara coorte livre de drogas imunossupressoras com cinco pacientes transplantados de diferentes regiões do Brasil validaram específicos biomarcadores de tolerância periférica. A assinatura gênica aqui obtida sugere um padrão de apoptose por respostas das células T na rejeição crônica, bem como um viés de Treg na tolerância operacional. Estes genes podem também contribuir para o processo de tolerância, possivelmente através da regulação de fenótipos específicos de células Tregs periféricas ou alterando o limiar para a ativação de células T. Este conjunto de genes associados com a tolerância operacional podem ainda ter utilidade como uma ferramenta de monitoramento minimamente invasiva para guiar a titulação de imunossupressão. Além disso, a validação dessa ferramenta para a minimização da imunossupressão segura em ensaios clínicos prospectivos se justifica. Nas células T, os microRNAs (miRNAs) regulam várias vias, incluindo as associadas com a tolerância imunológica. Assim, o nosso objetivo foi também, avaliar as alterações na expressão de miRNAs em células T de doadores saudáveis, após o tratamento com anticorpos anti-CD3 humano. As células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas na presença do anticorpo monoclonal OKT3, ou um fragmento recombinante do anticorpo humanizado anti-CD3. Após estes tratamentos, o perfil de expressão de 31 espécies de miRNAs foram avaliadas em células T utilizando ensaios TaqMan. Oito desses miRNAs testados (miR-155, miR-21, o miR-146 A de miR-210, miR-17, o miR-590-5p, miR-106 e miR-301A) foram regulados (estatisticamente significativos) negativa ou positivamente em relação a células não tratadas. Em conclusão, a estimulação de células T com anticorpos anti-CD3 humano altera os padrões de expressão de miRNAs, incluindo espécies associadas com vias de regulação do sistema imunológico.

**Palavras-chaves:** Transplante de órgãos. Tolerância operacional. Células T. Expressão gênica. miRNAs. Anticorpos anti-CD3.

# Abstract

---

CD3<sup>+</sup> T cells play a major role in immune responses associated with autoimmune disease and organ transplantation. Clinical data have suggested that anti-CD3 therapy is a promising treatment option for these situations, but its immunoregulatory mechanism is still unclear. Organ transplantation is a therapy that has been disseminated to the advancement of medicine. The development of new surgical techniques associated with immunosuppressive drugs become routine organ transplantation. But, long-term allograft survival generally requires life-long immunosuppression. Rarely, recipients display spontaneous “operational tolerance” with stable graft function in the absence of immunosuppression. The lack of biological markers of this phenomenon precludes identification of potentially tolerant patients in which immunosuppression could be tapered and hinders the development of new tolerance-inducing strategies. In kidney transplants, operational tolerance has been associated with up-regulation of T cell differentiation genes and an increased number of total, naïve and effector peripheral T cells. Thus, our aim was to evaluate tolerance biomarkers in different clinical groups with renal transplants: stable under immunosuppression (ST), chronic rejection of the renal transplant (CR) and stable renal transplant without immunosuppression (OT). The gene expression profile of peripheral blood T cells from 15 renal transplant patients (operational tolerance, chronic rejection, stable graft function in immunosuppression) and five healthy individuals were analyzed. A subset of samples was used for RNA-Seq analysis. Three comparisons between different groups of patients allowed the identification of some differentially expressed genes. We confirm the differential expression of genes by real-time qPCR. We have identified a small biomarker panel using gene expression profiling of T cells in the peripheral blood from spontaneously tolerant renal transplant recipients. The rare immunosuppressive drug-free cohort of five transplant patients from different regions of Brazil, have validated specific biomarkers of peripheral tolerance. The gene signature here obtained suggests a pattern of apoptosis by T cell cytotoxic responses in chronic rejection, as well as Treg bias in operational tolerance. These genes may also contribute to the process of tolerance possibly by regulating specific phenotypes of peripheral regulatory T cells or altering the threshold for T cell activation. This set of genes associated with operational tolerance may have utility as a minimally invasive monitoring tool for guiding immunosuppression titration. Further validation of this tool for safe immunosuppression minimization in prospective clinical trials is warranted. In T cells, microRNAs (miRNAs) regulate several pathways, including those associated with immune tolerance. Thus, our aim was also to evaluate changes in miRNA expression in T cells of healthy donors following treatment with anti-human CD3 antibodies. Peripheral blood mononuclear cells were cultured in the presence of the monoclonal antibody OKT3 or a recombinant fragment of humanized anti-CD3. Following these treatments, the expression profiles of 31 miRNA species were assessed in T cells using TaqMan arrays. Eight of the tested miRNAs (miR-155, miR-21, miR-146a, miR-210, miR-17, miR-590-5p, miR-106b and miR-301a) were statistically significant up- or down-regulated relative to untreated cells. In conclusion, stimulation of T cells with anti-human CD3 antibodies alters miRNA expression patterns, including of miRNA species associated with immune regulatory pathways.

**Keywords:** Organ transplant. Operational tolerance. T cells. Gene expression. miRNAs. Anti-CD3 antibodies.

# Introdução

---

## 1.1. Células T: diferenciação e função

As células T CD3<sup>+</sup> são os principais agentes da resposta imunológica quando se trata das doenças autoimunes e transplante de órgãos. Elas representam uma população heterogênea, entretanto, a expressão de moléculas específicas de superfície caracteriza subconjuntos distintos que definem as principais etapas do processo de diferenciação (SAKAGUCHI, 2000). Estes subconjuntos têm sido geralmente descritos por fatores de transcrição que ditam a expressão de citocinas, receptores, e uma distinta gama de proteínas intracelulares indicando necessidades bastante diferentes para a estimulação de sobrevivência, e em última análise o potencial que definem as funções efetoras e reguladoras das células T (LUTHER; CYSTER, 2001).

As células T são caracterizadas por expressarem em sua superfície o complexo TCR/CD3 (TCR do inglês, *T cell receptor*). Sabe-se que esse complexo está envolvido na transdução de sinal e na ativação das células T. Após a sua ativação por antígenos e sinais co-estimuladores, as células T CD3<sup>+</sup> orquestram respostas imune através da diferenciação em vários subconjuntos de células T (PAGANI et al., 2013; BAUMJOHANN; ANSEL, 2013).

Os linfócitos T são classificados em duas classes principais: os linfócitos T auxiliares, também conhecidos como *T helper* (Th) e os linfócitos T citotóxicos (Tc). Essas células saem do timo para a periferia diferenciadas como Th ou Tc após o processo de seleção positiva. Esse processo envolve o reconhecimento da molécula MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I ou II. Se os linfócitos T imaturos possuírem TCR com afinidade a MHC de classe I elas se diferenciam em Tc possuindo a molécula CD8 na sua superfície, se essa afinidade for pela MHC de classe II elas se tornam Th CD4<sup>+</sup>. Na periferia os linfócitos Th naíve ao interagirem com células apresentadoras de antígenos (APC do inglês, *Antigen Presenting Cells*) sofrem

ativação e podem se diferenciar em subtipos distintos de acordo com determinados estímulos (ANTIGANO; ZAPH, 2015).

A função fisiológica das moléculas do MHC consiste em apresentar peptídeos antigênicos para células T, uma vez que os linfócitos T reconhecem apenas antígenos apresentados em um complexo MHC. As moléculas de MHC envolvidas com a apresentação de antígenos próprios ou não, são divididas em duas classes. As moléculas de classe I, que são normalmente expressas em todas as células nucleadas, e as moléculas de classe II, que são expressas apenas em células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas, macrófagos ativados e células B (HORI S et al, 2003).

As células T CD4<sup>+</sup> encontram-se numa posição central no sistema imune adaptativo, e proporcionam ajuda às células B e células T CD8<sup>+</sup> para a diferenciação e a função efetora. Além disso, as células T reguladoras desempenham um papel importante na manutenção da homeostase e tolerância imunológica por supressão da resposta de células T CD4<sup>+</sup> patogênicas. As citocinas e quimiocinas presentes no microambiente inflamado controla a diferenciação e função de vários subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013).

Vários subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> já foram identificados, e todos eles são desenvolvidos no timo a partir de uma célula T precursora comum. Com base na função e secreção de citocinas, estas células são classificadas como Th1, Th2, Th9, Th17 e células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Treg). Estudos recentes demonstraram que estas células não são terminalmente diferenciadas, mas tem potencial para se diferenciarem em outro subconjunto de células T CD4 (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013).

O processo de diferenciação das células T é controlado por diversos fatores de transcrição que são importantes para a formação das células T CD4<sup>+</sup> e produção de citocinas que direcionam os grupos de células efetoras (PAGANI et al., 2013). O fator de transcrição *T-bet* (TBX21) é o principal fator de transcrição que dirige a diferenciação de Linfócitos T em Th1. Esse subtipo de linfócito T produz altos níveis de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-12. Para a diferenciação em Th2 o fator

de transcrição envolvido é o fator *GATA3*. Essas células são responsáveis pela indução da imunidade humoral com a ativação de Linfócitos B. As citocinas produzidas por essas células têm grande efeito na troca de isotipos de anticorpos. As principais citocinas secretadas pelas células Th2 são IL-4, IL-5 e IL-13 (BERNER et al, 2000). O TCR também pode influenciar na diferenciação das células em Th1 e Th2 devido a diferentes sinais que podem ser recebidos por ele (TUBO; JENKINS, 2014). A diferenciação de linfócitos T em Tregs e Th17 é controlada pelos fatores de transcrição *FOXP3* e *ROR $\gamma$ t* respectivamente. As principais citocinas produzidas são TGF- $\beta$  e IL-10 pelas células Tregs e IL-17 e IL-22 pelas células Th17 (QUINTANA et al, 2008). Esses fenótipos de T CD4<sup>+</sup> são modulados de acordo com a necessidade de adaptação do sistema imune, permitindo um controle no fenótipo dessas células (TUBO; JENKINS, 2014).

Tem sido demonstrado até agora que o fator de transcrição *Foxp3* é um bom marcador para as células T CD4<sup>+</sup>, que regulam as respostas imunológicas para autoantígenos, bem como a uma variedade de antígenos estranhos incluindo antígenos infecciosos ou tumorais, aloantígenos, alérgenos e antígenos comensais. É bem estabelecido que as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> englobam duas categorias de linfócitos que são distintos em sua origem, estimuladas por antígenos específicos, bem como os estímulos que conduzem à diferenciação e homeostase. As células T reguladoras naturais (nTreg) são uma linhagem geradas no timo através de interação do receptor das células T (TCR) com moléculas MHC de classe II, elas são específicas para autoantígenos. As células T reguladoras induzidas (iTreg) derivam de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> maduras precursoras na periferia após estimulação adequada. Já foi mostrado que elas se desenvolvem *in vivo* após estimulação por antígenos em situações caracterizadas por inflamação crônica (auto-imunidade, alergia, respostas imunológicas a tumores e transplantes) e também como agentes fisiológicos do sistema imune das mucosas (CHATENOUD, 2011).

Células T CD4<sup>+</sup> naïve, sob a influência de IL-6 e TGF- $\beta$  diferenciam-se em um subconjunto distinto, as Th17 que secretam IL-17A, IL-17F, e IL-22. Essas células Th17 já são conhecidas por desempenhar um papel importante na resposta

imune contra agentes patogênicos, rejeição à enxertos e doenças autoimunes (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013).

A homeostase imunológica é conseguida pelo balanço entre os linfócitos T que possuem perfil pró-inflamatório (Th1 e Th17) e os que possuem um perfil anti-inflamatório (Th2 e Treg). Qualquer desequilíbrio pode levar a quebra da homeostase levando a patologias associadas com o excesso de resposta (ex.: alergias), respostas ao próprio (ex.: autoimunidades) ou patologias associadas com a supressão de respostas imunológicas que levaria a susceptibilidade a infecções. Quando se trata de supressão imunológica, em alguns contextos, ela pode ser benéfica. Atualmente, diversos esforços têm sido direcionados para uma melhor compreensão dos mecanismos de supressão para indução da tolerância imunológica (COSIMI et al, 1981; KIMBALL et al, 1995; CHATENOU, 2003). Nesse sentido, as células Tregs são hoje foco de intensa pesquisa científica pelo seu potencial imunorregulador, importante quando há um estado de agressão do tecido próprio ou alogênico (como em doenças autoimunes e processos de rejeição a transplantes, respectivamente). Interessante notar que anticorpos específicos para o antígeno CD3 de linfócitos T podem induzir a formação dessas células reguladoras induzindo um estado de tolerância (CHATENOUD, 2003).

## **1.2. Aspectos gerais do transplante renal**

Quando uma doença irreversivelmente altera a função do rim, o tratamento de escolha é o transplante renal. O transplante de órgãos e células hematopoiéticas surgiu como uma solução para várias patologias. O primeiro transplante de órgão sólido bem-sucedido em humanos foi realizado no ano de 1954, em Boston, por Joseph Edward Murray (GARCIA et al, 2012).

Desde o primeiro transplante de órgão sólido, os transplantes de células, órgãos e tecidos vêm se consolidando como uma abordagem de sucesso no tratamento da falência permanente de órgãos ou tecidos. Os transplantes renais são os mais conhecidos sob o ponto de vista clínico e biológico, respondendo pelo número mais elevado de transplantes clínicos realizados em todo o mundo. No Brasil, no período de 2005 a 2015, 90% dos transplantes de órgãos realizados foram

de rim (ABTO, 2015). Na realidade, a maior parte dos conhecimentos adquiridos sobre a imunobiologia dos transplantes e muitos dos conhecimentos atuais sobre a imunologia em geral, devem-se aos estudos envolvendo esse tipo de cirurgia. Assim, podemos considerar que as informações apresentadas até o momento aplicam-se plenamente aos transplantes renais humanos. Além do rim, outros órgãos são frequentemente transplantados na prática médica, enquanto outros ainda não atingiram um grau de desenvolvimento suficiente para garantir resultados clinicamente satisfatórios.

Apesar das melhorias dramáticas na sobrevivência do enxerto durante um ano pós-transplante, graças à descoberta de uma gama de drogas imunossupressoras (MORRIS, 2004), ainda há grandes problemas em relação à perda do enxerto em longo prazo (NANKIVELL; KUYPERS, 2011) e o desenvolvimento de novas patologias relacionadas ao tratamento com drogas imunossupressoras. Atualmente, pesquisas estão sendo conduzidas para encontrar drogas menos prejudiciais, tratamentos mais eficazes e / ou minimizar o tratamento imunossupressor para diminuir os seus efeitos negativos sobre o paciente.

### *1.2.1. Resposta imune ao transplante*

Para que seja realizado um transplante, é necessário que exista um "doador", que irá ceder um órgão ou tecido a ser enxertado no "receptor". O grau de resposta imunológica a um enxerto depende em parte do grau de disparidade genética entre o órgão enxertado e o hospedeiro. De acordo com o tipo de doador, os transplantes renais são classificados como alogênicos, realizado entre indivíduos da mesma espécie, mas que tenham uma bagagem genética distinta (DONOVITCH, 1996).

O transplante alogênico distingue-se por três tipos de doadores. O doador vivo aparentado é representado por familiares como os irmãos, pais e primos. De um modo geral, quanto mais próximo o grau de parentesco, maior a semelhança genética entre doador e receptor. O doador vivo não-aparentado pode ser qualquer pessoa que não esteja geneticamente relacionada com o receptor, como é o caso da esposa ou namorada, amigos ou mesmo doadores 'voluntários'. Com mais

frequência, os órgãos são provenientes de indivíduos que tenham ido a óbito em período recente, desde que clinicamente estejam aptos como doadores, sendo estes referidos como doadores cadavéricos (DONOVITCH, 1996).

Os antígenos responsáveis pela rejeição de tecidos geneticamente díspares são chamados antígenos de histocompatibilidade, e são codificados em mais de 40 loci gênicos, mas os loci responsáveis pelas reações de rejeições de aloenxertos mais vigorosas, estão localizados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Em humanos, o MHC é chamado de antígenos leucocitários humano (HLA) e situa-se no braço curto do cromossoma 6, perto dos genes do complemento (DONOVITCH, 1996).

A resposta imunológica a um órgão transplantado consiste em dois mecanismos, celular (mediada por linfócitos) e humoral (mediada por anticorpos). Embora outros tipos de células estejam também envolvidos, as células T são centrais na rejeição aos enxertos (CLARKSON; SAYEGH, 2005).

A reação de rejeição consiste em uma fase de sensibilização e uma fase efetora. No estágio de sensibilização, as células T CD4 e T CD8, através dos seus receptores de células T, reconhecem os aloantígenos expressos nas células do enxerto. Dois sinais são necessários para o reconhecimento de um antígeno; o primeiro é fornecido pela interação do receptor de células T com o antígeno apresentado pelas moléculas de MHC, o segundo por uma interação ligando um receptor co-estimulatório na superfície das células T e APCs. No estágio efetor, fatores independentes e dependentes do aloantígeno contribuem para os mecanismos efetores. Inicialmente, respostas a lesões não imunológicas induzem a uma resposta inflamatória inespecífica, e por esse motivo a apresentação de antígenos às células T é aumentado, bem como a expressão de moléculas de adesão, MHC de classe II, quimiocinas, e citocinas são reguladas positivamente (CLARKSON; SAYEGH, 2005).

### *1.2.2. Estágios clínicos da rejeição ao transplante*

#### *Rejeição aguda*

A rejeição aguda manifesta-se normalmente nos primeiros seis meses após o transplante. Pode ser mediada por células, através de linfócitos que tenham sido ativados contra antígenos do doador, principalmente nos tecidos linfoides do receptor do órgão. Ou ainda uma rejeição aguda humoral composta de lesões do enxerto com subsequente disfunção, primariamente mediada por anticorpos e complemento (DONOVITCH, 1996).

### *Rejeição crônica*

A rejeição crônica ocorre meses ou anos após o transplante, pode ser mediada tanto por células quanto por anticorpos. O uso de drogas imunossupressoras e métodos de tipagem de tecidos aumentou a sobrevivência de enxertos no primeiro ano, mas os episódios de rejeição crônica não são impedidos na maioria dos casos. A rejeição crônica aparece como fibrose e cicatrizes nos órgãos transplantados, mas o quadro histopatológico específico depende do órgão transplantado. Em receptores de rins, a rejeição crônica (chamada nefropatia crônica de alotransplante) manifesta-se como fibrose e glomerulopatia (DONOVITCH, 1996).

Idealmente, a meta absoluta no transplante de rim é a atingir um estado de enxerto completamente funcional na ausência de tratamento imunossupressor, uma situação conhecida como "tolerância" (AUCHINCLOSS, 2001).

### *1.2.3. Estágios de tolerância ao transplante*

O estado de não agressão aos tecidos próprios é conhecido como tolerância imunológica ao próprio. E é classificada em dois tipos, a central que ocorre nos órgãos linfóides centrais (timo para linfócitos T e medula óssea para linfócitos B) e a periférica nos órgãos linfóides periféricos (linfonodos e baço) e nos tecidos linfoides associados a mucosas (MALT, do inglês, *Mucosa associated lymphoid tissue*). Na tolerância central, linfócitos que reconhecem com alta avidéz antígenos próprios entram em um processo chamado de seleção negativa e são eliminados, já os linfócitos com baixa avidéz para antígenos próprios são

selecionados positivamente e poderão migrar para os tecidos linfóides periféricos (HORI S et al, 2003; HOYNE, 2011; KYEWSKI; KLEIN, 2006; LIU, 2006).

De uma forma sintética, o sistema imune reage constantemente às diferentes experiências imunológicas, sejam elas de manutenção, na interação com autoantígenos, ou de perturbação, na interação com agentes patogênicos. Assim, ativam um conjunto de células e moléculas, entre os quais os linfócitos T, que são posteriormente regulados, auxiliam na manutenção do estado de homeostase.

Dois tipos diferentes, ou fases, de tolerância, tolerância espontânea e tolerância induzida, são descritas na literatura. Elas são independentes e, provavelmente, envolvem diferentes mecanismos. Apesar do sucesso de diversos protocolos para indução de tolerância ao aloenxerto em modelos experimentais animais, a sua tradução para a clínica permanece um desafio. Não obstante, há na clínica um grupo de pacientes que apresentam um estado de estabilidade funcional do enxerto após a retirada de imunossupressores, sendo denominado de indivíduos “tolerante operacional” (SAKAGUCHI S et al, 2006; WOOD; SAKAGUCHI, 2003; JOVANOVIC et al, 2008).

#### *1.2.4. Tolerância operacional*

Imunologicamente, a tolerância é definida como a ausência de uma resposta imunológica para um antígeno específico, na ausência de imunossupressão. Tolerância operacional é definida como a ausência de rejeição ao enxerto, sem a utilização de fármacos imunossupressores (HEIDT; WOOD, 2012).

O estado de tolerância operacional é uma certificação de que a tolerância ao aloenxerto é possível em humanos. Apesar dos dados publicados sobre tolerância operacional abordarem apenas um ou outro parâmetro da resposta imune, recentemente há análises imunológicas mais globais no transplante renal que trazem importantes informações (BROUARD et al, 2007). Esse tipo de abordagem pode ser ampliado incluindo aí o estudo do transcrito dos linfócitos, além de permitir a investigação de um número maior de genes, incluindo genes ainda não

anotados, é ainda possível identificar assinaturas de *splicing* alternativo, mecanismo importante em processos regulatórios.

Os mecanismos exatos que contribuem para este fenômeno ainda são desconhecidos. Além disso, os aspectos críticos do fenótipo clínico, tais como a sua estabilidade, prevalência e histopatologia ainda precisam ser estabelecidos de forma inequívoca. Apesar destas limitações, receptores tolerantes operacionais constituem a melhor prova de princípio da viabilidade de sobrevivência do enxerto livre de drogas em transplantes de órgãos (LONDONO et al, 2012).

Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm confirmado a importância das células Treg na indução da tolerância ao próprio e também no contexto do transplante. Foi observado que em cultura as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> murinas e humanas conseguem suprimir a proliferação de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Além disso, a co-injeção de células T com o fenótipo regulador com células T efectoras conseguiu em camundongos imunodeficientes, prevenir o desenvolvimento de processos inflamatórios autoimunes. Com isso, foi demonstrado que essas células são supressoras tanto *in vitro* como *in vivo* (PICCIRILLO; SHEVACH, 2001; SAKAGUCHI et al, 2009; YAMANISHI et al, 2011).

As células T reguladoras naturais (geradas no timo com atividade reguladora e que expressam o fator de transcrição FOXP3 - nTregs) e as induzidas (iTregs), que ocorrem na periferia, têm um papel na supressão da resposta efetora inflamatória. As células Treg, em especial as naturais, é hoje foco de intensa pesquisa científica, pois possuem grande potencial de uso para terapia celular em condições patológicas nas quais é necessário restaurar a tolerância imunológica, como em doenças autoimunes e no contexto do transplante alogênico (SAKAGUCHI, 2005).

#### 1.2.5. Imunoterapia

Inicialmente, a radiação e produtos químicos foram utilizados como agentes imunossupressores não seletivos, como meio de tratamento para a rejeição a transplantes. No final dos anos 1950 e 1960, os agentes 6-mercaptopurina e

azatioprina foram usados em conjunto com esteróides. Agentes imunossupressores mais recentes já foram desenvolvidos, eles são mais eficazes, mais seletivos, menos tóxicos e tornaram possível os avanços no campo dos transplantes.

Os imunossupressores são usados em 2 fases: na fase de indução inicial, o que requer doses muito mais elevadas destas drogas, e na fase de manutenção, mais tardia. Agentes imunossupressores de uso corrente incluem os seguintes: agentes de ligação à imunofilina, agentes antiproliferativos, corticosteroides, inibidores de alvos da rapamicina em mamíferos (mTOR) e anticorpos (GABARDI; HALLORAN; FRIEDEWALD, 2011).

#### *1.2.6. Terapia com anticorpos anti-CD3*

Muitos ensaios e dados clínicos demonstraram que o tratamento com anticorpos anti-CD3 pode ser uma terapia promissora para doenças autoimune e transplante de órgãos, no entanto, o mecanismo de ação detalhado não é totalmente compreendido. Um dos principais objetivos para a imunoterapia destas patologias é a indução de células T reguladoras, uma vez que é uma forma fisiológica clinicamente aplicável para suprimir a inflamação e mediar a tolerância imunológica (SINGER et al, 2014; SMITH; BLUESTONE, 1997; YOU; CHATENOU, 2010).

O anticorpo monoclonal anti-CD3, OKT3 (muromonab-CD3, Ortho Biotech) foi o primeiro mAb aprovado para uso clínico na terapia de rejeição a transplantes. De uma forma geral o OKT3 (anticorpo anti-CD3) diminuía a severidade da rejeição em grande parte dos episódios de rejeição (COSIMI et al, 1981). No entanto, OKT3 é um anticorpo monoclonal murino, e como um produto heterólogo, leva ao desenvolvimento de uma resposta imunogênica no paciente, caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Esta resposta leva à produção de imunoglobulinas contra os anticorpos murinos que promovem a rápida remoção e neutralização do OKT3, limitando o seu uso a longo prazo no tratamento de rejeição a transplante, bem como a extensão da sua utilização para outras áreas clínicas, tais como a autoimunidade (KLIPA et al, 2010). Devido à sua limitação clínica, OKT3 foi finalmente removido do mercado em 2010 (JANSSEN-CILAG, 2010).

A fim de reduzir a toxicidade do mAb murino OKT3, anticorpos humanizados recombinantes têm sido propostos (YOU; CHATENOU, 2010). A humanização deste anticorpo tem sido uma nobre ferramenta no desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos específicos anti-CD3 humanos. O nosso grupo já havia descrito anteriormente que os anticorpos anti-CD3 humanizados podem estimular o desenvolvimento de células T com atividade imunomoduladora, e estas versões humanizadas foram capazes de se ligarem a molécula CD3 humana e ainda possui menos atividade mitogênica que OKT3 (SILVA et al, 2009; MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001).

Atualmente, os anticorpos anti-CD3 são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, podendo promover a cura de autoimunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (CHATENOU, 2003). O Grupo de Imunologia Molecular da UnB iniciou o processo de humanização do anticorpo OKT3 em 1997 no intuito de torná-lo menos imunogênico. O grupo investiu no processo de humanização e estabeleceu um procedimento próprio. Em 2001 o grupo passou a interagir com o Instituto de Investigação em Imunologia (iii) com o projeto de produção de anticorpos humanizados para aplicação na clínica. Em 2009, foi aprovado o projeto de pesquisa para “Desenvolvimento de biofármacos e caracterização biológica dos efeitos imunorreguladores de anticorpos anti-CD3” pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX/FAPDF/CNPq), projeto coordenado pelo Professor Marcelo de Macedo Brigido. O presente projeto de pesquisa é uma das propostas apresentados no projeto maior aprovado pelo PRONEX. O grupo já possui diversos resultados promissores que envolvem esses anticorpos anti-CD3 humanizados.

### *1.2.7. Biomarcadores no transplante renal*

A população transplantada ainda exibe maior morbidade e mortalidade em relação à população em geral. Embora isto seja, em parte devido aos efeitos de lesão crônica do aloenxerto, as principais causas são co-morbidade crônica influenciada pelo uso de drogas imunossupressoras (SOULILLOU; GIRAL, 2001; LONDON et al, 1995; DANTAL et al, 1998; HALLORAN, 2004; MORELON et al,

2000). Para corrigir esta situação, as prioridades de pesquisa em transplantes de órgãos estão se movendo para a busca de novos medicamentos imunossupressores como estratégias para minimizar a imunossupressão (LONDONO et al, 2012).

Recentemente, tem havido várias colaborações para identificar biomarcadores de tolerância operacional no transplante renal. A maioria dos estudos têm-se concentrado na utilização de amostras de sangue periférico e nas técnicas de criação de perfil de transcrição na esperança de oferecer uma ferramenta clínica de previsão e controle menos invasiva de tolerância, ou de baixo risco imunológico em humanos (BROUARD et al, 2007; DUGAST et al, 2014; MARTINEZ-LLOREDELLA et al, 2007; MARTÍNEZ-LLOREDELLA et al, 2008; KAWASAKI et al, 2007; BRAUD et al, 2008; SIVOZHELEZOV et al, 2008; PONS et al, 2008; SAGOO et al, 2010; LOZANO et al, 2011).

Os biomarcadores são moléculas (características) que podem ser medidos e avaliados objetivamente como um indicador de um processo biológico normal, um processo patogênico, ou uma resposta farmacológica para uma intervenção terapêutica. Atualmente, o único meio confiável de determinar o status do enxerto é por biópsia, mas este procedimento invasivo não é adequado para monitorar o enxerto, numa base regular, por vezes diariamente. Para definir um estado de tolerância operacional, biomarcadores deve ser avaliável de forma não invasiva, utilizando, por exemplo, urina ou no sangue periférico, sendo estes minimamente invasivos. O estabelecimento de biomarcadores de tolerância operacional pode fornecer ferramentas para selecionar pacientes que são elegíveis para inscrição no desmame ou retirada de drogas imunossupressoras (HEIDT; WOOD, 2012).

#### *1.2.8. microRNAs como biomarcadores*

microRNAs são RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) com aproximadamente 22 pares de bases (~ 22 pb) codificados no genoma, e presente entre os genes ou orientado anti-sense para genes vizinhos. É bem estabelecido que os miRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, reprimindo a tradução ou afetam a estabilidade do mRNA alvo no citoplasma, eles também foram

relatados por regular positivamente a expressão dos genes. A maior parte das funções dos miRNAs estão localizadas no citoplasma, mas também alguns já foram relatados com funções localizadas no núcleo e algumas segregadas no exterior das células. Isto sugere que vários miRNAs podem funcionar de forma diferente em diferentes tipos de células e podem controlar o desenvolvimento e diferenciação celular (HA, 2011; PAULEY & CHAN, 2008; BALTIMORE et al., 2008; LODISH et al., 2008; XIAO & RAJEWSKY, 2009; LINDSAY, 2008). Vários miRNAs estão envolvidos na diferenciação e funções nos diferentes subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup>, no entanto, em células Treg eles também são importantes para a manutenção da função imunossupressora, desenvolvimento e homeostase (HA, 2011; BALTIMORE et al., 2008; LINDSAY, 2008).

Estudos recentes também sugeriram forte associação de miRNAs regulando a plasticidade celular. Os miRNAs agora, já são conhecidos por estarem envolvidos em diversos processos de controle importantes, incluindo o desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência, a determinação do destino da célula, a proliferação e função de células do sistema imune. Muitos miRNAs já foram relatados por controlar a expressão de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, moléculas co-estimulatórias, produção de anticorpos, liberação de mediadores inflamatórios, apoptose, transdução de sinal, a prevenção da autoimunidade e fatores de transcrição (HA, 2011; PAULEY & CHAN, 2008; BALTIMORE et al., 2008; LODISH et al., 2008; XIAO & RAJEWSKY, 2009; LINDSAY, 2008; Jeker & Marone, 2015; ZHOU et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2007; SPIEGEL et al., 2011; SETHI et al., 2013).

Sabendo-se que diferentes miRNAs são expressos exclusivamente em células T, e desempenham um papel no desenvolvimento e diferenciação dos vários subtipos, o nosso estudo objetivou identificar a diferença na expressão de alguns microRNAs em células T em cultura com ou sem a estimulação de anticorpos anti-CD3 humano. Dois fragmentos de anticorpos anti-CD3 recombinantes diferentes FvFcs foram testados: um contendo OKT3 scFv, e outro scFv humanizado. Eles foram produzidos em células CHO-K1 e colocados em cultura com PBMCs. A caracterização desses miRNAs pode ajudar a reconhecer seu papel como novas

moléculas importantes como novos biomarcadores com aplicações prognósticos e terapêuticos e ainda como um índice de gravidade da doença envolvendo células T.

### **1.3. Trabalhos publicados com a coorte brasileira de pacientes transplantados renais**

Desde os anos 90, o Laboratório de Imunologia do INCOR juntamente com seus colaboradores, vem publicando estudos com uma coorte de pacientes transplantados renais. Inclusive, um dos primeiros trabalhos que mostrou evidências de que a via de alorreconhecimento indireta estava presente no sangue periférico de transplantados renais com longo tempo de transplante independentemente de quadros de rejeição ao enxerto (COELHO et al., 1999).

O conjunto de dados de dois estudos demonstrou que os linfócitos T da via de alorreconhecimento indireta, contradizendo outros estudos, não possuíam papel inflamatório e sim regulador, surgindo assim à hipótese de que a ativação do repertório de linfócitos Treg na via indireta de alorreconhecimento pode induzir um processo ativo de tolerância (SPADAFORA-FERREIRA et al., 2001).

Com a técnica de reação de linfócitos autólogos mistos (auto-MLR), foi encontrada uma intensificada autorreatividade em transplantados renais, sugerindo que os mecanismos imunológicos pós-transplantes podem alterar o repertório de linfócitos T autorreativos. A detecção de resposta proliferativa exclusivamente no grupo pós-transplantados sugeriu ainda uma alteração significativa no repertório de linfócitos T autorreativos (PORTUGAL et al., 2001).

As células mononucleadas do sangue periférico de 36 indivíduos renais transplantados foram analisadas em vários períodos pós-transplante. E verificou-se que a produção de interleucina-4 (IL4), induzida por HSP60 estava associada com a ausência de rejeição imunológica ao enxerto (GRANJA et al., 2004).

O conjunto de resultados encontrados após experimentos com HSP60 sugeriu uma predominância de autorreatividade no repertório de linfócitos Treg anti-HSP, no período mais longo do pós-transplante, que predominantemente

reconhecem peptídeos das regiões intermediárias e C-terminal da HSP60, esses dados estavam de acordo com o observado no modelo de artrite reumatoide experimental (CALDAS et al., 2006).

Como conclusão foi observado que, nas células mononucleadas avaliadas, houve uma predominância da interleucina 10 (IL10) sendo produzidas por indução da HSP60 durante o período tardio do pós-transplante, principalmente em resposta a peptídeos das regiões intermediárias e C-terminal da HSP60. Foi relatado ainda que pacientes com rejeição crônica apresentaram reatividade para HSP60 com maior produção de IL10 em relação aos pacientes estáveis a longo prazo, sendo assim foi sugerido que apesar de ter atividade pró-inflamatória a autorreatividade para HSP60 no transplante provavelmente exercia um papel regulador (CALDAS et al., 2006).

Mais tarde em outros experimentos, foi encontrado um conjunto funcional de linfócitos T dessa via reativos para antígenos HLA-DR de doadores, dependentes de IL10 e IL4, sugerindo atividade regulatória. Foi realizada ainda, a caracterização de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> que suprimiam a proliferação de outra população de linfócitos T do mesmo paciente tanto na via direta como indireta, mostrando que a via indireta do reconhecimento também está envolvida nos mecanismos regulatórios inerentes a manutenção do enxerto (SPADAFORA-FERREIRA et al., 2007).

O grupo ainda descreveu que, a manutenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> no sangue periférico pode ser relevante para o processo de tolerância operacional, além de outras vias, como a STAT6 que foi descrita como um inibidor do FOXP3 e que em tolerante operacional teve um perfil de sinalização alterado com a fosforilação reduzida de STAT6 em monócitos, sugerindo que a via IL4/STAT6 pode participar do processo de tolerância imunológica. Esse estudo foi realizado a partir da análise diferencial de sangue periférico de indivíduos transplantados renais com rejeição crônica, estáveis e no estado de tolerância operacional e ainda no controle saudável (VIEIRA et al., 2010).

Utilizando o mesmo grupo de pacientes, outro estudo quantificou o perfil de expressão gênica de um conjunto de moléculas predominantemente inflamatórias e imunorregulatórias (FOXP3, GATA3, IL10, TGFB1, TGFBR1/TBX21, TNF e IFN- $\gamma$ ) e verificou que foi possível discriminar os tolerantes operacionais dos demais indivíduos pela expressão significativa de GATA3 (VIEIRA et al., 2011).

Por fim, os colaboradores deste trabalho realizaram outro estudo, mas dessa vez para avaliar o repertório de linfócitos B nos diferentes grupos de indivíduos transplantados renais (tolerante operacional, rejeição crônica e estável) em comparação com indivíduos saudáveis. Seguindo a hipótese de que o repertório de linfócitos B, inclusive linfócitos Breg também participam dos processos de tolerância ao enxerto. Foi descoberto com esse estudo que nos indivíduos tolerantes operacionais o repertório de linfócitos B se assemelhava com o repertório do grupo de indivíduos saudáveis, mostrando uma preservação quantitativa, números normais de linfócitos B totais, naïve, de memória e reguladores. Com capacidade conservada para ativar CD40/STAT3 (via de sinalização dos linfócitos Breg). Enquanto, os indivíduos com rejeição crônica apresentaram redução do número de linfócitos B e diminuição significativa na ativação de linfócitos Breg (SILVA et al., 2011).

# Capítulo I

---

*Transcritoma de linfócitos T no transplante renal humano: análise do perfil diferencial de expressão gênica em pacientes com diferentes níveis de tolerância*

## Justificativa e Objetivos

---

O transplante de órgãos é uma terapia que vem se difundindo com o avanço da medicina. O desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas associadas a drogas imunossupressoras tornou rotineiro o transplante de órgãos. No entanto, a rejeição pós-transplantes ou falência do enxerto, devido à resposta imunológica do paciente ainda é um fator limitante. Sabe-se ainda que uma parcela dos pacientes transplantados desenvolvem espontaneamente um estado de tolerância operacional que garante a sobrevivência do enxerto, entretanto esse processo ainda não é bem elucidado. O conhecimento do perfil transcritômico de linfócitos T poderá aumentar a compreensão dos mecanismos envolvidos no estado de tolerância operacional. Também servirá para o diagnóstico futuro, permitindo a identificação de pacientes que podem se beneficiar com a diminuição ou retirada de drogas imunossupressoras. Esse conhecimento pode ainda subsidiar o desenvolvimento de novas terapias.

Neste contexto os objetivos deste trabalho foram:

- Analisar o Transcritoma de linfócitos T humanos de pacientes tolerante operacional, função estável do enxerto com imunossupressão, rejeição crônica do enxerto e indivíduos saudáveis;
- Detectar genes diferencialmente expressos dentro dos grupos supracitados relacionados com imunomodulação e tolerância imunológica;
- Validar o caráter diferencial da expressão dos genes detectados, por qPCR.

## Métodos

---

O estudo proposto faz parte de um projeto maior multicêntrico: *“Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica”*, coordenado pela Profa. Dra. Verônica Coelho (INCOR – USP) e está contido dentro dos projetos do Instituto de Investigação Imunológica – (iii) INCT/CNPq, coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Kalil. Este projeto maior foi devidamente aprovado pela Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP (CAPPesp no 1097/05, vide anexo I). Além disso, esse projeto é também objetivo do Núcleo de Excelência em Biofármacos e Imunogenômica, apoiado pelo Edital PRONEX (FAP-DF/CNPq), sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

**Nota:** Os experimentos realizados até o tópico 3.9 dessa seção foram realizados em conjunto com PAVANELLI, 2013 e os resultados parciais foram publicados em sua Dissertação de Mestrado pela Universidade Católica de Brasília.

### 3.1. Sujeitos da pesquisa

Os indivíduos do presente estudo provêm de dois centros integrantes do estudo multicêntrico em tolerância operacional. As informações clínicas dos pacientes transplantados renais foram obtidas no prontuário eletrônico do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP e no serviço de transplante renal do Hospital São Lucas da PUC-RS com auxílio dos colaboradores clínicos do projeto. Os indivíduos saudáveis são doadores dos pacientes transplantados renais no HCFMUSP. Todos os sujeitos de pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Serão analisados 4 grupos de indivíduos: um grupo de indivíduos saudáveis (doadores de rim) e 3 grupos de indivíduos transplantados renais, conforme esquema abaixo.

**Grupo Tolerante Operacional:** Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (> 1 ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos 1 ano.

**Grupo Rejeição Crônica:** Indivíduos com longo tempo de transplante (> 1 ano de transplante) com rejeição crônica (diagnóstico por biópsia utilizando-se os critérios histopatológicos de classificação do rim transplantado - Banff 1997 e 2005 (RACUSEN et al., 1999; SOLEZ et al., 2007).

**Grupo Estável:** Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (> 1 ano de transplante) com doses habituais de imunossupressores.

**Grupo Saudável:** Indivíduos saudáveis doadores de rim.

### 3.2. Critérios para a escolha dos pacientes

Baixas doses de drogas imunossupressoras: Azatioprina: < 1mg/kg, prednisona < 0,10 mg/Kg/dia; Ciclosporina < 1,5mg/kg/dia (ou nível sérico no tempo zero < 50ng/mL), rapamicina < 1mg/dia (ou nível sérico < 5 ng/mL), Micofenolato mofetil < 15mg/kg/dia, Micofenolato sódico 10 mg/kg/dia, Tacrolimus < 0,05mg/kg/dia (ou nível sérico < 4 ng/ml). Função estável: Limite de clearance de creatinina >45ml/min, não apresentando variação negativa de clearance > 10% nos últimos 6 meses.

### 3.3. Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis e indivíduos transplantados, obtido por punção venosa em tubos contendo anticoagulante, EDTA ou heparina. As amostras de sangue coletadas foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/L, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após a centrifugação a 600 x g por 25 min, as células mononucleares (PBMC do inglês, peripheral blood mononuclear cells) foram coletadas, ressuspensas com salina e centrifugadas a 600 x g por 10 min. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens as

células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 2 mM L-Glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 10 mM Hepes (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 0,1 ng/ml de Perflacin (Rhodia, SP-Brasil), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e centrifugadas novamente a 600 xg, por 8 min. As células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 x g, por 8 min, para a remoção de plaquetas. As células foram ressuspensas em 3 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - Imunoquímica, RJ, Brasil). A concentração e viabilidade celular foram determinadas por contagem em câmara de Neubauer utilizando-se o corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA).

### **3.4. Congelamento e descongelamento de células**

As suspensões de células mononucleares foram centrifugadas a 600 x g por 8 min e ressuspensas ( $5$  a  $20 \times 10^6$  células/mL) em solução de congelamento contendo 90% de SFB (Imunoquímica, RJ, Brasil), e 10% dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos de congelamento (TPP, Switzerland) previamente resfriados, e transferidos para freezers  $-80^{\circ}\text{C}$  por um dia e, posteriormente, para tanques de nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os tubos foram transferidos do nitrogênio líquido para o banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , até que o conteúdo estivesse parcialmente descongelado. Essa suspensão de células foi transferida para outro tubo contendo 10 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB. Após isso, as células foram centrifugas a 600 x g por 8 min e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, e a viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA) pela contagem em câmara de Neubauer.

### **3.5. Separação das células para obtenção dos linfócitos T**

Primeiramente foi realizada uma separação positiva dos monócitos pela marcação magnética com *CD14 MicroBeads* (Miltenyl Biotec Inc., Auburn, CA, EUA).

As células em suspensão foram purificadas em uma coluna MACS® que estando em contato com um suporte imantado gera um campo magnético. As células marcadas magneticamente, CD14<sup>+</sup>, ficaram presas à coluna, enquanto os outros tipos celulares passaram livremente e foram coletados em um tubo contendo 3 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB. Depois que a coluna foi removida do suporte os monócitos foram eluídos em um tubo contendo 3 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, contados em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripán. As células que passaram livremente pela coluna foram submetidas a uma nova separação utilizando o *Pan T Cell Isolation Kit* (Miltenyl Biotec Inc., Auburn, CA, EUA) que isola os linfócitos T marcando os outros tipos celulares (seleção negativa). As células que não eram de interesse foram marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina e *Pan T Cell MicroBeads*. Ao passar pela coluna presa ao suporte metálico magnético, todas as células, exceto os linfócitos T, ficaram aderidas à coluna, enquanto os linfócitos T passaram livremente e foram coletados em um tubo contendo 3 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, a viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripán pela contagem em câmara de Neubauer e a eficiência das separações foi determinada por citometria de fluxo. As células que ficaram aderidas à coluna (linfócito B e células *Natural killers*) foram eluídas em 3 mL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripán.

### 3.6. Citometria de fluxo

Para avaliar a eficiência e pureza da separação celular após a obtenção dos linfócitos T, as células foram caracterizadas através de marcações imunogênicas. Para tal,  $2 \times 10^5$  células foram transferidas para uma placa de 96 poços e lavadas em tampão MACS (PBS, BSA, 0.09% Azida e EDTA, Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), e centrifugadas a 500 *xg* por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspenas por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços. Adicionou-se 25  $\mu$ L dos anticorpos diluídos em tampão de lavagem de FACS, anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD19-APC e anti-CD8-PECy5 e incubou-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de tampão de lavagem de FACS e as células

foram novamente centrifugadas nas condições já descritas. As células foram ressuspensas em 400  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem de FACS e então, foram transferidas para tubos apropriados para o Citômetro. A leitura da reação no Citômetro de fluxo foi realizada no dia da reação para evitar a morte celular. O citômetro de fluxo utilizado foi o FACScalibur (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA). O programa utilizado para aquisição e análise dos dados foi o CELLQUEST. As células foram adquiridas e selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade de maneira a analisar a população de linfócitos, e a seguir eram contadas 10 000 células para cada amostra dentro da região de linfócitos. Os dados foram obtidos a partir da análise dos histogramas ou gráficos de pontos fornecidos pelo programa. Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas para cada marcação em estudo.

### **3.7. Obtenção do RNA**

O RNA total foi extraído utilizando solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Foi adicionado 1 mL de trizol para  $1,5 \times 10^6$  células, homogeneizando-se a amostra por pipetagens repetidas. Após a homogeneização foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio RNase free (Merck, Darmstadt, Germany) por mL de trizol e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 seg. Após agitação, a amostra foi incubada por 2 a 3 min à temperatura ambiente e centrifugada a  $12000 \times g$  por 15 min, a  $4^\circ\text{C}$ . Após a centrifugação, há uma separação de fases e o RNA encontra-se localizado na fase aquosa. Essa fase foi transferida para um novo tubo. Foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de glycoblue (15mg/mL, Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, EUA) e precipitada com 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. A amostra foi agitada vigorosamente e congelada a  $-80^\circ\text{C}$ . Após essa etapa as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 20 min a  $12000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75%. Centrifugou-se a amostra a  $12000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado secar até o precipitado mudar de cor. O precipitado foi, então, ressuspendido em 12  $\mu\text{L}$  de água DEPC (água tratada com Diethylpyrocarbonato, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Desse estoque, 1  $\mu\text{L}$  foi usado para a quantificação em espectrofotômetro e 1  $\mu\text{L}$  para análise em gel de agarose 1,2%. Este material foi mantido a  $-80^\circ\text{C}$  até o

momento da transcrição. Esse material foi utilizado diretamente para a geração de bibliotecas de cDNA e o sequenciamento de alto desempenho.

### **3. 8. Quantificação e qualificação do RNA**

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado pela leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,7 a 2,0. Para a quantificação correta das nossas amostras utilizamos também o *Qubit® Fluorometric Quantitation* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose RNase free 1,2% e no *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies Genomics, Santa Clara, CA, USA) para visualização da integridade das amostras, permitindo, assim, a observação das duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA. Como marcador de massa molecular usou-se o High DNA Mass ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### **3.9. Tratamento com DNase**

Verificada a presença de gDNA nessas amostras de RNA, procedeu-se o tratamento destas com DNase. As amostras de RNA foram então incubadas a 37°C durante 45 minutos com DNase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Após o tratamento, essas amostras foram precipitadas com 10% de sal (Acetato de sódio 3M; pH 5,2) e isopropanol durante 20 horas a -20°C. Em seguida foram centrifugadas a 12000 *RPM* durante 45 minutos a 4°C e posteriormente lavadas com álcool 70%.

### **3.10. Transcritoma de células T**

#### *3.10.1. Sequenciamento de alto desempenho*

O sequenciamento de alto desempenho das amostras de cDNA (RNA-Seq) foi realizado em um aparelho Illumina Hi-Seq, pelo *The Scripps Research Institute* (TSRI) localizado em La Jolla, CA, EUA. O RNA total extraído das células T foi liofilizado em um tubo *RNA stable*® (Biomatrix, San Diego, CA, EUA) e enviado para o centro de sequenciamento. Para a preparação das bibliotecas de cDNA utilizou-se o *Encore Complete DR RNASeq kit* (Nugen, San Carlos, CA, EUA) conforme as instruções do fabricante. Aproximadamente 600 ng de RNA total foi submetido a ciclos de hibridação com oligo (dT) e usado como molde para a síntese de cDNA. Depois de pronta, a biblioteca de cDNA foi fragmentada e adicionou-se a cada fragmento adaptadores correspondente ao Illumina, a esses fragmentos também adicionou-se uma pequena sequência identificadora (*barcode*), para identificar o RNA de cada paciente. O método usado foi *paired-end*, gerando então duas sequências (*reads*) de 100 pb para cada fragmento de DNA. Todas as 8 amostras foram corridas em uma única *lane* do *chip*.

### 3.10.2. Análise computacional dos dados transcritômicos

As análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório de Bioinformática na Universidade de Leipzig, Alemanha sob orientação do Prof. Dr. Peter Stadler e Prof. Dr. Steve Hoffmann usando o *pipeline* a seguir:

#### *FastQC*

Os arquivos FastQ foram utilizados como entrada para análise da qualidade utilizando a ferramenta FastQC. Essa ferramenta é útil para testes da qualidade para sequências obtidas por sequenciamento de alto desempenho (GOTO et al., 2010).

```
$ fastqc /directory/file.fastq -o /directory/file.fastqc
```

*Argumento:*

*-o: diretório onde os dados serão gravados*

#### *Cutadapt*

Cutadapt é uma ferramenta implementada em Python, utilizada para remover sequências de adaptadores de dados de sequenciamento de alto desempenho (MARTIN, 2011).

```
$ cutadapt -a My_adapter=ACGTAA input.fastq > output.fastq
```

*Argumento:*

*-a: sequencia do adaptador*

### *Segemehl.x*

É uma ferramenta de mapeamento de *reads* baseada em árvores de sufixo. Essa ferramenta foi desenvolvida na Universidade de Leipzig onde realizou-se às análises. Segemehl consegue fazer a detecção de pareamentos de base errôneos (*mismatches*) e inserções e deleções. O mapeamento foi realizado utilizando o genoma humano de referência (v. hg19 – última versão disponível até a data do mapeamento) (HOFFMANN et al., 2014).

```
$ segemehl.x -d /directory/hg19.fa -i /directory/hg19.idx -D 0 -A 90 -S -q file1.fastq.gz -p file2.fastq.gz -u /directory/unmappedreads.fastq -t 7 | samtools view -Sb- | samtools sort - filemapped
```

*Argumentos:*

*-d = genoma de referência formato fasta*

*-i = genoma de referência formato index*

*-A = Acurácia (%)*

*-S = split reads*

*-q = read 1*

*-p = read 2*

*-u = reads não mapeadas*

*-t = threads (CPU)*

*| samtools view -Sb- | = faz a conversão dos arquivos sam em bam*

*| samtools sort | = organiza as reads*

*- mappedreads = arquivo de saída (no formato sam)*

### *HTSeq-count*

O programa HTSeq-count faz a quantificação da expressão por meio da contagem do número de *reads* que foram mapeadas em um determinado gene. Para

a realização do HTSeq-count é necessário o arquivo GTF que contém a informação dos genes codificadores das proteínas anotadas do genoma de referência (v19) (ANDERS et al., 2015).

```
htseq-count -m intersection-strict -s no -i gene_id /directory/file.sam
/directory/gencode.v19.annotation.gtf > /directory/file_htseq.txt
```

*Argumentos:*

*-m = modo de manipular as reads sobrepondo mais de uma característica. Os valores para <modo> podem ser: union, intersection-strict e intersection-noempty.*

*-s = define se os dados do ensaio são provenientes de única fita <stranded>. Os valores <stranded> podem ser: yes (single-end), no (pair-end) ou reverse (reverse stranded)*

*-i = atributo da id*

### *DESeq2*

A ferramenta DESeq2 estima a dispersão de cada gene e analisa se há expressão diferencial entre as condições definidas. Nesse caso, a comparação foi realizada entre os dados provenientes das amostras dos pacientes renais transplantados. O arquivo de saída continha a lista de genes organizados pelo código *ensembl* (*ensembl\_id*) com as seguintes informações: *baseMean*, *log2FoldChange*, *pval*, *padj*, *FDR* (LOVE et al., 2014).

```
>library("DESeq2")
>countData<-as.matrix(read.table("htseq_merged.txt",header=T,row.names=1))
>colData<-data.frame(condition=c(rep("OT",2),rep("CR",2)))
>dds<-DESeqDataSetFromMatrix(countData,colData,formula(~ condition))
>colData(dds)$condition<-relevel(colData(dds)$condition,"OT")
>dds<-DESeq(dds)
>res<-results(dds)
>res<-res[order(res$padj),]
>write.csv(as.data.frame(res),file=")OT_vs_CR")
```

### *g:GOST*

Essa ferramenta foi utilizada para a geração dos termos referentes a ontologia de genes (*Gene Ontology* – GO). A GO compreende termos referentes a três categorias: componentes celulares, processos biológicos e funções celulares. Os dados obtidos do RNA-Seq foram utilizados para a realização da análise de GO

pela ferramenta disponível em <http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/> (g:profiler), g:GOST (*Gene Group Functional Profiling*). A ferramenta realiza uma análise estatística de enriquecimento para encontrar super-representação da informação referente aos termos de GO (REIMAND et al., 2007).

### *Heatmap em R*

É uma representação gráfica de dados onde os valores individuais contidos numa matriz são representados como cores.

```
map <- read.csv("/directory/file.csv", sep=";")
map <- map[order(map$file),]
row.names(map) <- map$Name
map <- map[,2:20]
map_matrix <- data.matrix
map_heatmap <- heatmap(map_matrix, Rowv=NA, Colv=NA, col = heat.colors(256),
scale="column", margins=c(5,10))
```

#### *Argumentos:*

*Rowv* = determines if and how the row dendrogram should be computed and reordered.

*Colv* = determines if and how the column dendrogram should be reordered.

## **3.11. Validação experimental dos dados de transcritômica**

### *3.11.1. Ensaios de qPCR*

Os ensaios de qPCR foram realizadas utilizando ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  foi utilizado para calcular os níveis de transcritos de mRNA (fold change). O software RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis (SABiosciences) foi utilizado para as análises. Os experimentos foram realizados em triplicata. De modo a identificar potenciais genes expressos diferencialmente, mRNAs foram classificados usando p-value, que foram calculados com base no teste t de Student dos valores das replicatas  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para cada gene nas amostras controle e amostra teste.

### 3.11.2. Ensaios de PCR Array (placa customizada)

Aproximadamente 300 ng de RNA total isolados de células T foram usado para síntese de cDNA usando RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen), seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante. A placa customizada (catálogo nº CAPH12583C) continha 32 genes em triplicatas. Os genes, com seus respectivos códigos de referência, estão listados logo a seguir.

	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene RefSeq #</b>		<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene RefSeq #</b>
1	<b>CTLA4</b>	NM_005214	17	<b>XCL1</b>	NM_002995
2	<b>FASLG</b>	NM_000639	18	<b>IL12RB2</b>	NM_001559
3	<b>FOXP3</b>	NM_014009	19	<b>IFNG</b>	NM_000619
4	<b>GATA3</b>	NM_002051	20	<b>VDR</b>	NM_000376
5	<b>GZMB</b>	NM_004131	21	<b>IL7R</b>	NM_002185
6	<b>IL2RA</b>	NM_000417	22	<b>IL6R</b>	NM_000565
7	<b>IRF4</b>	NM_002460	23	<b>IFNGR1</b>	NM_000416
8	<b>NFKB1</b>	NM_003998	24	<b>ITGA6</b>	NM_000210
9	<b>PDCD1</b>	NM_005018	25	<b>B2M</b>	NM_004048
10	<b>STAT3</b>	NM_003150	26	<b>HPRT1</b>	NM_000194
11	<b>TNFRSF18</b>	NM_004195	27	<b>RPL13A</b>	NM_012423
12	<b>TNFSF4</b>	NM_003326	28	<b>GAPDH</b>	NM_002046
13	<b>TNFRSF4</b>	NM_003327	29	<b>ACTB</b>	NM_001101
14	<b>LIF</b>	NM_002309	30	<b>HGDC</b>	SA_00105
15	<b>CD38</b>	NM_001775	31	<b>RTC</b>	SA_00104
16	<b>ABIN-3</b>	NM_024873	32	<b>PPC</b>	SA_00103

Para cada placa de PCR-Array, foram utilizados cinco genes de controle endógeno: beta-2-microglobulina (B2M), hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1), proteína ribossomal L13a (RPL13A), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o beta actina (ACTB). Além dos controles endógenos, foram utilizados ainda controles referentes à contaminação genômica de DNA (HGDC), controle da transcrição reversa (RTC) e controle positivo da amplificação (PPC).

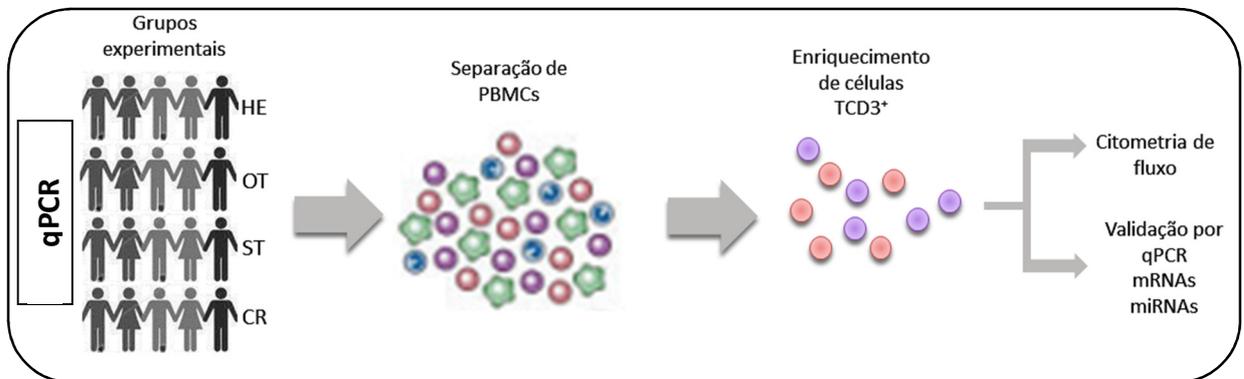
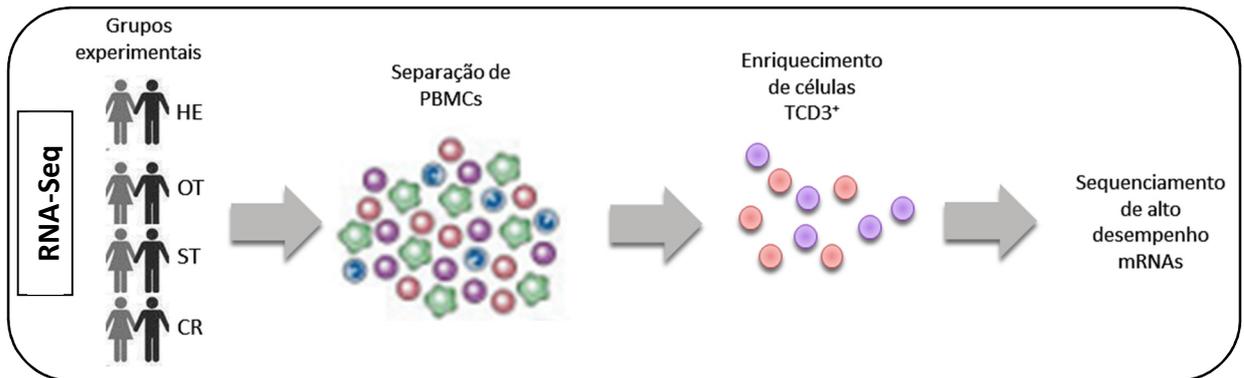
### 3.11.3. Ensaio de expressão individual

Aproximadamente 300 ng de RNA total isolados de células T foram usado para síntese de cDNA usando RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen). A expressão individual

dos genes foi analisada usando RT<sup>2</sup> qPCR SYBR Green/ROX Master Mix (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando sondas para 22 genes. Os genes, com seus respectivos códigos de referência, estão listados logo a seguir. B2M *housekeeping* gene foi utilizado como controle endógeno.

	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene RefSeq #</b>		<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene RefSeq #</b>
1	<b>CTLA4</b>	NM_005214	12	<b>IL17A</b>	NM_002190
2	<b>FASLG</b>	NM_000639	13	<b>IL17RA</b>	NM_014339
3	<b>FOXP3</b>	NM_014009	14	<b>LAG3</b>	NM_002286
4	<b>GATA3</b>	NM_002051	15	<b>LTBP4</b>	NM_001042544
5	<b>STAT3</b>	NM_003150	16	<b>RORC</b>	NM_001001523
6	<b>TNFRSF18</b>	NM_004195	17	<b>STAT4</b>	NM_001243835
7	<b>VDR</b>	NM_000376	18	<b>STAT5</b>	NM_003152
8	<b>IL7R</b>	NM_002185	19	<b>TBX21</b>	NM_013351
9	<b>IL23R</b>	NM_144701	20	<b>B2M</b>	NM_004048
10	<b>GZMA</b>	NM_006144	21	<b>GAPDH</b>	NM_002046
11	<b>GZMM</b>	NM_005317			

## Delineamento experimental



# Resultados

---

## 5.1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes renais transplantados

Foram envolvidos quatro grupos de participantes nesse estudo: indivíduos tolerantes operacionais, que obtiveram a função do enxerto estável apesar de não receber nenhuma imunossupressão, durante pelo menos um ano (operational tolerance - OT, n = 5); indivíduos com a função do enxerto estável sob imunossupressão (stable - ST, n = 5); indivíduos com rejeição crônica do enxerto (chronic rejection - CR, n = 5) e indivíduos saudáveis (não transplantados) (healthy - HE, n = 5) (**Tabela 1**). Os demais dados clínicos como: doença de base, disparidades HLA, tipo de doador (falecido ou vivo), função retardada ao enxerto, terapia de indução, presença de rejeição aguda ou crônica, podem ser encontrados no Anexo II.

Analisando as principais características clínicas e de função renal dos diferentes grupos de indivíduos inseridos no estudo, percebe-se que a glomerulonefrite crônica foi a doença de base mais comum (8 dos 15 indivíduos transplantados renais) e apresentada por todos os indivíduos com rejeição crônica. Várias outras doenças de bases foram observadas (Anexo II), mas sem que nenhuma outra se destacasse.

O grupo de indivíduos com rejeição crônica apresentou uma maior frequência (3 dos 5 indivíduos) de doadores cadavéricos e função retardada do enxerto (FRE) (4 de 5 indivíduos) quando comparado com todos os outros grupos de estudo (Anexo II). Apesar dos enxertos oriundos de doadores falecidos (TERASAKI et al., 1995a; TERASAKI et al., 1995b) e com FRE (WHITTAKER *et al.*, 1973; HALLORAN & HUNSICKER, 2000), em geral, apresentarem uma pior evolução clínica após o transplante, vale ressaltar que há um indivíduo (LTx08) com enxerto de doador falecido e com FRE entre os tolerantes operacionais, neste trabalho e outros descritos na literatura (ROUSSEY-KESLER et al., 2006; NEWELL et al.,

2010).

**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas dos pacientes envolvidos no estudo.

Clinical groups	Samples ID	Matching	Gender	Age	Transplantation time
<b>HE</b>	LTx 41	1	M	39	NA
	LTx 36	2	M	42	NA
	LTx 40	3	F	34	NA
	LTx 37	4	F	52	NA
	LTx 43	5	M	30	NA
<b>CR</b>	LTx 25	1	M	51	15
	LTx 04	2	M	46	6
	LTx 13	3	F	45	11
	LTx 67	4	F	41	13
	LTx 05	5	M	35	09
<b>OT</b>	LTx 03	1	M	54	25
	LTx 08	2	M	41	7
	LTx 10	3	F	42	9
	LTx 75	4	ND	ND	ND
	LTx 62	5	M	31	14
<b>ST</b>	LTx 28	1	M	56	36
	LTx 09	2	M	47	6
	LTx 14	3	F	45	4
	LTx 27	4	F	47	24
	LTx 31	5	M	56	7

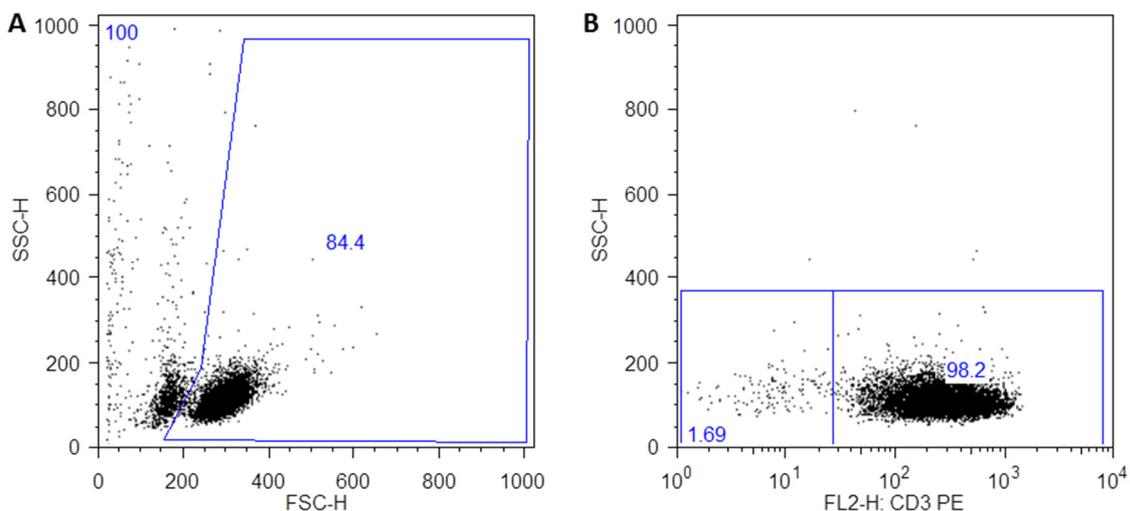
Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE); ND: não disponível; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; Age and transplantation time in years.

O grupo de indivíduos com rejeição crônica também apresentaram os maiores níveis de creatinina sérica (ANEXO II), um importante indicador de lesão renal, corroborando com dados estabelecidos na literatura nos quais a rejeição crônica é, geralmente, caracterizada por uma lenta disfunção renal, resultando em um aumento progressivo da creatinina sérica e, geralmente, também acompanhada de proteinúria e hipertensão arterial (JOOSTEN et al., 2005). Entretanto, não foi observada diferença significativa em relação ao grupo de tolerantes operacionais. Apesar disso, o grupo OT apresentou estabilidade da função renal ao longo do tempo sem uso de imunossupressores enquanto o grupo CR apresentou uma

deterioração da função renal, mesmo fazendo uso de terapia imunossupressora, com confirmação do seu estado por biópsia. Além disso, o grupo OT não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo HE. Provavelmente, os resultados encontrados aqui devem estar refletindo os processos imunológicos desencadeados por condições tão contrastantes como tolerância operacional e rejeição crônica.

## 5.2. Eficiência e pureza do enriquecimento das células T

A partir do sangue periférico, as células mononucleadas desses indivíduos foram coletadas e armazenadas no laboratório de imunologia do INCOR-SP e posteriormente fracionadas por tipos celulares, conforme descritos em material e métodos. O fenótipo e morfologia da população dos linfócitos T enriquecidos foram analisados por citometria de fluxo e microscopia de luz. Para identificar populações de linfócitos, primeiramente, foi feito um *gate* nas células com base nas propriedades de tamanho e granulosidade, respectivamente, FSC (Side Scatter) e SSC (Forward Scatter) (**Figura 1A**). A partir dessa região, os linfócitos T com marcação positiva para CD3 foram selecionados. O enriquecimento imunomagnético dos linfócitos T utilizados nesse estudo foi eficiente, resultando em uma população de linfócitos T altamente viável e com pureza de 98,2% (**Figura 1B**).

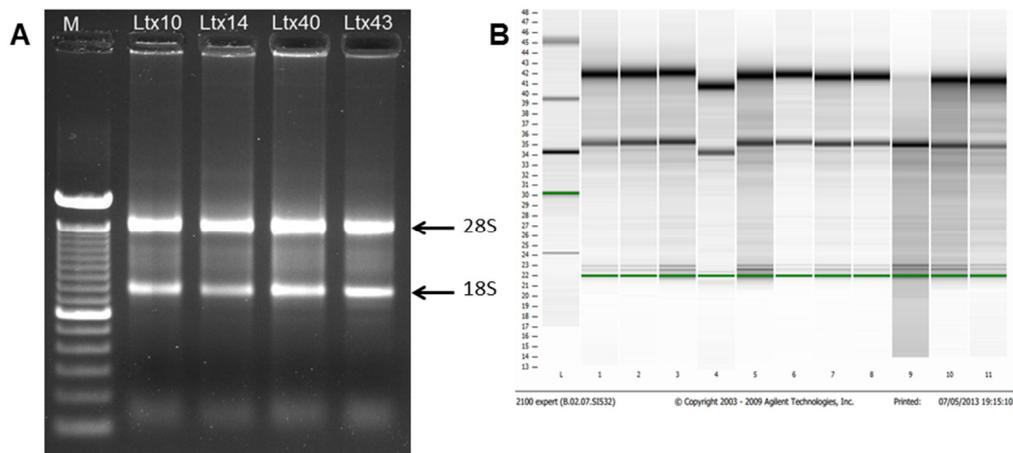


**Figura 1. Análise do enriquecimento de células TCD3<sup>+</sup>.** (A) *Gate* nas células TCD3<sup>+</sup> com base nas características físicas das células determinadas por dispersão, FSC (forward scatter) representa o tamanho das células e SSC a granulosidade celular; (B) Porcentagem de células

T CD3<sup>+</sup>. Representação da separação para amostras do grupo OT. Todas as outras amostras seguiram o mesmo padrão de separação.

### 5.3. Análise da extração de RNA

Confirmada a pureza dos linfócitos T obtidos, o RNA total de todas as amostras foi extraído (**Figura 2**), as moléculas de RNA apresentaram-se íntegras e de boa qualidade, com as bandas dos ribossomais 28S e 18S evidentes.



**Figura 2. Análise do RNA extraído.** As amostras de RNA foram analisadas antes e após o tratamento com DNase. **(A)** Gel de agarose: 1,2%, das amostras antes do tratamento com DNase com visíveis subunidades 28S e 18S, indicando a integridade do material. Marcador (M), Amostras (Ltx 10 – Ltx 43); **(B)** As amostras de RNAs foram submetidas à eletroforese por *Bioanalyzer 2100* após tratamento com DNase. RIN (*RNA Integrity Number*) - pode variar de 1 a 10. Os valores de RIN são considerados bons quando são superiores a 7. Todas as outras análises seguiram um padrão similar com RIN variando entre 7.0 a 9.0.

### 5.4. Transcritoma das células T

#### 5.4.1. Sequenciamento de alto desempenho

Para o sequenciamento de alto desempenho foram escolhidas, primeiramente, amostras de dois pacientes de cada grupo clínico. Escolhemos as amostras com maiores quantidades de RNA obtidos. Após o sequenciamento foram

avaliadas as quantidades e qualidades das *reads* obtidas. Na tabela 2 constam os dados brutos desse sequenciamento.

**Tabela 2.** Dados brutos obtidos através do *RNA-Seq* das células T.

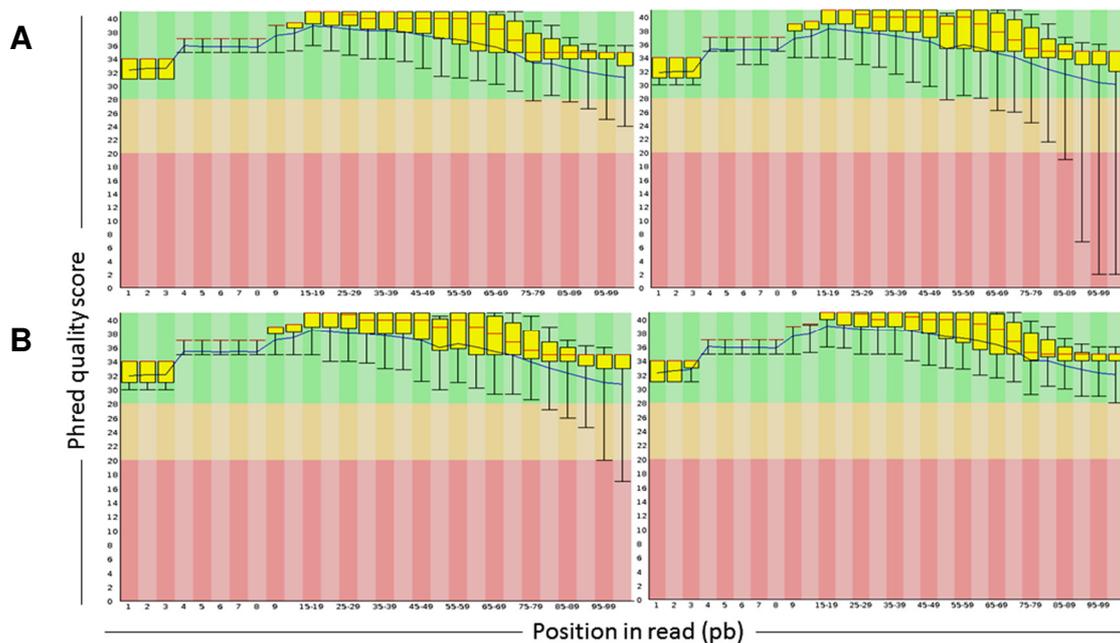
Clinical groups	Sample ID	Yield (Mbases)	# Reads	% of $\geq$ Q30 Bases (PF)	Mean Quality Score (PF)
OT	Ltx 75	3,384	36,382,694	89,07	35
	Ltx 08	3,639	38,925,096	90,58	35,58
ST	Ltx 09	3,852	41,334,908	88,95	34,96
	Ltx 27	3,389	36,137,814	91,25	35,86
HE	Ltx 36	4,292	45,876,326	89,58	35,13
	Ltx 37	5,062	54,075,108	90,86	35,7
CR	Ltx 04	4,781	51,751,120	86,85	34,23
	Ltx 67	4,333	46,639,716	87,85	34,53

Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE), # Incluindo paired-ends.

#### 5.4.2. Análise da qualidade dos dados de *RNA-Seq*

A fim de identificar as potenciais assinaturas gênicas da tolerância no transplante renal humano, *RNA-seq* foi empregado para gerar perfis de expressão gênica em pacientes com diferentes níveis de tolerância. Os dados do sequenciamento foram disponibilizados no formato FASTQ. Esse formato de arquivo, gerado pelo sequenciador Illumina, contém sequências de nucleotídeos juntamente com a representação dos níveis de qualidade. A partir desse arquivo analisou-se a qualidade do sequenciamento utilizando o programa FASTQC. Este programa permite gerar gráficos das sequências levando em consideração a qualidade média total por base, a qualidade média de todas as leituras e o conteúdo G+C, além de informar se existem sequências super-representadas, que podem referir-se a contaminação com os iniciadores utilizados no sequenciamento. Esta última informação é importante para verificar se há ou não a necessidade de realizar as etapas de filtragem dos dados. Logo, verificou-se a necessidade da retirada dos adaptadores (sequências de nucleotídeos utilizados para amplificação de

sequências no Illumina Hi-Seq). Na tabela 3 constam os dados de números de *reads* antes e depois da retirada dos adaptadores. Os dados, a princípio, se mostraram de boa qualidade, e quantidade em relação ao número de *reads* mesmo após a retirada dos adaptadores. A figura 3 representa um exemplo da qualidade da leitura obtida pelo sequenciamento. Todos os outros dados obtiveram um padrão de qualidade similar.



**C**

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%
60	1 in 1,000,000	99.9999%

**Figura 3. Representação gráfica da qualidade dos dados de RNA-Seq. (A)** Representação das sequências antes do *clipping*; **(B)** Após o *clipping*. Esquerda 5' – 3'. Direita 3' – 5'. **(C)** Phred quality scores logaritmicamente ligada a probabilidades de erros.

**Tabela 3.** Dados estatísticos do tratamento de filtragem realizado nas sequências.

Clinical groups	Sample ID	Original reads # single	% clipping	#single-ends	# paired-ends
OT	Ltx 75	17366087	2	17021060	34042120
	Ltx 08	17851640	3	17432996	34865992
ST	Ltx 09	21026931	3	20594324	41188648
	Ltx 27	19062929	2	18840182	37680364
HE	Ltx 36	17576125	2	17242105	34484210
	Ltx 37	14881007	3	14359598	28719196
CR	Ltx 04	21534872	3	20953330	41906660
	Ltx 67	17211708	3	16787201	33574402

Número de *reads* antes e após a retirada dos adaptadores. Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE).

### 5.5. Análise da expressão gênica global de Linfócitos T

A análise dos dados foi realizada a partir do mapeamento de cada par de *reads* ao conjunto de todos os cromossomos humanos (hg19p10) simultaneamente. Observamos que uma porcentagem alta das *reads* foram mapeadas (**Tabela 4**), e mapearam corretamente e preferencialmente na região exônica. Para chegar nessa resposta fizemos uma análise prévia de visualização no programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*). Os genes escolhidos para este teste foi CD3 que codifica uma proteína de superfície expressa constitutivamente nas células T, e outros relacionados a células Treg e ao perfil de tolerância imunológica (dados não mostrados).

Depois do mapeamento, o número de leituras alinhadas a cada gene foi determinado por HTSeq. A normalização foi realizada utilizando DESeq2. Esse pacote informa o valor da razão da expressão (*fold change*) em logaritmo de base 2 (*log<sub>2</sub> fold change*). A normalização permite quantificar os níveis de expressão de cada gene e comparar com a amostra controle. Nesse caso, a amostra controle foram os pacientes do grupo OT. Os genes foram considerados diferencialmente expressos com valores de *log<sub>2</sub> fold change* acima de 1. Apenas os genes que obtiveram  $p \leq 0.001$  na normalização foram considerados significantes e utilizados

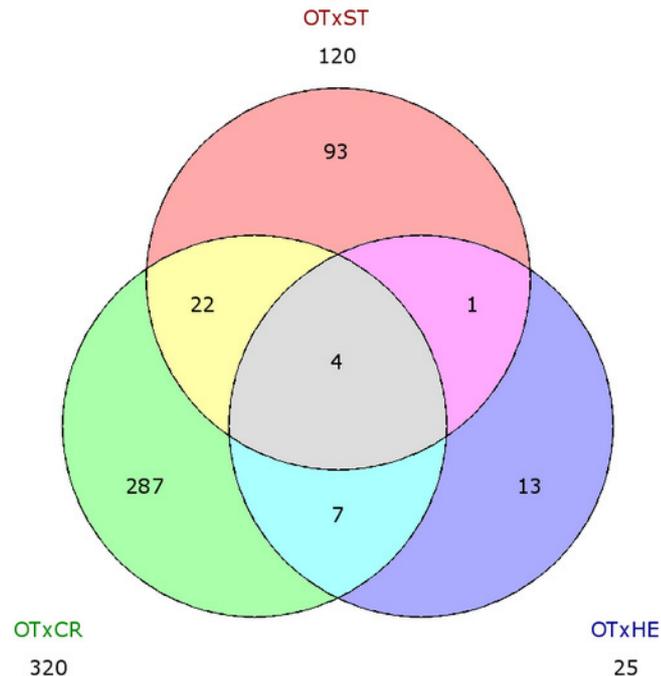
para as análises, exceto em casos específicos (nesses casos, o valor de p será mostrado).

**Tabela 4.** Dados estatísticos obtidos após mapeamento das sequências.

Clinical groups	Sample ID	# paired-ends	% mapped reads	Unmapped reads	Sum of mapped mates
OT	Ltx 75	34042120	94	2021594	32020526
	Ltx 08	34865992	93	2279453	32586539
ST	Ltx 09	41188648	91	3329912	37858736
	Ltx 27	37680364	93	2556658	35123706
HE	Ltx 36	34484210	92	2432562	32051648
	Ltx 37	28719196	93	1801737	26917459
CR	Ltx 04	41906660	95	1980933	39925727
	Ltx 67	33574402	92	2392629	31181773

Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE).

Foi realizada uma comparação da expressão gênica global entre os grupos de pacientes (**Figura 4**), para essa comparação, somente os genes expressos diferencialmente com valor de  $p \leq 0.001$  foram utilizados. Foram encontrados 4 genes igualmente regulados entre os grupos. Os pacientes do grupo CR mostraram o maior número de genes diferencialmente expressos (320), seguido do grupo ST (120) e HE (25). Os genes foram tanto negativa ou positivamente regulados entre os grupos. A lista dos genes diferencialmente expressos consta no Anexo III.



**Figura 4. Genes diferencialmente expressos em células T de pacientes renais transplantados.** Genes diferencialmente expressos com  $p \leq 0.001$ , para as três comparações: OTxCR; OTxST e OTxHE. Dados obtidos a partir do RNA-Seq.

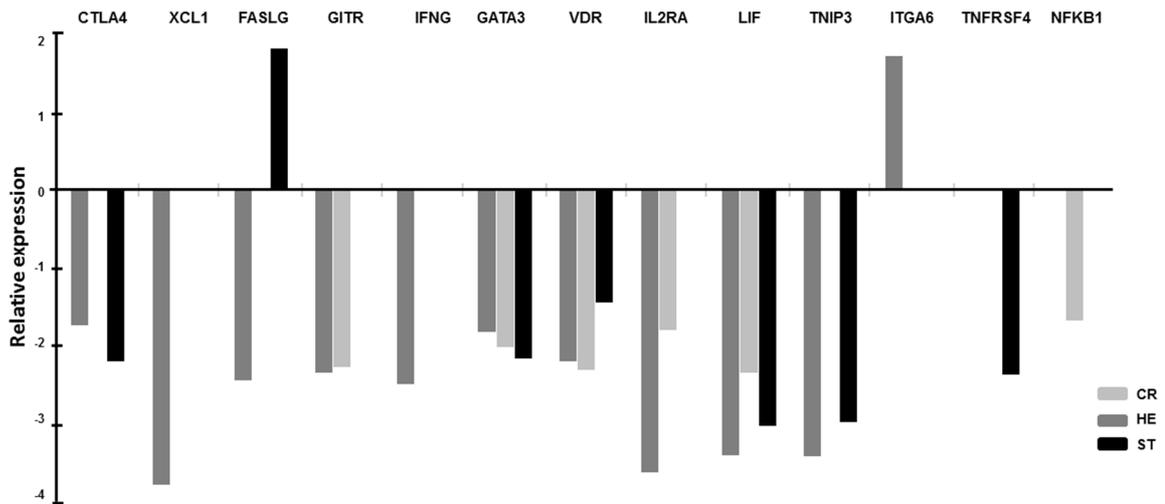
### 5.6. Genes envolvidos com a regulação do sistema imune e tolerância imunológica

A fim de identificar os genes diferencialmente expressos entre os diferentes grupos clínicos que estão relacionados à regulação do sistema imune e tolerância imunológica, foram realizadas análises de enriquecimento de termos de ontologia gênica (Gene Ontology (GO), g:Profiler, Institute of Computer Science, University of Tartu, Estonia) com os dados obtidos através do transcriptoma. As análises de enriquecimento de GO foram realizadas na lista de genes diferencialmente expressos com valor de  $p \leq 0.001$ . Após essa análise nos dados de RNA-Seq, esses genes foram validados por qPCR em apenas 2 pacientes de cada grupo (**Tabela 5 e Figura 5**). Os genes que foram significativamente expressos nas células T dos dois pacientes testados foram então escolhidos para validação no restante dos pacientes. Foram escolhidos também alguns genes já descritos na literatura como envolvidos na tolerância a transplantes.

**Tabela 5.** Expressão relativa de genes envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica após análise de enriquecimento GO dos dados do transcriptoma.

Gene description	Gene ID	CR	ST	HE
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	<b>CTLA4</b>	-1,75		-2,21
GATA binding protein 3	<b>GATA3</b>	-1,84	-2,03	-2,18
Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	<b>VDR</b>	-2,21	-2,32	-1,46
Leukemia inhibitory factor	<b>LIF</b>	-3,4	-2,36	-3,03
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	<b>FASLG</b>	-2,45	NS	1,79
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	<b>GITR</b>	-2,35	-2,28	NS
Chemokine (C motif) ligand 1	<b>XCL1</b>	-3,77	NS	NS
Interferon, gamma	<b>IFNG</b>	-2,5	NS	NS
Interleukin 2 receptor, alpha	<b>IL2RA/CD25</b>	-3,62	-1,82	NS
Interacting protein 3	<b>TNIP3</b>	-3,41	NS	-2,98
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	<b>TNFRSF4</b>	NS	NS	-2,38
Nuclear factor of kappa light polypeptide Gene enhancer in B-cells 1	<b>NFKB1</b>	-1,69	NS	NS
Integrin, alpha 6	<b>ITGA6</b>	1,69	NS	NS

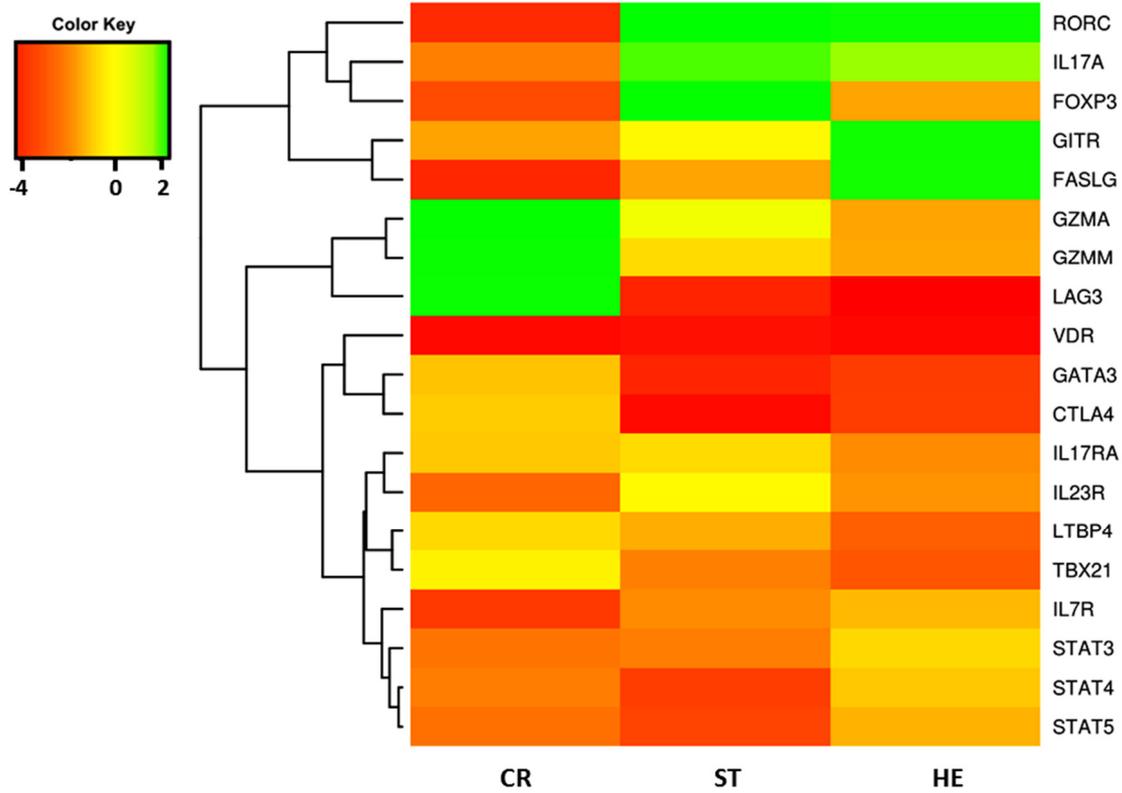
Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representados como *fold change* de três experimentos independentes. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 2; CR, n= 2; ST, n= 2; HE, n= 2; p ≤0,05). NS não significativo para p ≤0,05.



**Figura 5. Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica após análise de enriquecimento GO dos dados do transcrito.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR. Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 2; CR, n= 2; ST, n= 2; HE, n= 2; p ≤0,05).

### 5.7. Expressão diferencial de genes envolvidos com a regulação do sistema imune

A expressão diferencial dos genes foi confirmada por qPCR onde utilizou-se sondas altamente específicas para cada gene de interesse (**Tabela 6**). A figura 6 mostra uma análise de agrupamento de 19 genes diferencialmente expressos em células T CD3<sup>+</sup> a partir de doadores saudáveis (n = 5) e doadores transplantados renal (n = 15). Esses genes tiveram sua expressão aumentada ou diminuída em células T CD3<sup>+</sup>, após o transplante e normalizados nas amostras de pacientes com tolerância operacional (OT). Esse *Heatmap* foi expresso como *fold change* para níveis de expressão de genes em relação às células T do grupo OT, p ≤ 0.05.



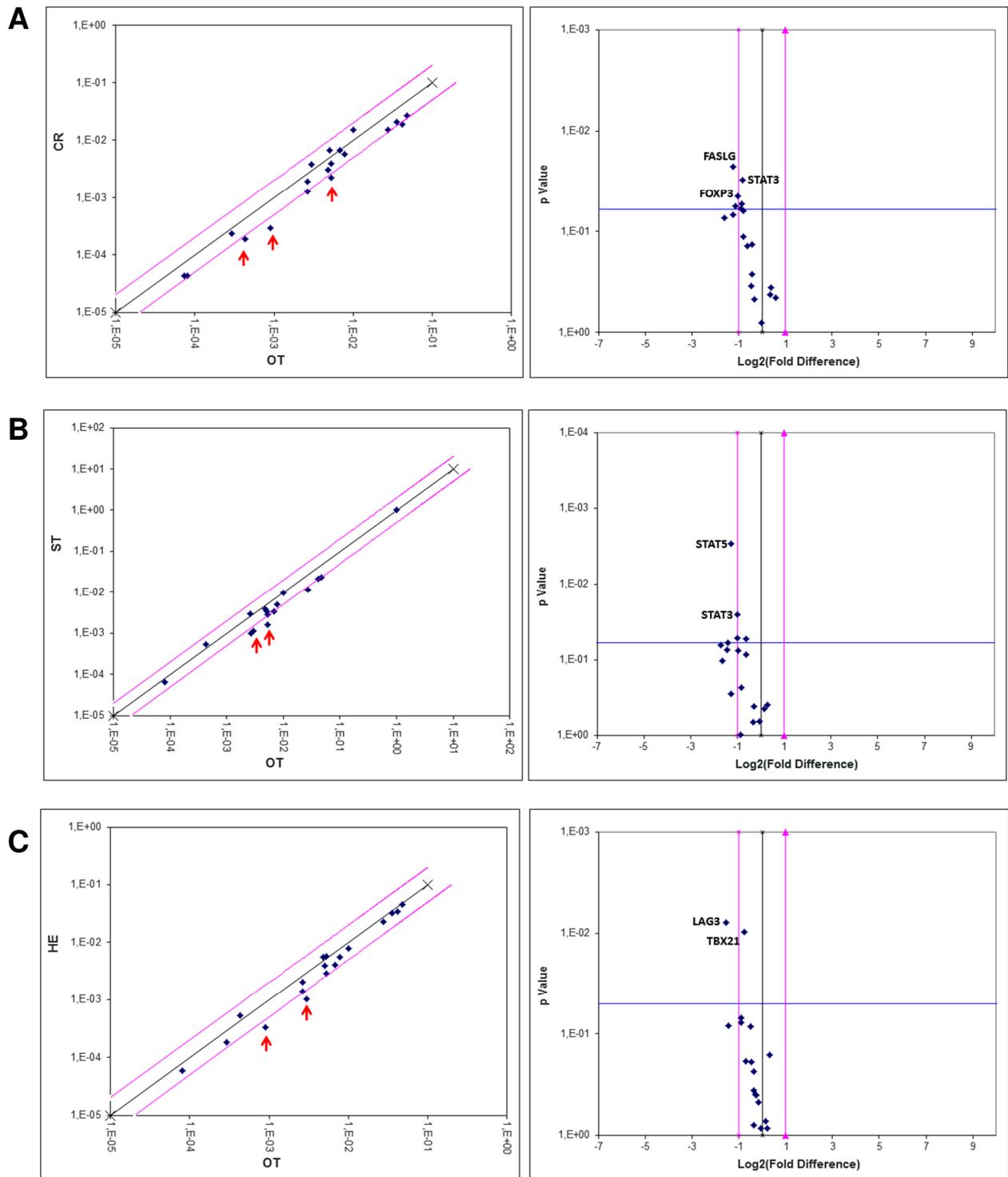
**Figura 6. Perfil de expressão de genes avaliados em células T.** Análise de agrupamento de 19 genes diferencialmente expressos em células T CD3<sup>+</sup> a partir de doadores saudáveis (n = 5) e doadores transplantados renal (n = 15). Esses genes tiveram sua expressão aumentada ou diminuída nas células T CD3<sup>+</sup> após o transplante. Os genes são representados nas linhas e os grupos clínicos em colunas. Para cada gene, cor verde significa valores mais elevados de expressão e de cor vermelha significa valores de expressão mais baixos do que a expressão média de todas as amostras. Esse *Heatmap* foi expresso como *fold change* para níveis de expressão de genes em relação às células T do grupo OT.  $p \leq 0.05$ .

**Tabela 6.** Expressão relativa de genes diferencialmente expressos envolvidos na regulação do sistema imune e tolerância imunológica validados por qPCR.

Gene description	Gene ID	CR	ST	HE
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	<b>CTLA4</b>	-1,34041	-3,29288	-1,853
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	<b>FASLG</b>	-2,38657	-1,83316	1,101378
Forkhead box P3	<b>FOXP3</b>	-2,07566	1,113128	-1,28037
GATA binding protein 3	<b>GATA3</b>	-1,3906	-2,66695	-1,86746
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	<b>GITR</b>	-1,56565	-1,24386	1,162837
Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	<b>GZMA</b>	1,499411	-1,02808	-1,28101
Granzyme M (lymphocyte met-ase 1)	<b>GZMM</b>	1,301057	-1,5365	-1,278
Interleukin 17A	<b>IL17A</b>	-1,7262	NS	NS
Interleukin 17A receptor	<b>IL17RA</b>	-1,35755	-1,5431	-1,39709
Interleukin 23 receptor	<b>IL23R</b>	-1,87643	-1,21806	-1,36827
Interleukin 7 receptor	<b>IL7R</b>	-2,21057	-1,93662	-1,20031
Lymphocyte-activation gene 3	<b>LAG3</b>	1,279364	-2,69903	-2,92097
Latent transforming growth factor beta binding protein 4	<b>LTBP4</b>	-1,25996	-1,77697	-1,6396
RAR-related orphan receptor C	<b>RORC</b>	-2,33608	1,224048	1,237843
Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	<b>STAT3</b>	-1,79999	-2,0178	-1,03973
Signal transducer and activator of transcription 4	<b>STAT4</b>	-1,74459	-2,43154	-1,11596
Signal transducer and activator of transcription 5A	<b>STAT5</b>	-1,81057	-2,40577	-1,22
T-box 21	<b>TBX21</b>	-1,01829	-2,00911	-1,70062
Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	<b>VDR</b>	-3,08176	-3,11199	-2,70396

Pacientes com tolerância operacional (OT), pacientes com rejeição crônica (CR), pacientes estáveis sob imunossupressão (ST) e indivíduos saudáveis (HE). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representados como *fold change* de três experimentos independentes. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05). NS não significativo para p ≤0,05.

Para confirmar as potenciais assinaturas gênicas de tolerância no transplante renal humano, comparações foram realizadas e mostraram que os perfis de expressão são mais distantes entre os grupos OT e CR. Um perfil de expressão menos disperso foi encontrado entre os grupos OT e ST (**Figura 7**). Esse perfil de expressão já era esperado, uma vez que os pacientes com rejeição crônica encontram-se sob forte inflamação do órgão transplantado, e os pacientes com tolerância operacional em homeostase. Encontramos cinco genes diferencialmente expressos de forma significativa entre os grupos OT e CR, FASLG, FOXP3, IL23R, STAT3 e STAT5. Cinco genes também foram encontrados entre OT e ST, GATA3, IL17RA, STAT3, STAT5 e TBX21. Na comparação entre os grupos OT e HE apenas dois genes foram significativamente diferencialmente expressos, LAG3 e TBX21 (**Figura 7**).



**Figura 7. Análise de correlação entre a expressão gênica diferencial em pacientes transplantados. (A) CR; (B) ST; (C) HE.** Ambos os *plots* mostram dados de expressão gênica em células TCD3<sup>+</sup> no transplante renal humano. *Scatter plot* (Esquerda) mostra a dispersão de todos os genes investigados (up and down fold regulation). *Volcano plot* (Direita): as setas vermelhas indicam pontos de interesse que exibem grande magnitude para ambos os eixos, *fold-changes* (eixo-x), bem como uma elevada significância estatística (p-valor, eixo-y). A linha azul mostra onde  $p = 0,05$ , com pontos acima da linha com  $p \leq 0,05$  e pontos abaixo da linha ter

$p > 0,05$ . A linha com a cor preta indica 1 *fold-change* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). As linhas cor de rosa indicam 2 *fold-changes* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) positiva ou negativamente regulado. Cada ponto azul representa um gene testado individualmente. Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir dos pacientes do grupo OT. Os resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. (n = 20;  $p \leq 0,05$ ). B2M foi usado como controle interno para normalização dos dados.

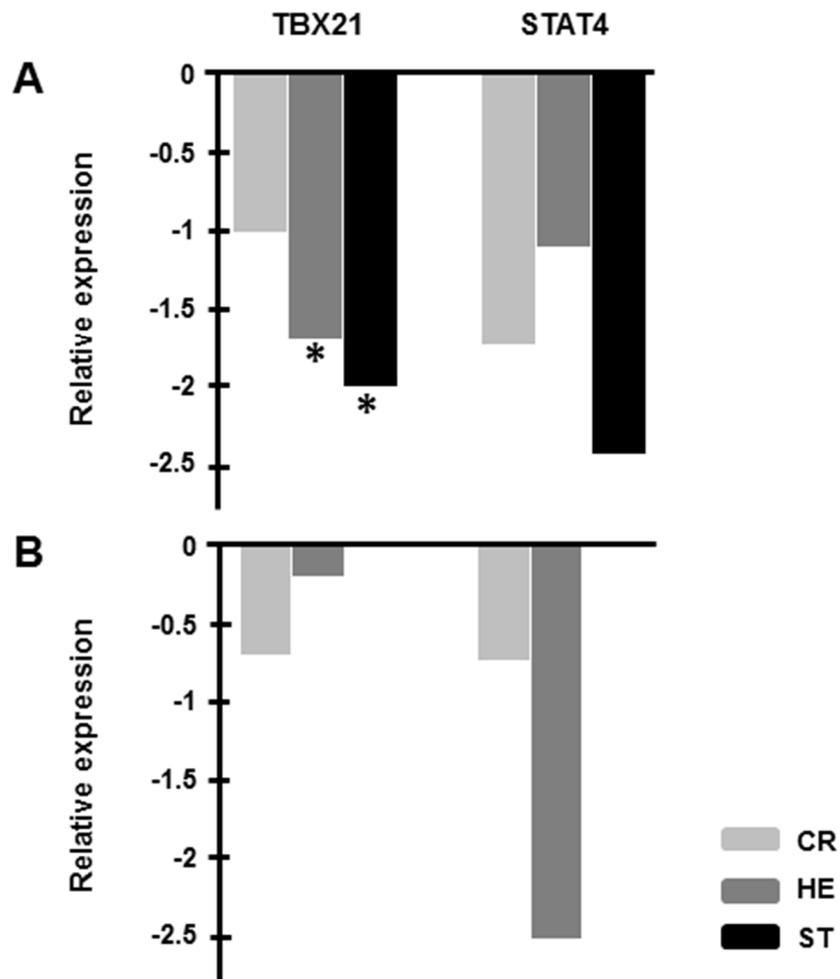
## 5.8. Regulação de genes envolvidos na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup>

Genes envolvidos em vários aspectos da regulação imune e diferenciação das células T foram diferencialmente expressos em todos os grupos de pacientes. Dentre eles, genes codificadores de várias moléculas de superfície celular, de proteínas envolvidas com a transdução de sinal, de fatores de transcrição e muitos outros genes.

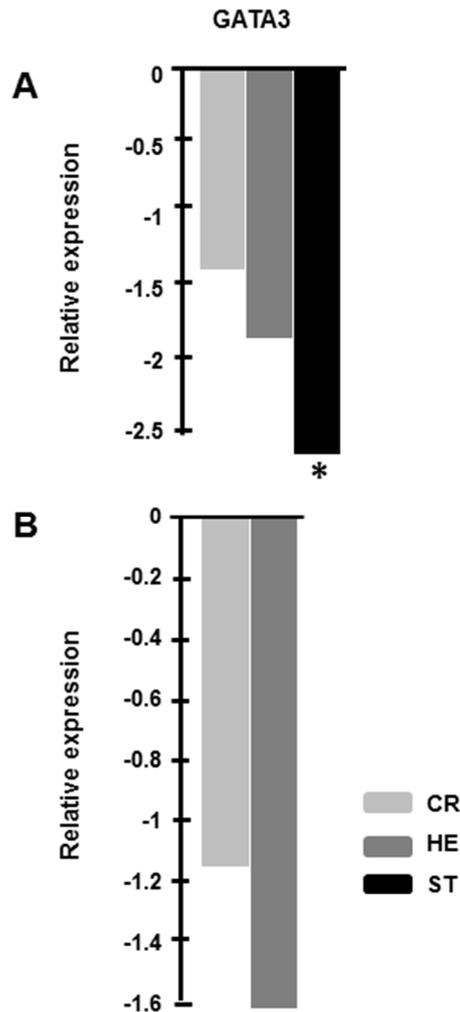
### 5.8.1. Genes envolvidos na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> Th1 e Th2

A diferenciação dos Linfócitos T em Th1 é dirigida pelos fatores de transcrição T-bet (codificado pelo gene TBX21) e STAT4. STAT4 e T-bet foram regulados negativamente em pacientes do grupo CR, ST e HE, detectados através do RNA-Seq e confirmado posteriormente por qPCR (**Figura 8**).

As células Th2 foram relatadas principalmente por apresentar um papel protetor no contexto de alotransplante, elas são reguladas pelo fator de transcrição GATA3. Foi encontrada uma expressão marcante de GATA3 em indivíduos OT em relação a indivíduos ST (**Figura 9**).



**Figura 8. Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Th1.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR (**A**) e RNA-Seq (**B**). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05).



**Figura 9. Análise quantitativa da expressão de GATA3 envolvido na diferenciação de células Th2.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR (A) e RNA-Seq (B). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05).

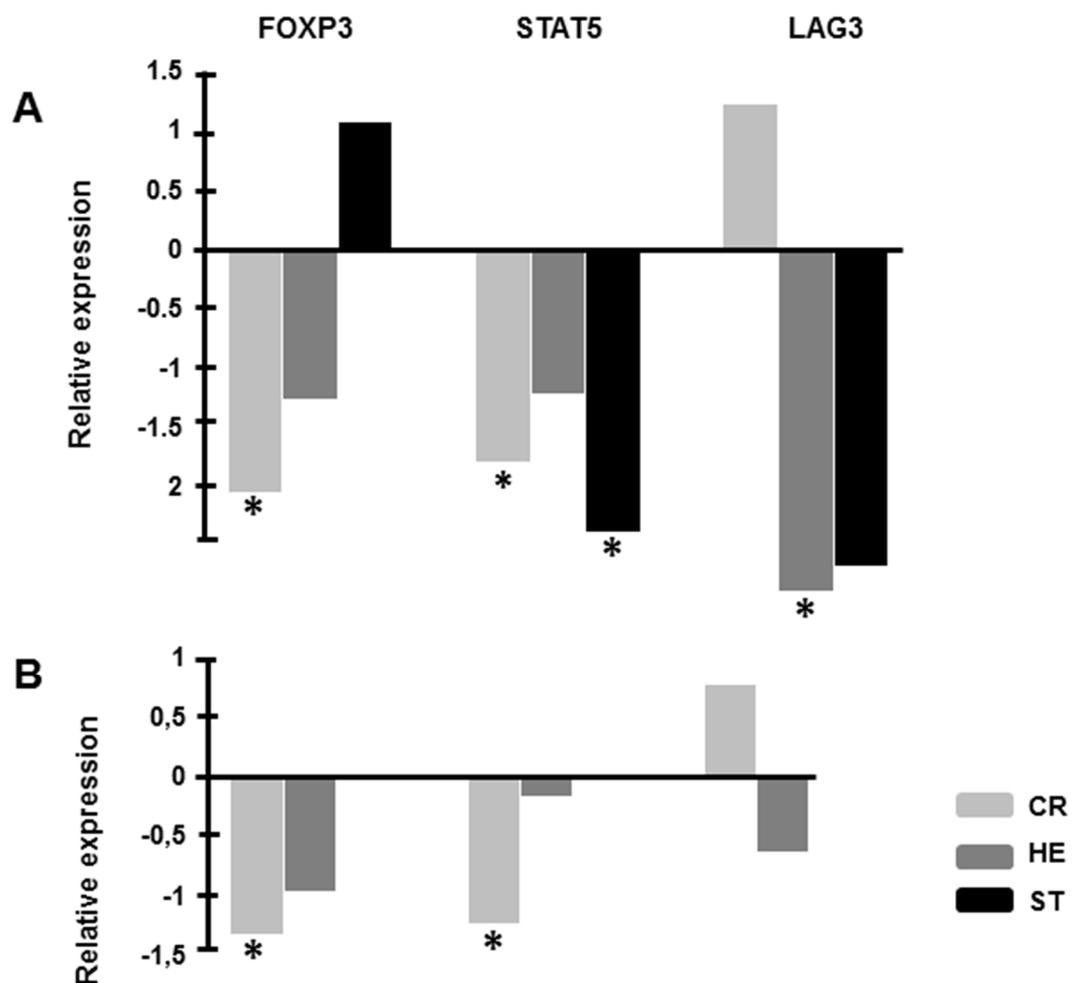
### 5.8.2. Genes envolvidos na diferenciação de células T reg

FOXP3 (*forkhead box P3*) é um importante fator de transcrição envolvido com a ativação e diferenciação das células T. Tem um papel crítico no desenvolvimento das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> de ocorrência natural (nTregs). Na ausência de FOXP3 as células T efetoras podem induzir doenças autoimunes pela falta das nTregs. Foi observado a regulação positiva de FOXP3 em

pacientes com tolerância operacional (**Figura 10**). Essa regulação foi também confirmada por qPCR.

STAT5 também foi regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional (**Figura 10**). STAT5 também regula a função de Treg ligando em regiões que podem ser importantes para a manutenção da expressão de FOXP3.

Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs expressam LAG3 após sua ativação. LAG3 marca populações de células T regs e contribui para a sua atividade supressora. LAG3 foi regulada positivamente em pacientes tolerante operacional em relação a indivíduos saudáveis (**Figura 10**).

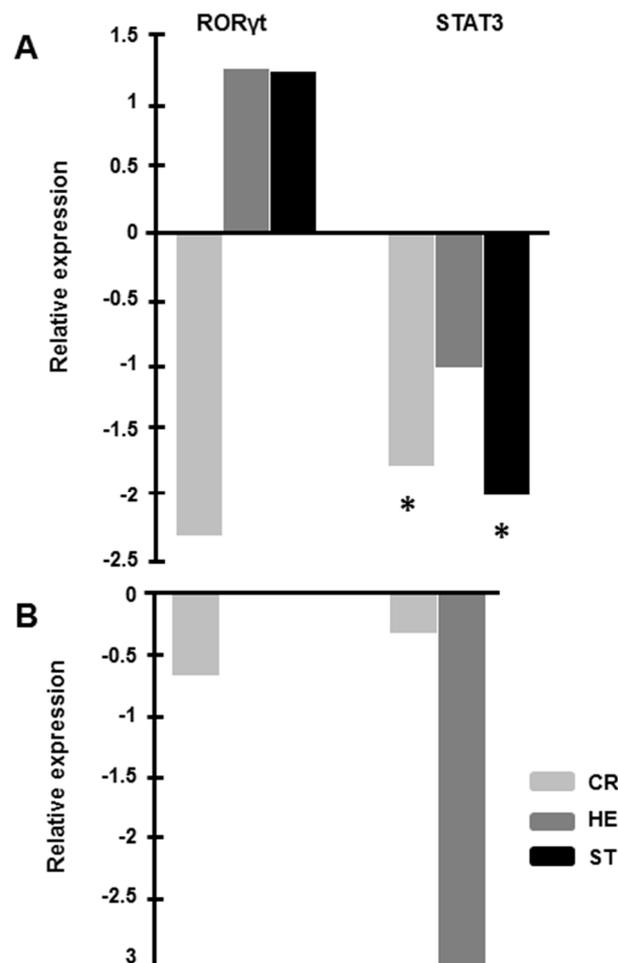


**Figura 10. Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Treg.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR (**A**) e RNA-Seq (**B**). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três

experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5;  $p \leq 0,05$ ).

### 5.8.3. Genes envolvidos na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> Th17

A diferenciação de células Th17 depende do fator de transcrição ROR $\gamma$ t e também requer a atividade de STAT3, que medeia a regulação positiva e eficiente de ROR $\gamma$ t e de outros genes associados a Th17, como IL-17. STAT3 foi regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional em relação a pacientes com rejeição crônica e enxerto estável sob imunossupressão, já ROR $\gamma$ t foi regulado positivamente em indivíduos saudáveis e pacientes com enxerto estável em relação a pacientes com tolerância operacional. (**Figura 11**).



**Figura 11. Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos na diferenciação de células Th17.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR (**A**) e RNA-Seq (**B**). Os dados foram normalizados para os níveis de

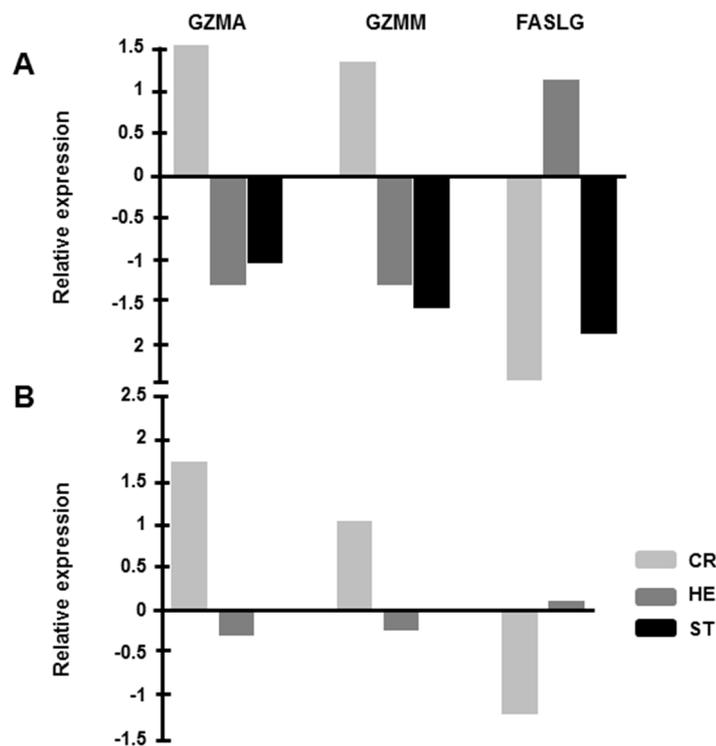
expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05).

### 5. 9. Genes envolvidos na morte celular por células T

Os genes GZMM, GZMA, XCL1, TNFRSF18 (GITR) e CTLA4 codificam moléculas, que além de estarem associadas com a morte celular, são importantes marcadores de imunorregulação. Esses genes foram regulados positivamente em diferentes grupos de pacientes (**Figura 5 e 12**).

A rejeição de enxertos de órgãos sólidos pelo receptor é mediada pelo sistema imune e o papel central é por mecanismos efetores de células T. Granzimas e perforinas são proteínas reguladoras de linfócitos T citotóxicos que medeiam a morte da célula alvo. Granzimas A e M foram encontradas reguladas positivamente em pacientes com rejeição crônica em relação a pacientes com tolerância operacional (**Figura 12**).

Já FASLG foi regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional quando comparado com pacientes com rejeição crônica ao transplante (**Figura 12**).

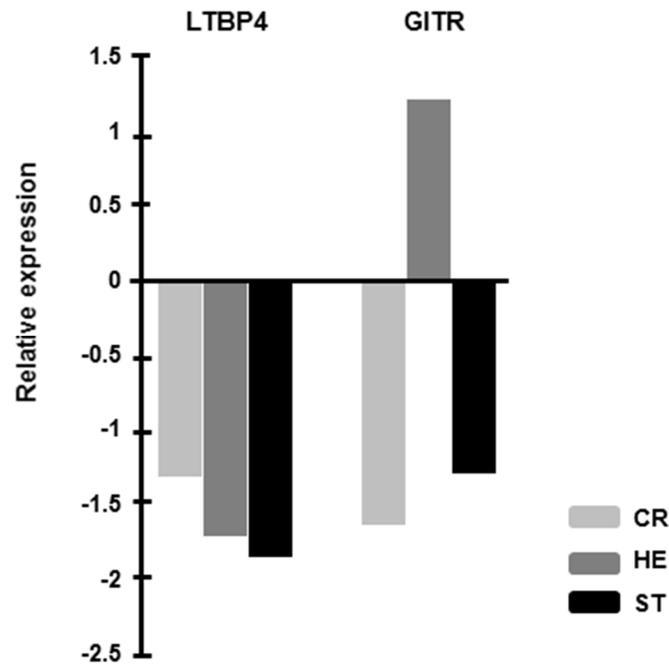


**Figura 12. Análise quantitativa da expressão de genes envolvidos em apoptose.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR (A) e RNA-Seq (B). Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05).

### 5.10. Proteínas de ligação a TGF- $\beta$

LTBPs (Latent transforming growth factor  $\beta$  binding proteins) são importantes componentes da matriz extracelular (ECM) que interagem com fibrillinas. Existem quatro isoformas de LTBPs no genoma humano (LTBP-1, -2, -3, e -4). LTBPs foram inicialmente identificadas formando complexos latentes com TGF- $\beta$  por ligação covalente do pró-peptídeo (LAP) através de ligações dissulfeto no retículo endoplasmático. LAP por sua vez é clivado em precursor maduro de TGF- $\beta$  na rede trans-Golgi, mas LAP e TGF- $\beta$  permanecem fortemente ligados através de interações não covalentes. LAP, TGF- $\beta$ , e LTBP juntos formam o grande complexo latente (LLC) (ROBERTSON et al., 2015).

LTBP4 foi encontrado regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional em relação a todos os outros grupos (**Figura 13**).



**Figura 13. Análise quantitativa de expressão de gênica.** Células TCD3<sup>+</sup> foram isoladas de pacientes transplantados e o mRNA foi analisado por qPCR. Os dados foram normalizados para os níveis de expressão em células T CD3<sup>+</sup> a partir do grupo OT. Resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados. B2M foi usado como controle interno para normalizar os dados. (OT, n= 5; CR, n= 5; ST, n= 5; HE, n= 5; p ≤0,05).

## Discussão

---

Neste trabalho, nós analisamos *ex vivo* um perfil de expressão diferencial de genes envolvidos com imunorregulação e tolerância imunológica em uma coorte brasileira de pacientes transplantados renais que desenvolveram espontânea tolerância operacional. Entretanto, uma limitação importante nos estudos da tolerância operacional, no contexto do transplante renal humano, é o pequeno número de indivíduos. Tolerância ao enxerto, sem a necessidade de imunossupressão, é uma condição rara, geralmente apresentada por indivíduos que suspenderam o uso dos medicamentos imunossupressores por conta própria devido aos inúmeros efeitos colaterais e fatores de risco associados ao uso dessas drogas. Atualmente, nós possuímos amostras biológicas de 7 indivíduos em estado de tolerância operacional provenientes de todo o Brasil, duas não foram incluídas nesse estudo.

As células T CD3<sup>+</sup> são os principais agentes da resposta imunológica quando se trata das doenças autoimunes e transplante de órgãos. Vários subconjuntos de células T já foram identificados, e todos eles são desenvolvidos no timo a partir de uma célula T precursora comum. Estudos recentes mostraram que essas células não são terminalmente diferenciadas, mas têm potencial para se diferenciar em outros subconjuntos de células T CD4. A diferenciação dos diferentes subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> é regulada por citocinas e outros sinais extracelulares presentes no microambiente. Genes envolvidos em vários aspectos da regulação imune foram encontrados diferencialmente expressos em todos os grupos clínicos, dentre eles, genes codificadores de várias moléculas de superfície e diferenciação celular.

Os fatores de transcrição T-bet (codificado pelo gene TBX21) e STAT4 são responsáveis pela diferenciação dos Linfócitos T em Th1. As células Th2 são reguladas pelo fator de transcrição GATA3. As células Th2 foram relatadas principalmente por apresentar um papel protetor no contexto de alotransplante. A expressão marcante de GATA3 em indivíduos OT em relação a indivíduos ST foi

confirmada (**Figura 9**). O primeiro trabalho publicado com avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição para linhagem Th2 e Th1, GATA3 e TBX21, entre os indivíduos tolerantes operacionais transplantados renais foi pelos nossos colaboradores (VIEIRA et al., 2011). Estes resultados suportam a ideia de que este eixo regulatório / inflamatório é relevante para a tolerância operacional e deverá ser ainda mais estudado no contexto da tolerância do transplante humano. IFN- $\gamma$  é secretada por células Th1 para ativar APCs (macrófagos, células dendríticas e células B), e induz um aumento da expressão de moléculas MHC de classe II de superfície e moléculas co-estimuladoras nas APCs, além de impulsionar a função de apresentação de antígeno. APCs secretam IL-12, que promove a fosforilação de STAT4 que por sua vez induz expressão do fator de transcrição T-bet em células T CD4 controlando a produção de IFN- $\gamma$ . Induzida por IL-12, IFN- $\gamma$  inicia um ciclo de feedback positivo que promove ainda mais a produção de IL-12 (SETHI et al., 2013). STAT4 e T-bet foram regulados negativamente em pacientes do grupo CR, ST e HE. Já IFN- $\gamma$  não foi detectado através do RNA-Seq (**Figura 8**).

As células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> desempenham um papel importante na manutenção da homeostase e tolerância imunológica por supressão da resposta de células T CD4<sup>+</sup> patogênicas, suprimindo a inflamação (XU et al., 2007; LAL et al., 2011). Tem sido demonstrado até agora que o fator de transcrição Foxp3 é um bom marcador para as células T CD4<sup>+</sup>, que regulam as respostas imunológicas para autoantígenos, bem como a uma variedade de antígenos estranhos incluindo antígenos infecciosos ou tumorais, aloantígenos, alérgenos e antígenos comensais. A conversão de células Treg FOXP3<sup>-</sup> em Treg FOXP3<sup>+</sup> madura ocorre no timo por uma via independente do TCR, mas esse processo é dependente de IL-2 e STAT5. STAT5 também regula a função de Treg ligando em regiões que podem ser importantes para a manutenção da expressão de FOXP3. Uma característica importante da tolerância periférica é a conversão de células T CD4<sup>+</sup> naïve em células Tregs induzidas (iTreg) nos órgãos linfóides periféricos. iTregs têm um papel importante na proteção contra as condições inflamatórias crônicas, e provavelmente desempenham um papel chave na regulação de respostas imunológica a transplantes (MAHMUD et al., 2013). Tanto FOXP3 quanto STAT5 foram regulados positivamente em pacientes com tolerância operacional (**Figura 10**).

Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs expressam LAG3 após sua ativação. LAG3 marca populações de células Tregs e contribui para a sua atividade supressora. Por fim, a expressão ectópica de LAG3 em células TCD4<sup>+</sup> reduz significativamente a sua capacidade proliferativa e confere-lhes atividade supressora em relação às células T efectoras (CHATENOUD, 2011). LAG3 foi regulada positivamente em pacientes tolerante operacional em relação a indivíduos saudáveis (**Figura 10**).

Células T CD4<sup>+</sup> naïve, sob a influência de IL-6 e TGF- $\beta$  diferenciam-se em um subconjunto distinto chamado Th17 a qual secreta IL-17A, IL-17F, e IL-22. É bem conhecido que as células Th17 tem um papel central no desenvolvimento da inflamação, o que é fundamental na defesa contra agentes patogênicos. Além disso, as células Th17 desempenham um papel importante na patogênese de várias doenças autoimunes e rejeição de enxerto. A diferenciação de células Th17 depende do fator de transcrição ROR $\gamma$ t e também requer a atividade de STAT3, que medeia a regulação positiva e eficiente de ROR $\gamma$ t e de outros genes associados a Th17, como IL-17 (UEDA et al., 2012). Foxp3 é capaz de ligar no fator de transcrição ROR $\gamma$ t e inibir a sua atividade de transcrição. STAT3 foi regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional em relação a pacientes com rejeição crônica e enxerto estável sob imunossupressão (**Figura 11**).

A morte celular apoptótica induzida pelo acoplamento de FAS por FASLG desempenha um papel importante na modulação da função imunológica, especialmente na morte celular induzida por ativação (AICD). Em linhagens de células T, AICD é mediado pela via FAS / FASLG. A ativação da morte celular induzida tem duas funções: (i) limitar a expansão de clones de células T após a eliminação dos antígenos; e, (ii) inativar as células T auto-reativas periféricas que podem ter evadido da triagem para auto reatividade no timo por seleção negativa. FAS é um gene que codifica uma proteína da superfície celular com um domínio extracelular que se liga a FASLG, e um domínio citoplasmático que transduz o sinal de morte. A apoptose é executada pelo engate e co-agregação de FASLG com o receptor FAS na superfície da célula, seguido por uma série de interações moleculares intracelulares que coordenam a ativação de caspases e morte celular (WARING & MÜLLBACHER, 1999).

FASLG é um gene que codifica uma proteína da superfície celular que é indutivamente expressa em linfócitos, particularmente células T, e constitutivamente expressa em células presentes em órgãos imunes privilegiados, tais como as células epiteliais do olho. Na medida em que a apoptose mediada por FASLG é crítica para a homeostase da célula T periférica, e mecanismos efetores citotóxicos, a expressão indutível de FASLG por células T é rigorosamente controlada ao nível da transcrição, através de interações complexas entre os vários reguladores transcricionais positivos e negativos (WARING & MÜLLBACHER, 1999). FASLG desempenha um papel central na AICD, tolerância a antígenos próprios, evasão imune por tumores. Esforços intensos têm existido para utilizar a via FAS / FASLG como uma abordagem imunomoduladora para induzir tolerância para auto e antígenos de transplante, e para o tratamento / prevenção de autoimunidade e rejeição do enxerto (ASKENASY et al., 2005). FASLG foi regulado positivamente em pacientes com tolerância operacional quando comparado com pacientes com rejeição crônica ao transplante (**Figura 12**).

A rejeição de enxertos de órgãos sólidos pelo receptor é mediada pelo sistema imune e o papel central é por mecanismos efetores de células T. Granzimas e perforinas são proteínas reguladoras de linfócitos T citotóxicos que medeiam a morte da célula alvo. Vários trabalhos mostram dados clínicos implicando granzimas e perforinas na rejeição crônica e aguda do transplante de órgãos sólidos, bem como dados obtidos em experiências com animais que suportam um papel principal para estas moléculas efetoras na rejeição do aloenxerto (CHOY, 2010). Granzimas A e M foram encontradas reguladas positivamente em pacientes com rejeição crônica em relação a pacientes com tolerância operacional (**Figura 12**).

Brouard e colaboradores (2007), também mostraram que FOXP3, GITR e LTBP4, todas essas moléculas relacionadas com nTreg, foram elevados em controles normais e pacientes tolerantes em comparação com pacientes com rejeição crônica, demonstrando um papel de regulação das células T na tolerância e, inversamente, a sua perda durante a rejeição. Curiosamente, TGF- $\beta$ , uma molécula tolerogênica chave, não foi diferentemente expressa entre os indivíduos tolerantes e rejeição crônica, mas 27% dos genes de sangue periférico que distinguem entre a tolerância e rejeição foram regulados por TGF- $\beta$ . Nas análises aqui mostradas, TGF-

$\beta$  também não foi diferencialmente expresso, mas LTBP4 e GITR foram regulados positivamente em pacientes com tolerância operacional (**Figura 13**).

Em resumo, os dados obtidos até aqui, com a coorte brasileira de pacientes transplantados renais, são bem similares aos descritos na literatura. Nós observamos com uma análise de múltiplos genes que indivíduos tolerantes operacionais possuem um predomínio de modificações imunorreguladoras. Isso pode contribuir no estabelecimento de um microambiente mais propício ao desenvolvimento de tolerância.

## Conclusão e Perspectivas

---

O transplante renal continua a ser o principal tratamento para doenças renais em estágio final, mas muitas vezes é complicado pela rejeição aguda ou rejeição crônica ou por efeitos secundários de longo prazo de imunossupressão. As bases moleculares destes processos foram analisadas por perfis de expressão gênica demonstrando o potencial desta abordagem para decifrar processos patológicos complexos em doenças humanas. Apesar de alguns progressos empíricos na minimização da imunossupressão marcadores biológicos confiáveis para identificar a tolerância operacional no transplante renal ainda não existem.

Em suma, nós identificamos um pequeno painel de biomarcadores utilizando o perfil de expressão gênica de células T no sangue periférico a partir de pacientes transplantados renais espontaneamente tolerantes. A assinatura gênica aqui obtida sugere um padrão de apoptose por respostas de células T citotóxicas na rejeição crônica, bem como uma polarização para T regs na tolerância operacional. Essa assinatura gênica sugere também que pode contribuir para este processo possivelmente através da regulação de fenótipos específicos de células T reguladoras periféricas ou alterar o limiar de ativação de células T. Este conjunto de genes associados à tolerância operacional pode ter utilidade como uma ferramenta de monitoramento minimamente invasivo para orientar titulação de imunossupressão. Promover a validação desse instrumento para a minimização imunossupressão seguro em ensaios clínicos prospectivos se justifica.

Durante a análise do Transcritoma foram propostas duas abordagens: uma para *Gene model* (DESeq2) e outra para *Transcript model* (Cufflinks). As análises realizadas até aqui se basearam apenas em *Gene model* (DESeq2), como perspectivas para o estudo analisaremos *Transcript model* (Cufflinks) e validaremos novas moléculas de ncRNAs que foram diferencialmente expressas na análise de RNA-Seq.

## ANEXO I - Aprovação do projeto pelo comitê de ética



# APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/08/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0476/08**, intitulado: **"TOLERÂNCIA OPERACIONAL NO TRANSPLANTE RENAL HUMANO: REPERTÓRIO DE LINFÓCITOS B E DE ALO E AUTO-ANTICORPOS."** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho**

Pesquisador (a) Executante: **Hernandez Moura Silva**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2008

**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Presidente da Comissão de**  
**Ética para Análise de Projetos**  
**de Pesquisa**

COMISSÃO CIENTÍFICA  
 RECEBIDO

08 / 08 / 08  
*Libera*

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

## ANEXO II - Dados demográficos e clínicos dos sujeitos da pesquisa

**Tabela 7.** Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de tolerância operacional.

Paciente	LTx 03	LTx 08	LTx 10	LTx 75	LTx 62
Matching	1	2	3	4	5
Sexo	M	M	F	-	M
Idade	54	41	42	-	31
Doença de Base	Glomerulonefrite membrano proliferativo	Glomerulonefrite crônica	Nefropatia diabética	-	Glomerulonefrite esclerose segmentar focal
Nº de Gestações	NA	NA	2	-	NA
Tempo de hemodiálise (meses)	ND	24	NA	-	ND
Nº de transfusões	ND	2	0	-	ND
Nº de Transplantes	ND	2	1	-	1
Tempo de Transplante (anos)	25	7	9	-	14
Tipo de Doador	Vivo não Aparentado	Falecido	Vivo Aparentado	-	Vivo Aparentado
Disparidades HLA	3	4	Idêntico	-	3
Tempo de Isquemia	ND	16:00	01:00	-	01:00
Função Retardada do Enxerto	NC	Sim	Não	-	Não
Terapia de Indução	NC	Basiliximab	Não	-	Não
Rejeição Aguda	Não	Sim	Não	-	Não
Rejeição Crônica	Não	Não	Não	-	Não
Terapia IS Inicial	NC	Pred, Tacro, MMF	Cya, Aza, Pred	-	Cya, Aza, Pred
Terapia IS Final	Sem IS desde 2002	Sem IS desde 2006	Sem IS desde 2003	-	Sem IS desde 2005
Comorbidades	Hipertensão Arterial; Obesidade	HBV e HCV	Múltiplos abscessos perianal; jan/2004 - Infarto Agudo do Miocárdio com Angioplastia; mar/08 - Abscesso de mama; ago/08 - Infarto Agudo do Miocárdio	-	Recidiva de GESF no rim Tx
Cretinina Sérica	1,15	1,62	0,89	-	1,71

LTx: Transplante; OT: Tolerância operacional; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível; Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. HBV: Hepatite B; HCV: Hepatite C; GESF: Gloméruloesclerose segmentar e focal. ND: não disponível; IS: Imunossupressão.

**Tabela 8.** Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de Rejeição Crônica.

Paciente	LTx 25	LTx 04	LTx 13	LTx 67	LTx 05
Matching	1	2	3	4	5
Sexo	M	M	F	F	M
Idade	51	46	28	41	35
Doença de Base	Glomerulonefrite crônica	Glomerulonefrite crônica	Glomerulonefrite crônica	Glomerulonefrite crônica	Glomerulonefrite crônica
Nº de Gestações	NA	NA	0	0	NA
Tempo de hemodiálise (meses)	55	ND	12	25	60
Nº de Transfusões	2	8	1	ND	0
Nº de Transplantes	1	1	1	1	1
Tempo de Transplante (anos)	15	6	12	13	9
Tipo de Doador	Falecido	Falecido	Vivo Aparentado	Vivo Aparentado	Falecido
Disparidades HLA	6	6	2	1	6
Função Retardada do Enxerto	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Terapia de Indução	Não	ND	Não	Não	ATG
Rejeição Aguda	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Rejeição Crônica	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Última Biópsia (ano)	2007	2005	2006	2005	2004
Histologia	Arterioescleros e hialia extensa, atrofia e fibrose focais	NCE Banf II, fibrose focal	NCE com glomerulopatia do Tx, C4d positivo	NCE Banff II	NCE Banf I, arterioescleros e hialia, C4d positivo
Terapia IS Inicial	Cya, Aza, Pred	ND	Cya, Aza, Pred	Cya, Aza, Pred	Cya, Aza, Pred
Comorbidades	jan/96 e jul/97 - Pneumonia lobar; jun/03 - Herpes Zoster	ND	2008 - CMV; 1999 - Condiloma Acuminado; 2005 - Pneumonia; 2008 - Herpes Simples	2005 - ITU; 1999 - Cisto Ovariano esquerdo + Salpingectomia esquerda; Endometriose; Hipertensão Arterial; Dislipidemia; 2004 e 2006 - Gota; 2007 - Herpes Zoster	HCV, Herpes Simples; 2001 - Candidíase genital; Amidalite
Cretinina Sérica	2,26	1,21	1,64	2,06	1,41

LTx: Transplante; CR: Rejeição Crônica; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível; ATG: Timoglobulina Anti-timocitária; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; Pred: Prednisolona; HCV: Hepatite C; ITU: Infecção do trato urinário; NA: não se aplica; ND: não disponível; IS: Imunossupressão; NCE: Nefropatia crônica do enxerto.

**Tabela 9.** Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto sob doses habituais de imunossuppressores.

Paçiente	LTx 28	LTx 09	LTx 14	LTx 27	LTx 31
Matching	1	2	3	4	5
Sexo	M	M	F	F	M
Idade	56	47	45	47	56
Doença de Base	Glomerulonefrite crônica	Insuficiência Renal sem Causa Definida	Nefropatia diabética	Glomerulonefrite crônica	Insuficiência Renal a Esclarecer
Nº de Gestações	NA	NA	2	ND	NA
Tempo de hemodiálise (meses)	2	18	24	60	26
Nº de Transfusões	ND	ND	0	>5	2
Nº de Transplantes	1	1	1	1	1
Tempo de Transplante (anos)	36	6	4	24	7
Tipo de Doador	Falecido	Vivo	Falecido	Vivo	Vivo Aparentado
Disparidades HLA	3	3	3	3	3
Função Retardada do Enxerto	NC	ND	Não	NC	Não
Terapia de Indução	Não	Basilixmab	Basilixmab	Não	Daclizumab
Rejeição Aguda	Não	Não	Não	Sim	Sim
Rejeição Crônica	Não	Não	Não	Não	Não
Terapia IS Inicial	Pred, Aza	Pred, Tacro, MMF	Pred, Tacro, MMF	Pred, Aza	Pred, Tacro, MMF
Comorbidades	Fev/2004 - Celulite	Blastocistose	ND	ND	Abr/2008 - Adenocarcinoma de Próstata; Candidíase
Cretinina Sérica	1,23	0,89	0,88	0,86	1,28

LTx: Transplante; ST: indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossuppressores; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível; Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado antiCD25; Aza: Azatioprina; MMF: Micofenolato mofetil; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona; ND: não disponível; IS: Imunossupressão.

**Tabela 10.** Dados demográficos dos indivíduos saudáveis.

<b>Paciente</b>	<b>LTx 41</b>	<b>LTx 36</b>	<b>LTx 40</b>	<b>LTx 37</b>	<b>LTx 43</b>
<b>Matching</b>	1	2	3	4	5
<b>Sexo</b>	M	M	F	F	M
<b>Idade</b>	39	42	34	52	30

LTx: Transplante (doador); SA: indivíduo saudável; M: masculino; F: feminino.

## ANEXO III – Genes diferencialmente expressos obtidos através do RNA-Seq

**Tabela 11.** Os genes listados abaixo são diferencialmente expressos em cada comparação ( $p \leq 0.001$ ).

OTxCR (320 genes)	OTxST (120 genes)	OTxHE (25 genes)
AARS	AADACL3	ACMSD
ABCA2	AC007256.5	FAM129C
ABCF2P1	AC007386.2	HCG4P7__2
ABLM1	ACTN4P1	HGD
AC004057.1	ADAM6	HLA-DQB1__3
AC015971.2	ANK2	HLA-T__6
AC062029.1	ANKRD20A8P	hsa-mir-6723
AC093642.3	ANXA3	HSPA1A__1
AC138035.2	APOA5	HSPA6
AC159540.1	ARAP2	HSPA7
AGPAT9	ASIC3	IFI44
AGTRAP	ATP1B4	IFIT1
AK5	AUTS2	IGLV2-8
AL009178.1	BDP1__1	IL1B
APEX2	BSN-AS2	MCOLN2
APOBEC3G	BTBD11	NPIP15
ARRHGEF18	C1orf145	NRCAM
ARRDC4	C5orf51	PCK2
ATHL1	CA10	PTGER2
B3GAT1	CALCOCO2	RP11-473M20.9
BATF	CDH6	RP11-706O15.5
BIN2P1	CITED4	RPL5P5
BMF	CLSTN2	S100B
BRD8	CMIP	TRBV7-4__1
BTBD19	COL4A1	UTS2
BYSL	COL5A3	
BZRAP1	CPA5__1	
C11orf21	DDX60	
C11orf30	DSC3	
C5orf51	DUSP16	
C6orf211	ELL2P1	
C9orf69	EPST11	
CACNA11	F2R	
CACNB1	FAM129C	
CBX4	FAS	
CCDC64	FGFR1	
CCDC78	GPR179__1	
CCL3L3__1	HCP5__2	
CCR4	HERC5	
CCR7	HERC6	
CD200R1	HHIPL2	
CD44	hsa-mir-6723	
CD52	IFIT1	
CD58	IFIT3	
CDKN2D	IFIT5	
CEP89	IKZF3	
CITED4	IL2RB	
CMTM8	ISG15	
COL6A2	KIF20B	
COPB2	KLRD1	
CPOX	LAX1	
CTA-445C9.15	LINC00264	
CTD-2350C19.1__1	MAF	
CTD-2562J17.7	MAST4-AS1	
CTNNAL1	METRNL	
CTSK	MLIP	
CTSW	MT1G	
CXCR3	MT2A	
CYSLTR1	MTHFD1L	
CYSTM1	MTHFD2P7	
DCAF7	MUC19	
DDX60	MUC5B	
DIP2C	MYOM2__1	
DLEU2	NR3C1	
DLGAP1-AS1	NUTM1	
DMPK	OAS1	
DNAJB13	OAS2	
DNAJC5	OASL	
DOCK3__1	OR5BJ1P	
DUSP1	PERP	
EBF4	PI16	
EIF5B	PIK3CG	
ENKD1	PLCG2	
EPHX2	PLEKHA2	
EVI2A	PPAPDC3	
FADD	PRAM1	
FAM101B__1	PSAT1	
FAM129C	PSG4	
FAM83G	PYGM	
FARSA	RAB1F	
FBLN7	REEP6	
FBXO33	RHBDL1	
FCRL6	RIF1	
FLT4	RNF19A	
FOS	RP11-291B21.2	
GAB2	RP11-305P22.9	
GALNT12	RP11-402L6.1	
GGCX	RP11-465B22.3	
GIMAP4	RP11-466L17.1	

---

GIMAP5	RP11-473M20.9
GIMAP6	RP11-475A13.1
GIMAP7	RP11-758M4.4
GIMAP8	RP11-87N24.2
GIN1__1	RP1-232L22__B.1
GOLPH3L	RP1L1
GPKOW__2	S100B
GPR132	SCGB3A1
GPR15	SERPINB9
GPR171	SESN3
GPR27	SH2D1B
GPR56	SH2D2A
GPR68	SKOR1
GRIN2C	SLA
GRK5	SLC25A3P1
GSAP	SLC2A3P4
GZMA	SLCO5A1
GZMM	SMC3
HCCS	SMCHD1
HCG4P7__2	SNAP25-AS1
HCST	SYTL3
HERC5	TANC1
HERC6	THBS1
HIATL1	TINCR
HIVEP3	UBE4A__1
HLA-DQB1__3	USP35
HLA-T__6	VWC2L
HNRNPA1P21	WEE1
HNRNPF	XRN1
HOMEZ	ZNF720P1
HSPA1A__1	ZNF99
HSPA1B__3	
IFIH1	
IFIT1	
IFIT2	
IFIT3	
IGFBP4	
IGHM__2	
IL7R	
IQSEC1	
IQSEC3__1	
ISG15	
ITGAX	
ITGB2	
ITGB2-AS1	
JRKL	
JUNB	
JUND	
KCNQ1	
KCTD21	
KDSR	
KEAP1	
KIAA1033	
KIF20B	
KIR3DL2__1	
KLF2	
KLHL6	
KLRF1	
LDHAP7	
LGALS1	
LILRB1__3	
LINC00264	
LINC00312	
LINC00565	
LLGL2	
LPAR6	
LPXN	
LRRN3	
LTBP4	
MATK	
MED18	
METTL13	
MFAP1	
MMP24-AS1	
MPEG1	
MRPL15	
MS4A1	
MSANTD4	
MT1F	
MT1G	
MT1HL1	
MT1XP1	
MT2P1	
MTHFD1L	
MYB	
MYO18A	
MYO1F__2	
NAPSB	
NCALD	
NCDN	
NCS1__2	
NDFIP2	
NDRG2	
NETO2	
NHS	
NOG	
NPEPL1	
NPIP15	
NR3C1	
NRCAM	
NSUN6	

---

---

OAS2  
OASL  
ORAI2  
ORMDL2  
OSBPL5  
PCDHGA7  
PCGF7P\_\_1  
PCK2  
PDGFRB  
PDZD4\_\_2  
PGAP1  
PIGX  
PLCB2  
PMEPA1  
POLD3  
PRAM1  
PREB  
PRKCB  
PRKCI  
PRPF38AP2\_\_1  
PRSS23  
PSAT1  
PTCH1  
PTGDS  
PUS7  
RAB10  
RAB37  
RALA  
RAP1GAP2  
REM2  
RHBDL1  
RNF5P1  
RNU12  
RP11-118B18.1  
RP11-159D12.2  
RP11-29G8.3  
RP11-408A13.4  
RP11-465B22.3  
RP11-469M7.1  
RP11-473M20.9  
RP11-4F5.2  
RP11-528A10.2  
RP11-553L6.5  
RP11-63E16.1  
RP11-758M4.4  
RP11-81H14.2  
RP11-964E11.2  
RP1-39G22.7  
RP1-90L6.2  
RP4-647J21.1  
RP6-145B8.3  
RPE  
RSAD2  
RSPH3  
S100A4  
S100B  
S1PR1  
SAMD9  
SAMSN1  
SCARF2  
SERF1A  
SH3BP1  
SIGLEC17P  
SIPA1L1  
SIRPB1  
SKAP1  
SLC14A1  
SLC17A9  
SLC1A4  
SLC25A45  
SLC6A4  
SLCO4C1  
SMDT1\_\_3  
SNX25  
SNX9  
SPHK1  
SPON2  
STT3A  
SULT1A1  
SYNE3  
TAF4B  
TBL2\_\_1  
TENM1  
THBS1  
TINCR  
TMC8  
TMEM140  
TMEM245  
TMEM43  
TMOD2  
TMOD3  
TNFRSF9  
TNFSF14  
TP53BP1  
TPM2  
TRABD2A  
TRAM2  
TRAT1  
TRAV13-1  
TRERF1  
TRIM52-AS1

---

TRMT6  
 TRNT1  
 TTC16  
 TTC38  
 TXK  
 TXNIP\_1  
 UNC5CL  
 USP35  
 VPS35  
 WARS  
 WDFY4  
 WNT10B  
 WSB1  
 XIST  
 YARS  
 ZAP70  
 ZBTB6  
 ZC3H10  
 ZC3H12D  
 ZDHHHC16  
 ZFP69B  
 ZHX2  
 ZNF181  
 ZNF189  
 ZNF234  
 ZNF260  
 ZNF786  
 ZNF800  
 ZW10

**Tabela 12.** Genes diferencialmente expressos com  $p \leq 0.001$ , para as três comparações: OTxCR; OTxST e OTxHE. Dados obtidos a partir do RNA-Seq.

Genes comum entre OTxCR, OTxST and OTxHE	Only OTxCR and OTxST	Only OTxST and OTxHE	Only OTxCR and OTxHE	Unique OTxCR	Unique OTxST	Unique OTxHE
FAM129C	C5orf51	hsa-mir-6723	HCG4P7__2	AARS	AADACL3	ACMSD
IFIT1	CITED4		HLA-DQB1__3	ABCA2	AC007256.5	HGD
RP11-473M20.9	DDX60		HLA-T__6	ABCF2P1	AC007386.2	HSPA6
S100B	HERC5		HSPA1A__1	ABLIM1	ACTN4P1	HSPA7
	HERC6		NPIP15	AC004057.1	ADAM6	IFI44
	IFIT3		NRCAM	AC015971.2	ANK2	IGLV2-8
	ISG15		PCK2	AC062029.1	ANKRD20A8P	IL1B
	KIF20B			AC093642.3	ANXA3	MCOLN2
	LINC00264			AC138035.2	APOA5	PTGER2
	MT1G			AC159540.1	ARAP2	RP11-706O15.5
	MTHFD1L			AGPAT9	ASIC3	RPL5P5
	NR3C1			AGTRAP	ATP1B4	TRBV7-4__1
	OAS2			AK5	AUTS2	UTS2
	OASL			AL009178.1	BDP1__1	
	PRAM1			APEX2	BSN-AS2	
	PSAT1			APOBEC3G	BTBD11	
	RHBDL1			ARHGEF18	C1orf145	
	RP11-465B22.3			ARRDC4	CA10	
	RP11-758M4.4			ATHL1	CALCOCO2	
	THBS1			B3GAT1	CDH6	
	TINCR			BATF	CLSTN2	
	USP35			BIN2P1	CMIP	
				BMF	COL4A1	
				BRD8	COL5A3	
				BTBD19	CPA5__1	
				BYSL	DSC3	
				BZRAP1	DUSP16	
				C11orf21	ELL2P1	
				C11orf30	EPST11	
				C6orf211	F2R	
				C9orf69	FAS	
				CACNA11	FGFR1	
				CACNB1	GPR179__1	
				CBX4	HCP5__2	
				CCDC64	HHIPL2	
				CCDC78	IFIT5	
				CCL3L3__1	IKZF3	
				CCR4	IL2RB	
				CCR7	KLRD1	
				CD200R1	LAX1	
				CD44	MAF	
				CD52	MAST4-AS1	
				CD58	METRNL	
				CDKN2D	MLIP	
				CEP89	MT2A	
				CMTM8	MTHFD2P7	
				COL6A2	MUC19	
				COPB2	MUC5B	
				CPOX	MYOM2__1	
				CTA-445C9.15	NUTM1	
				OAS1		
				CTD-2562J17.7	OR5BJ1P	
				CTNNAL1	PERP	
				CTSK	P116	
				CTSW	PIK3CG	
				CXCR3	PLCG2	
				CYSLTR1	PLEKHA2	
				CYSTM1	PPAPDC3	
				DCAF7	PSG4	

---

DIP2C	PYGM
DLEU2	RAB1F
DLGAP1-AS1	REEP6
DMPK	RIF1
DNAJB13	RNF19A
DNAJC5	
DOCK3__1	RP11-291B21.2
DUSP1	RP11-305P22.9
EBF4	RP11-402L6.1
EIF5B	RP11-466L17.1
ENKD1	RP11-475A13.1
EPHX2	RP11-87N24.2
EVI2A	RP1L1
FADD	SCGB3A1
FAM101B__1	SERPINB9
FAM83G	SESN3
FARSA	SH2D1B
FBLN7	SH2D2A
FBXO33	SKOR1
FCRL6	SLA
FLT4	SLC25A3P1
FOS	SLC2A3P4
GAB2	SLCO5A1
GALNT12	SMC3
GGCX	SMCHD1
GIMAP4	SNAP25-AS1
GIMAP5	SYTL3
GIMAP6	TANC1
GIMAP7	UBE4A__1
GIMAP8	VWC2L
GIN1__1	WEE1
GOLPH3L	XRN1
GPKOW__2	ZNF720P1
GPR132	ZNF99
GPR15	
GPR171	
GPR27	
GPR56	
GPR68	
GRIN2C	
GRK5	
GSAP	
GZMA	
GZMM	
HCCS	
HCST	
HIATL1	
HIVEP3	
HNRNPA1P21	
HNRNPF	
HOMEZ	
HSPA1B__3	
IFIH1	
IFIT2	
IGFBP4	
IGHM__2	
IL7R	
IQSEC1	
IQSEC3__1	
ITGAX	
ITGB2	
ITGB2-AS1	
JRKL	
JUNB	
JUND	
KCNQ1	
KCTD21	
KDSR	
KEAP1	
KIAA1033	
KIR3DL2__1	
KLF2	
KLHL6	
KLRF1	
LDHAP7	
LGALS1	
LILRB1__3	
LINC00312	
LINC00565	
LLGL2	
LPAR6	
LPXN	
LRRN3	
LTBP4	
MATK	
MED18	
METT13	
MFAP1	
MMP24-AS1	
MPEG1	
MRPL15	
MS4A1	
MSANTD4	
MT1F	
MT1HL1	
MT1XP1	
MT2P1	
MYB	
MYO18A	
MYO1F__2	
NAPSB	

---

---

NCALD  
NCDN  
NCS1\_\_2  
NDFIP2  
NDRG2  
NETO2  
NHS  
NOG  
NPEPL1  
NSUN6  
ORAI2  
ORMDL2  
OSBPL5  
PCDHGA7  
PCGF7P\_\_1  
PDGFRB  
PDZD4\_\_2  
PGAP1  
PIGX  
PLCB2  
PMEPA1  
POLD3  
PREB  
PRKCB  
PRKCI  
PRPF38AP2\_\_1  
PRSS23  
PTCH1  
PTGDS  
PUS7  
RAB10  
RAB37  
RALA  
RAP1GAP2  
REM2  
RNF5P1  
RNU12  
RP1-39G22.7  
RP1-90L6.2  
RP11-118B18.1  
RP11-159D12.2  
RP11-29G8.3  
RP11-408A13.4  
RP11-469M7.1  
RP11-4F5.2  
RP11-528A10.2  
RP11-553L6.5  
RP11-63E16.1  
RP11-81H14.2  
RP11-964E11.2  
RP4-647J21.1  
RP6-145B8.3  
RPE  
RSAD2  
RSPH3  
S100A4  
S1PR1  
SAMD9  
SAMSN1  
SCARF2  
SERF1A  
SH3BP1  
SIGLEC17P  
SIPA1L1  
SIRPB1  
SKAP1  
SLC14A1  
SLC17A9  
SLC1A4  
SLC25A45  
SLC6A4  
SLCO4C1  
SMDT1\_\_3  
SNX25  
SNX9  
SPHK1  
SPON2  
STT3A  
SULT1A1  
SYNE3  
TAF4B  
TBL2\_\_1  
TENM1  
TMC8  
TMEM140  
TMEM245  
TMEM43  
TMOD2  
TMOD3  
TNFRSF9  
TNFSF14  
TP53BP1  
TPM2  
TRABD2A  
TRAM2  
TRAT1  
TRAV13-1  
TRERF1  
TRIM52-AS1  
TRMT6  
TRNT1

---

---

TTC16  
TTC38  
TXK  
TXNIP\_1  
UNC5CL  
VPS35  
WARS  
WDFY4  
WNT10B  
WSB1  
XIST  
YARS  
ZAP70  
ZBTB6  
ZC3H10  
ZC3H12D  
ZDHC16  
ZFP69B  
ZHX2  
ZNF181  
ZNF189  
ZNF234  
ZNF260  
ZNF786  
ZNF800  
ZW10

## Capítulo II

---

*Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3<sup>+</sup> humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos*

## Justificativa e Objetivos

---

Atualmente, os anticorpos anti-CD3 são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, podendo promover a cura de autoimunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (CHATENOUD, 2003). OKT3, o primeiro anticorpo aprovado para uso clínico pelo FDA, se mostrou eficiente na depleção de linfócitos alorreativos. Entretanto, devido a sua toxicidade e efeitos colaterais promovidos devido a sua origem murina ele foi removido da clínica.

O Grupo de Imunologia Molecular da UnB iniciou o processo de humanização do anticorpo OKT3 em 1997 no intuito de torná-lo menos imunogênico. O grupo investiu no processo de humanização e estabeleceu um procedimento próprio. Em 2001 o grupo passou a interagir com o Instituto de Investigação em Imunologia (iii) com o projeto de produção de anticorpos humanizados para aplicação na clínica. Em 2009, foi aprovado o projeto de pesquisa para “Desenvolvimento de biofármacos e caracterização biológica dos efeitos imunorreguladores de anticorpos anti-CD3” pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX/FAPDF/CNPq), projeto coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Marcelo de Macedo Brigido. O presente projeto de pesquisa é uma das propostas apresentados no projeto maior aprovado pelo PRONEX. O grupo já possui diversos resultados promissores que envolvem esses anticorpos anti-CD3 humanizados.

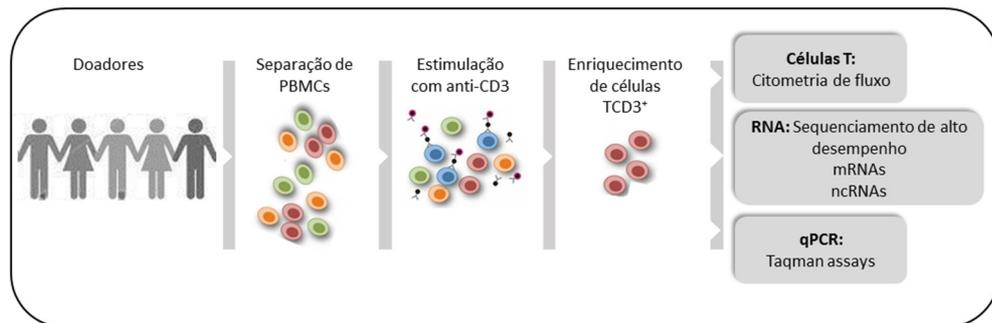
Este trabalho teve com objetivo avaliar o efeito de anticorpos anti-CD3 recombinantes em linfócitos T in vitro, analisando:

1 - A expressão dos fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação dos subtipos de linfócitos T após a ativação com anticorpos anti-CD3.

2 - A expressão de miRNAs envolvidos na imunorregulação.

# Delineamento experimental

---



# Resultados

---

**Manuscrito:** microRNA profiles in human CD3<sup>+</sup> T cell after anti-human CD3 antibodies stimulation

Isabel Garcia Sousa, Manuela Maragno do Almo, Kelly Cristina Rodrigues Simi, Maryani Andressa Gomes Bezerra, Jorge Kalil, Andréa Queiroz Maranhão, Marcelo Macedo Brigido

Submetido a: mAbs journal

## MicroRNA expression profiles in human CD3<sup>+</sup> T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies

*Isabel Garcia Sousa<sup>1</sup>, Manuela Maragno do Almo<sup>1</sup>, Kelly Cristina Rodrigues Simi<sup>2</sup>, Maryani Andressa Gomes Bezerra<sup>3</sup>, Rosângela Vieira Andrade<sup>4</sup>, Andréa Queiroz Maranhão<sup>3,5</sup>, Marcelo Macedo Brigido<sup>3,5\*</sup>*

<sup>1</sup>*Molecular Pathology Graduation Program, Medicine Faculty, University of Brasília, Brasília, Brazil*

<sup>2</sup>*Molecular Biology Graduation Program, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil*

<sup>4</sup>*Catholic University of Brasília*

<sup>5</sup>*Institute for Immunology Investigation, a National Institute of Science and Technology*

\*Correspondence: brigido@unb.br

### Abstract

Anti-CD3 therapy can induce immunosuppression, but its immunoregulatory mechanism is still unclear. In T cells, microRNAs (miRNAs) regulate several pathways, including those associated with immune tolerance. Here, we report changes in miRNA expression in T cells following treatment with anti-human CD3 antibodies. Peripheral blood mononuclear cells were cultured in the presence of the monoclonal antibody OKT3 or a recombinant fragment of humanized anti-CD3. Following these treatments, the expression profiles of 31 miRNA species were assessed in T cells using TaqMan arrays. Eight of the tested miRNAs (miR-155, miR-21, miR-146a, miR-210, miR-17, miR-590-5p, miR-106b and miR-301a) were statistically significantly up- or down-regulated relative to untreated cells. In conclusion, stimulation of T cells with anti-human CD3 antibodies alters miRNA expression patterns, including of miRNA species associated with immune regulatory pathways.

### Keywords

Recombinant Antibody; Anti-CD3; miRNA; Immunoregulation; Immunosuppression

### Abbreviations

FvFc, single chain Fv fragment fused to a human IgG1 Fc

## *1. Introduction*

CD3<sup>+</sup> T cells play a major role in immune responses associated with autoimmune disease and organ transplantation. These cells form heterogeneous populations that can be distinguished based on molecular surface markers, and subsets of these markers can be used to denote various stages of T lymphocyte differentiation [1,2]. Following activation by antigens and co-stimulatory signals, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells orchestrate immune responses by differentiating into various effector T cell subsets, including Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells [3,4].

Clinical data have suggested that anti-CD3 therapy is a promising treatment option for autoimmune disease and organ transplantation. Although the mechanism of action underlying this therapy is not fully understood, the generation of Tregs seems to be associated with immunosuppression and immunological tolerance [5,6,7]. In vivo, T cells are stimulated by T cell receptors (TCRs), an integral component of which is CD3. In the presence of co-stimulatory signals, T cells differentiate into specific phenotypic subtypes. Several of these subtypes are involved in suppressing or terminating natural inflammatory signals. Hence, the clinical administration of anti-CD3 antibodies may interfere with or overcome natural TCR stimulation and therefore lead to the accumulation of suppressive T cell populations, including CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Tregs [8,9,10].

The anti-CD3 monoclonal antibody OKT3 (muromonab-CD3, Ortho Biotech) was the first mAb approved for clinical use in transplantation rejection therapy [11]. However, OKT3 is a murine monoclonal antibody that displays high toxicity in humans due to its heterologous nature and mitogenic activity. The effectiveness of long-term OKT3 therapy is hampered both by cytokine release syndrome and the presence of neutralizing antibodies (HAMA) [12]. Due to these clinical limitations, OKT3 was removed from the market in 2010 [13,14]. Currently, a new generation of anti-CD3 therapy is being developed [15]. We have previously described a humanized anti-CD3 antibody fragment that displays less mitogenic activity than OKT3 [16] and may therefore be useful in modulating the immune system.

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules that control many important cellular processes, including development, differentiation, survival, cell fate determination, and proliferation. Additionally, miRNAs have a pivotal role in immune cell functioning by controlling cytokine, chemokine, growth factor, cell adhesion molecule, and co-stimulatory molecule expression; antibody production; inflammatory mediator release and apoptosis induction [17-23].

Experimental ablation of miRNAs has demonstrated the importance of these molecules in T cell development, especially with regard to Tregs [24]. Therefore, tracking changes in miRNA profiles following stimulation with anti-CD3 antibodies may offer insights into stimulation of T cell transformation, reveal potential methods of programming differentiation, and produce valuable biomarker information. In this work, we measured changes in miRNA expression in anti-CD3 antibody-stimulated human T cells in vitro in the context of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) milieu. By comparing two different antibodies, a mAb and a recombinant antibody fragment, we unveiled changes in miRNA expression profiles that may be associated with T cell fate.

## *2. Materials and methods*

### *2.1. Donors*

Five healthy individuals were enrolled in this study. Peripheral blood was collected from these donors after they provided informed consent. The study protocol was approved by the local ethics committee.

### *2.2. Antibodies*

The anti-CD3 $\epsilon$  antibody Muromonab-CD3 (OKT3) was purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA), and humanized FvFcR was produced in transfected CHO-K1 cells as previously described (version R) [16].

### *2.3. Stimulation of PBMCs and T cell enrichment*

Fresh PBMCs were isolated using Ficoll-Paque density gradient centrifugation (GE Healthcare, Sweden). Whole PBMCs were cultured in RPMI media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 4 mM L-glutamine and 10% FBS in the

presence or absence of soluble anti-CD3 antibodies. A total of 250 ng of antibody was applied to PBMCs at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells per mL. After 72 hours, CD3<sup>+</sup> T cells were isolated by negative selection using CD3 beads according to the manufacturer's instructions (Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit, Invitrogen).

#### *2.4. Flow cytometry*

T cell subpopulations and the efficiency of T cell isolation from PBMCs were quantified by three-color staining using the following sets of mAbs: (1) anti-CD18 FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), anti-CD3 APC (eBioscience) and anti-CD4 PE (eBioscience) or (2) anti-CD18 FITC (BD), anti-CD3 APC (eBioscience) and anti-CD8 PE (eBioscience). Percentages of T cells (gated on CD18<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>) expressing CD4 or CD8 were measured by flow cytometry. All FACS data were acquired on a FACS Verse (BD) using BD FACSuite™ software (BD). Data were analyzed using FlowJo software version 10 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

#### *2.5. RNA extraction*

Total RNA, including small RNA species such as miRNAs, was extracted from T cells isolated after PBMC stimulation using a miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The extracted RNA was treated with TURBO™ DNase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) to eliminate genomic DNA. RNA integrity and purity were evaluated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Genomics, Santa Clara, CA, USA).

#### *2.6. qPCR assays*

qPCR assays were performed using an ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Austin, Texas, EUA). The  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method was used to calculate mRNA or miRNA transcript levels (fold change). RT2 Profiler PCR Array Data Analysis software (SABiosciences, Frederick, MD, USA) was used for analysis. The experiments were performed in triplicate and repeated three times. For each sample, normalization was performed by subtraction of the median C<sub>q</sub> values of treated and untreated samples. To identify potential differentially expressed genes, miRNAs were ranked using p-values. The p-values were calculated based on Student's t-test results of the replicate  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values for each gene in the control

samples and treatment samples. GraphPad Prism software version 6 and R package were used to make figures.

### *2.7. miRNA profiling*

miRNA profiling was performed using TaqMan Arrays MicroRNA customized plates according to the manufacturer's instructions; 32 miRNAs (Applied Biosystems) were used without pre-amplification. Approximately 600 ng of total RNA extracted from T cells was utilized for cDNA synthesis, which was accomplished using a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The miRNAs were then evaluated via qPCR using TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. RNU48 small non-coding RNA (snRNA) was used as an internal control for data normalization.

### *2.8. Individual gene expression assays*

Approximately 240 ng total RNA isolated from T cells following PBMC stimulation was utilized for cDNA synthesis using an RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen). Briefly, individual gene expression was measured using RT<sup>2</sup> qPCR SYBRGreen/ROX MasterMix (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The following probes were used: FOXP3, GITR, TBX21, STAT4, ROR $\gamma$ t, STAT3, and GATA3. The housekeeping gene B2M was chosen as an endogenous control.

## *3. Results*

### *3.1. Specific miRNAs were differentially expressed in CD3<sup>+</sup> T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies*

To investigate how CD3 stimulation affected miRNA expression profiles, human PBMC were stimulated with anti-CD3 antibodies for 72 h. Then CD3<sup>+</sup> cells were isolated and miRNA expression analyzed by qPCR. All 31 common miRNAs that were tested exhibited statistically significant changes in the samples from at least one donor when comparing cells stimulated with OKT3 or FvFcR to unstimulated cells (Fig. 1).

The miRNA expression profiles displayed strong inter-donor variability. As they were the least variable, the CD3<sup>+</sup> T cell expression profiles of eight distinct miRNAs, miR-

155, miR-21, miR-146a, miR-210, miR-17, miR-590-5p, miR-106b and miR-301a, were further investigated (Fig. 2 and Supplementary Table 1).

miR-155 was consistently overexpressed following both antibody treatments: OKT3 seemed to induce stronger expression than FvFcR (Fig. 2A). miR-21 exhibited higher expression in T cells from most donors after stimulation with OKT3 and FvFcR antibodies compared to non-stimulated T cells (Fig. 2B). miR-31 was significantly down-regulated in a few donors ( $p < 0.05$ ; Supplementary Fig. 1). Anti-CD3 antibodies increased miR-146a expression in most PBMC donors, but FvFcR showed more consistent stimulation (Fig. 2C). The miR-210 expression profile was unique in exhibiting minimal variability between donors following FvFcR stimulation. FvFcR stimulated miR-210 less robustly than OKT3 (Fig. 2D). miR-17 was up-regulated in CD3<sup>+</sup> T cells stimulated with either OKT3 or FvFcR (Fig. 2E). miR-590-5p expression increased in T cells following stimulation with OKT3 and FvFcR (Fig. 2F). All treatments induced up-regulation of miR-106b (Fig. 2G). OKT3 and FvFcR both up-regulated miR-301a expression in CD3<sup>+</sup> T cells; OKT3 stimulation led to particularly strong expression (Fig. 2H). As indicated, there was a greater tendency toward up-regulated miRNA expression in stimulated versus unstimulated T cell subsets. Many of the evaluated miRNAs have been associated with the generation of Th17 and Treg populations. Collectively, these data show that a limited number of miRNAs became differentially expressed in T cells following treatment with anti-human CD3 antibodies.

### *3.2. Anti-human CD3 antibodies alter mRNA expression profiles in CD4<sup>+</sup> T cells*

Many of the miRNAs found to be differentially expressed have been associated with the generation of CD4<sup>+</sup> T cells. To confirm the effects of anti-CD3 stimulation on T helper cell miRNA profiles, the expression patterns of genes considered typical markers of T helper cell differentiation were analyzed (Fig. 3). The expression levels of TBX21, STAT4, ROR $\gamma$ t and STAT3 were affected by stimulation with the anti-human CD3 antibodies FvFcR and OKT3 (Fig. 3A and 3C).

TBX21 encodes T-bet, a transcription factor known to be involved in T helper cell commitment towards Th1 differentiation and TCD8 differentiation. TBX21 mRNA expression was strongly induced after OKT3 stimulation (approximately an 8-fold

enhancement); recombinant FvFcR induced it to a lesser extent (Fig. 3A). In addition, the expression of STAT4, a gene that supports Th1 commitment, was induced; this induction suggests a pro-inflammatory response to anti-CD3 antibodies. Finally, antibody stimulation did not affect GATA3 expression, which corroborates that T cells undergo Th1 polarization upon anti-CD3 treatment (Fig. 3B).

T helper cell differentiation may also induce Th17 and Treg phenotypes. Figure 2C shows the marked increase in ROR $\gamma$ t (RORC) and STAT3 expression that occurred following OKT3 stimulation. FvFcR also stimulated ROR $\gamma$ t expression but to a lesser extent. STAT3, a gene involved in Th17 cell signaling, was equivalently induced in all treatments (Fig. 3C). Additionally, the regulatory associated markers FOXP3 and GITR were induced following all treatments (Fig. 3D); FvFcR was more effective at inducing FOXP3, while OKT3 more robustly induced GITR. These data suggest that stimulation with FvFcR influences Treg and Th17 cell differentiation.

#### *4. Discussion*

In the present study, we characterized miRNA expression profiles in T cells following stimulation with anti-CD3 antibodies. Both a mouse monoclonal antibody and an Fc-bearing humanized antibody fragment were tested, and both could modulate miRNA expression in CD3<sup>+</sup> T cells. Many of the miRNAs that changed in our study are enriched in conventional and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell populations, as well as in CD8<sup>+</sup> T cells, and many are reported to play roles in regulating of immune response.

miR-155 is a well-studied miRNA that operates as a co-regulator of gene expression in multiple cell types to modulate the immune response [25]. miR-155 regulates cell growth and affects T cell polarization [26] by inducing a Th17/Treg bias in T helper cells [27]. Although activation by CD3/CD28 co-stimulation up-regulates miR-155 [28], it has also been shown that FOXP3 controls miR-155 expression to maintain Treg proliferative activity [29]. Indeed, in vitro and in vivo experiments have shown that miR-155 deficiency reduces Treg populations in the thymus and periphery; however, Tregs from miR-155-deficient animals do not exhibit defects in suppressive function [27,30]. Our data revealed a strong induction of miR-155 after antibody

treatment, further supporting that this treatment led to the establishment of regulatory cells, a miR-155-sensitive population.

Despite the role of miR-155 in Treg survival, this molecule is still classified as proinflammatory, as it precisely regulates the levels of its targets to promote the immune response. Conversely, miR-146a and miR-21 are negative feedback regulators that mute the immune response [31]. It has been demonstrated that miR-21 acts as a positive indirect regulator of FOXP3 expression; in contrast, miR-31 negatively regulates FOXP3 expression by binding directly to its target site in the 3' UTR of FOXP3 mRNA. Comparing miRNA expression profiles between human naïve CD4<sup>+</sup> T cells with Tregs, miR-31 was found to be down-regulated in Treg cells, while miR-21 were found to be significantly up-regulated in this population [31]. miR-21 expression was induced after both antibody treatments, while miR-31 was consistently repressed by OKT3 treatment, and FvFcR treatment led to a variable response.

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells are reported to express low levels of miR-146a while these levels are increased in Tregs [32]. Rudensky and collaborators [33] reported that miR-146a is highly expressed in Treg cells and is critical for their function. The ablation of miR-146a impairs Treg function [27]. Moreover, miR-146a was shown to inhibit Th1 differentiation by interfering with STAT4 signaling [33,34]. Recently, the high level of miR-146a in naïve T cells was shown to enhance the suppressive effect triggered by Tregs [35]. In our data, both evaluated anti-CD3 antibodies induced miR-146a expression, but FvFcR stimulation seemed to produce a more homogenous response among donors. As such, FvFcR treatment may offer an important pathway for obtaining antibody-induced immune suppression.

miR-210 appears to bind to two targeting sites in the FOXP3 mRNA 3'UTR to regulate human Treg differentiation [36]. In the present study, miR-210 expression was less stimulated by FvFcR than OKT3; as such, the recombinant antibody had less of an effect on this negative regulator of FOXP3 expression relative to the mAb.

miR-301a inhibition in CD4<sup>+</sup> T cells reduced IL-17 secretion and the expression of Th17 marker genes, such as ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, and AhR; however, this inhibition did not

affect TBX21 or FOXP3 expression. miR-301a expression was particularly robust in Th17 cells both in vivo and in vitro. This strong expression suggests that miR-301a modulates Th17 development [37]. Furthermore, it has been reported that miR-301a inhibits PIAS3, a molecule known to interfere with the STAT3 signaling pathway [27,37]. Treating PBMCs with anti-CD3 antibodies led to a consistent increase in miR-301a levels among CD3<sup>+</sup> T cells. This increase supports that a bias existed for Th17 polarization among naïve T helper cells.

Three of the up-regulated miRNA species (miR-106, miR-590-5p and miR-17) in the current study are also reported to be overexpressed in CD4<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis (MS) patients [38-41]. Moreover, miR-106b and miR-590-5p exhibit higher expression in Tregs from MS patients compared to healthy controls [38]. miR-106b over-expression can silence two important effectors of the TGF- $\beta$  signaling pathway: the cell cycle inhibitor CDKN1A and the pro-apoptotic gene BCL2L11 [39], and miR-590-5p and miR-17 have been reported to target TGFBR2, which also affects TGF- $\beta$  signaling [38,40]. Moreover, miR-17 deficiency reduces T-bet and IFN- $\gamma$  expression and promotes differentiation of Foxp3<sup>+</sup> Tregs [40]. Therefore, this miRNA possesses a unique mechanism that reciprocally regulates Th1 and Treg generation [27,38]. De Santis and collaborators (2010) suggested that disrupting the TGF- $\beta$  signaling pathway, which is pivotal for Treg differentiation, would hamper immune suppressive activity, yielding the autoimmunity observed in MS. These data do not support the hypothesis that anti-CD3 stimulation would lead to Th17/Treg axis polarization, a process that relies on TGF- $\beta$  signaling. However, we measured an entire CD3<sup>+</sup> population, and it is possible that a fraction of this population expressed high levels of TGF- $\beta$ -disrupting miRNAs and therefore differentiated into other types of effector cells (e.g., CD8<sup>+</sup> or Th1 cells). Therefore, stimulation with anti-CD3 antibodies would affect a broad spectrum of differentiation pathways, including those responsible for producing effector and regulatory cells, and the balance between them would define the effective response. A more precise analysis of T cell subpopulations would offer a better definition of this balance.

In the current study, the miRNA expression changes produced following the stimulation of CD3<sup>+</sup> T cells with anti-CD3 antibodies revealed that Th17/Treg polarization was associated with the induction of miR-146a, miR-21, and miR-155 expression; that together with miR-301 up-regulation, this process would result in a Treg bias. Conversely, the miR-17, miR-106, and miR-590-5p expression data

suggest the disruption of the TGF- $\beta$  signaling. Therefore, it is possible that two different populations can be induced. To test this hypothesis, we measured the expression profiles of seven marker genes corresponding to the following CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subpopulations: Th1, Th2, Th17 and Treg. Th2 induction was not well represented because GATA3 was not reproducibly modulated by either anti-CD3 antibody among donors. TBX21 was primarily induced by OKT3 treatment, suggesting a Th1 response; however, OKT3 treatment has not been reported to result in the induction of Th1 cells in other studies [6]. However, the induction of ROR $\gamma$ t, STAT3, FOXP3 and GITR suggest a bias toward the Th17/Treg axis. The subtle increase in FOXP3 expression suggests the development of either CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cell populations, both of which are known suppressors of the immune response [42]. GITR expression is associated with the development of Tregs, even though GITR is also observed in CD8<sup>+</sup> effector cells [43].

Overall, in the present study, we have delineated the effects of two different anti-CD3 antibodies on human T cell miRNA expression. Both antibodies induced similar responses and exhibited individual fluctuations in induction and repression levels. As has been previously suggested for OKT3 [5], FvFcR could also induce Treg differentiation, as it was shown to increase the expression of miRNAs known to be positive regulators of FOXP3 expression. Further investigation is warranted to dissect the precise roles of individual differentially expressed microRNAs in determining T cell fate. Overall, devoid of any co-stimulus, anti-CD3 stimulation *in vitro* promotes a clear change in the expression of a variety of miRNAs, including those operating in immune regulatory pathways. Moreover, the FvFcR molecule appears to be a promising immunomodulatory agent for the treatment of autoimmune diseases and organ transplantation.

### **Acknowledgements**

We thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for grant support and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de ensino superior (CAPES) for IGS, MMA, KCRS and MAGB financial support.

## References

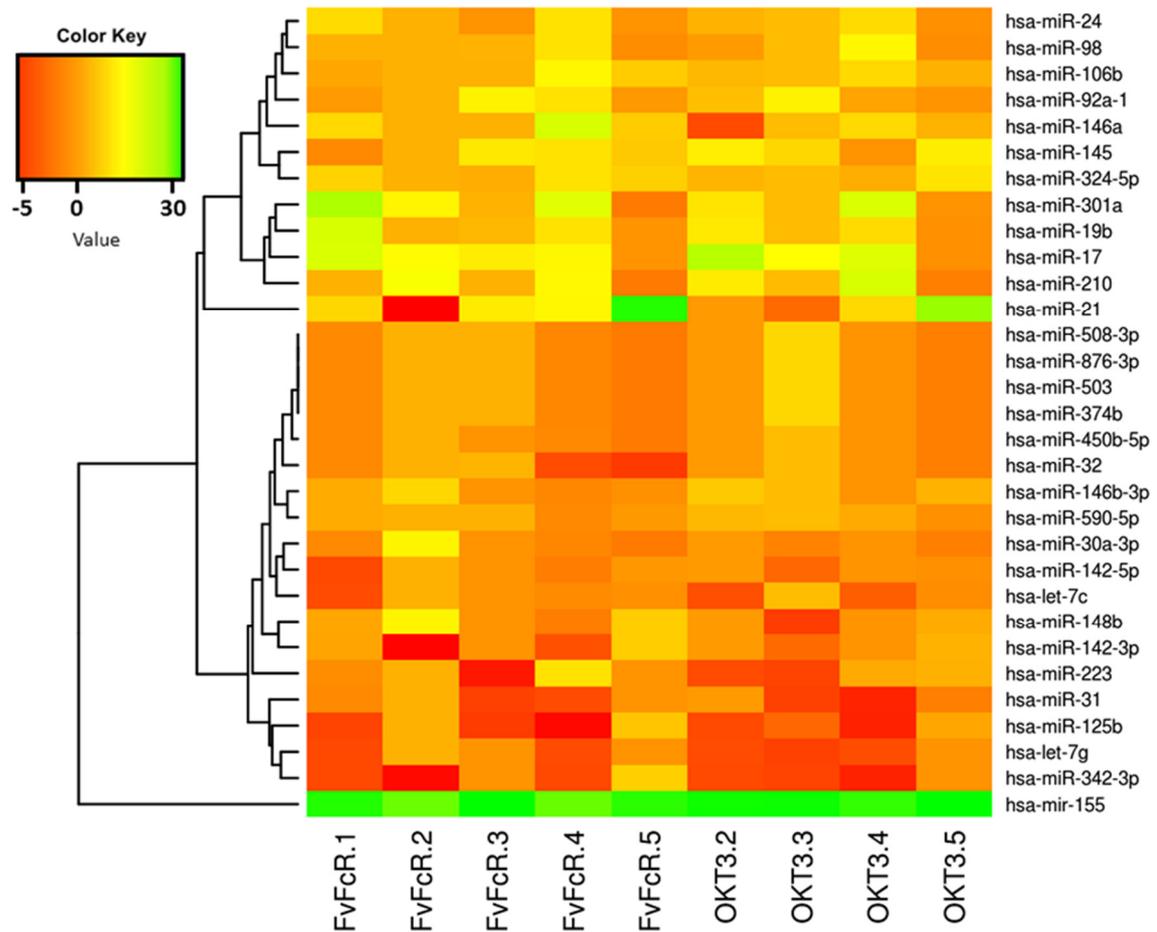
1. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101(5):455–8.
2. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001;2(2):102–7.
3. Pagani M, Rossetti G, Panzeri I, de Candia P, Bonnal RJP, Rossi RL, et al. Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation. *Immunol Rev* 2013;253(1):82–96.
4. Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(9):666–78.
5. Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol* 2014;5:46.
6. Smith JA, Bluestone JA. T cell inactivation and cytokine deviation promoted by anti-CD3 mAbs. *Curr Opin Immunol* 1997;9(5):648-54.
7. Cai J, Terasaki PI. Humoral Theory of Transplantation: Mechanism, Prevention and Treatment. *Human Immunology* 2005;66:334–42.
8. Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):123-32.
9. Yuan X, Malek TR. Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Human Immunology* 2012;73:773–82.
10. Jiang S, Lechler HI, He XS, Huang JF. Regulatory T Cells and Transplantation Tolerance. *Human Immunology* 2006;67:765–76.
11. Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, Laquaglia MP, et al. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplant* 1981;32(6):535–9.
12. Kimball JA, Norman DJ, Shield CF, Schroeder TJ, Lisi P, Garovoy M, et al. The OKT3 antibody response study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl Immunol* 1995;3:212–21.
13. Klipa D, Mahmud N, Ahsan N. Antibody immunosuppressive therapy in solid organ transplant: part II. *MAbs* 2010;2(6):607–12.
14. Janssen-Cilag. Orthoclone®OKT3 muromonab-CD3 – Worldwide discontinuation [press release], January 4, 2010.

15. You S, Chatenoud L. New generation CD3 monoclonal antibodies: are we ready to have them back in clinical transplantation? *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(6):720-4.
16. Silva HM, Vieira PMMM, Costa PLN, Pimentel BMS, Moro AM, Kalil J, et al. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Lett* 2009;125(2):129–36.
17. Ha T. The role of MicroRNAs in regulatory T Cells and in the immune response. *Immune Netw* 2011;11(1):11–41.
18. Pauley KM, Chan EKL. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acadsci* 2008;1143(1):226–39.
19. Baltimore D, Boldin MP, O’Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008;9(8):839–45.
20. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* 2008;8(2):120–30.
21. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136(1):26–36.
22. Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008;29(7):343–51.
23. Jeker LT, Marone R. Targeting microRNAs for immunomodulation. *Curr Opin Pharmacol* 2015;23:25–31.
24. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008;205(9):1983-91.
25. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007;316(5824):608-11.
26. Spiegel JC, Lorenzen JM, Thum T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. *Expert Rev Mol Med* 2011;13:1–13.
27. Sethi A, Kulkarni N, Sonar S, Lal G. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. *Front Gene* 2013;4:1–13.
28. Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, Lévy Y, Swaminathan S. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology* 2014;142:32–8.

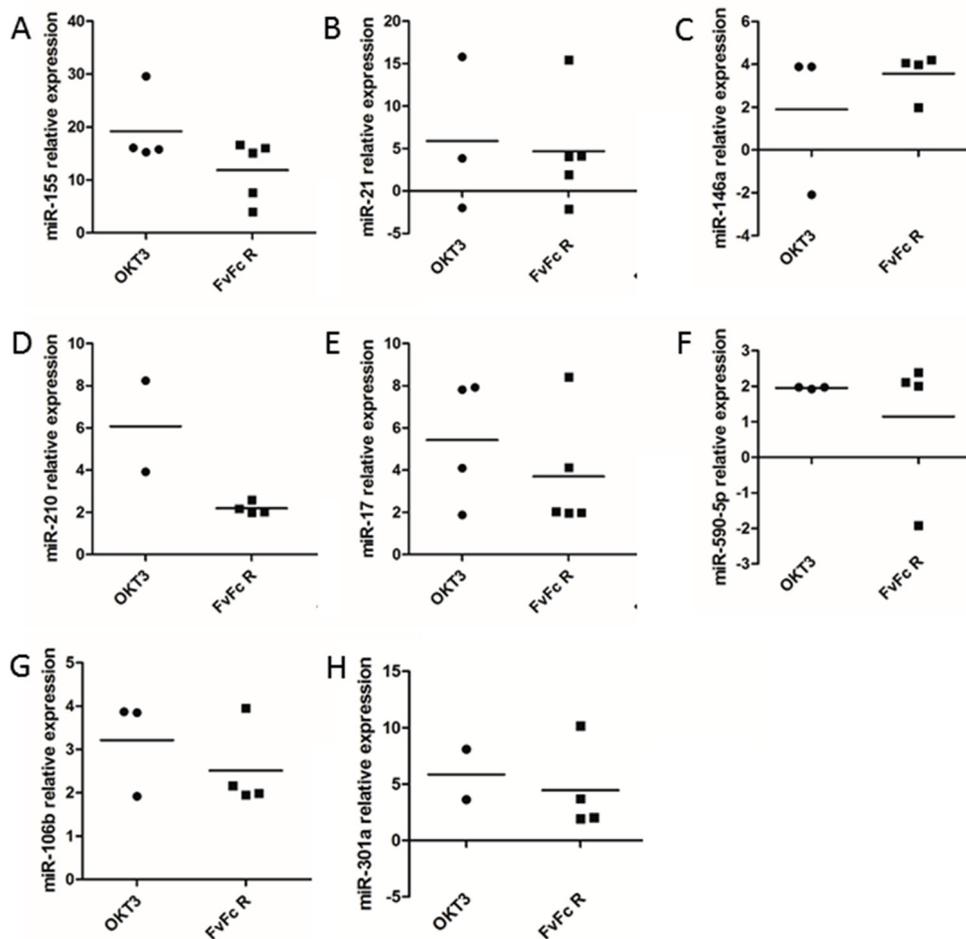
29. Lu L, Thai T, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Article competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2008;30:80–91.
30. Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 2009;182(5):2578–82.
31. Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, et al. Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur J Immunol* 2009;39(6):1608–18.
32. Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, et al. A role for dicer in immune regulation. *J Exp Med* 2006;203(11):2519–27.
33. Lu L, Boldin MP, Chaudhry A, Lin L, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010;142(6):914–29.
34. Möhnle P, Schütz SV, van der Heide V, Hübner M, Luchting B, Sedlbauer J, et al. MicroRNA-146a controls Th1-cell differentiation of human CD4<sup>+</sup> lymphocytes by targeting PRKC $\epsilon$ . *Eur J Immunol* 2015;45(1):260–72.
35. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008;205(9):1983–91.
36. Fayyad-Kazan H, Rouas R, Fayyad-Kazan M, Badran R, El Zein N, Lewalle P, et al. MicroRNA profile of circulating CD4-positive regulatory T cells in human adults and impact of differentially expressed microRNAs on expression of two genes essential to their function. *J Biol Chem* 2012;287(13):9910–22.
37. Mycko MP, Cichalewska M, Machlanska A, Cwiklinska H, Mariasiewicz M, Selmaj KW. MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E1248–57.
38. De Santis G, Ferracin M, Biondani A, Caniatti L, Rosaria Tola M, Castellazzi M, et al. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;226(1–2):165–71.
39. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Cancer Res* 2008;68(20):8191–4.

40. Jiang S, Li C, Olive V, Lykken E, Feng F, Sevilla J, et al. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood* 2011;118(20):5487-97.
41. Lindberg J, Lundeberg J. The plasticity of the mammalian transcriptome. *Genomics* 2010;95(1):1-6.
42. Robb RJ, Lineburg KE, Kuns RD, Wilson YA, Raffelt NC, Olver SD, et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8<sup>(+)</sup>FoxP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2012;119(24):5898-908.
43. Pascutti MF, Geerman S, Slot E, van Gisbergen KPJM, Boon L, Arens R, et al. Enhanced CD8 T cell responses through GITR-mediated costimulation resolve chronic viral infection. *PLOS Pathog* 2015;11(3):e1004675.

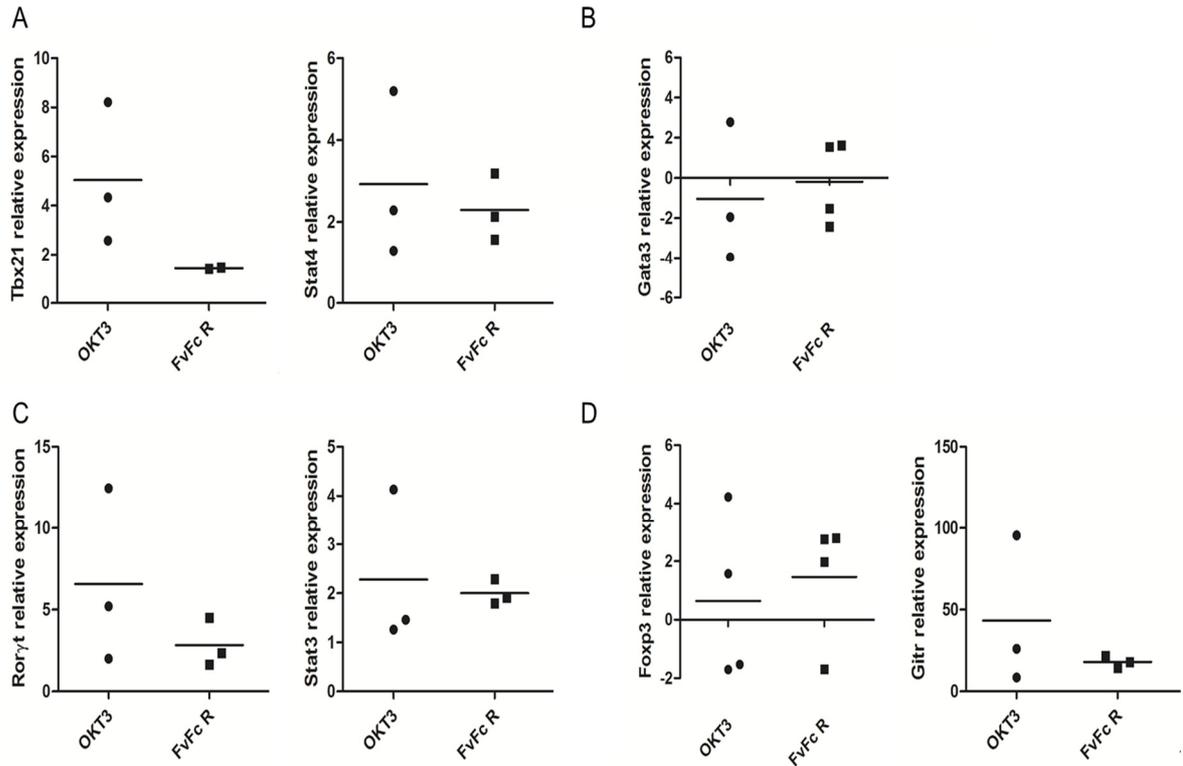
## Figure legends



**Fig. 1.** miRNA expression profile in T cells. Cluster analysis of 31 differentially expressed miRNAs in CD3<sup>+</sup> T cells collected from healthy donors (n=4-5). miRNAs that were up- or down-regulated in CD3<sup>+</sup> T cells after CD3 stimulation. miRNA species are represented by rows, while samples are represented in columns. For each miRNA, green represents high expression, and red represents low expression relative to the average expression across all samples. This experiment was performed 72 h post stimulation, and the results are expressed as fold changes relative to levels in untreated T cells.

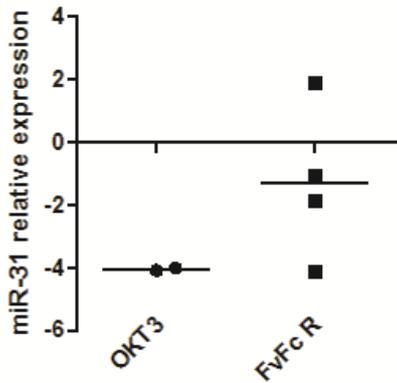


**Fig. 2.** Quantitative analysis of changes in miRNA expression in CD3<sup>+</sup> T cells following stimulation with anti-human CD3 antibody. qPCR was performed in triplicate 72 h post stimulation; the results are expressed as fold changes relative to levels in T cells ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ). The presented miRNAs exhibited statistically significant changes in expression levels relative to untreated cells in 80% of the donors, for FvFcR treatment. RNU48 snRNA was used as an internal control for data normalization. (A) miR-155, (B) miR-21, (C) miR-146a, (D) miR-210, (E) miR-17, (F) miR-590-5p, (G) miR-106b, (H) miR-301a.

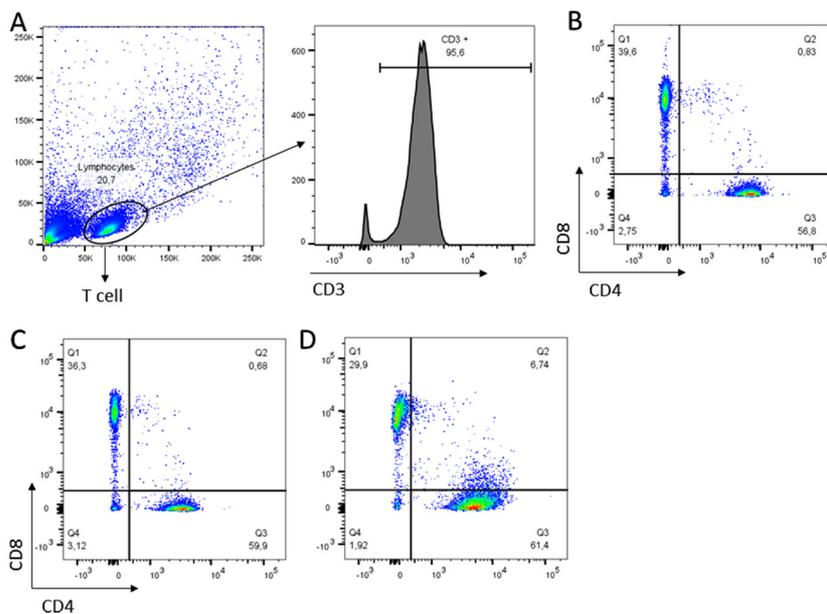


**Fig. 3.** Effects of anti-CD3 stimulation on the expression of genes involved in CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. CD3<sup>+</sup> T cells were isolated 72 h post stimulation, and mRNA was analyzed by qPCR to determine the expression levels of (A) *TBX21* and *STAT4*, (B) *GATA3*, (C) *ROR $\gamma$ t* and *STAT3*, and (D) *FOXP3* and *GITR*. The data were normalized to the expression levels of the same genes in CD3<sup>+</sup> T cells from untreated cultures. Representative results from three independent experiments are shown (n = 5; p < 0.05). B2M was used as an internal control for data normalization.

## Supplementary Information



**Fig. 1.** Quantitative analysis of changes in miRNA expression in CD3<sup>+</sup> T cells following stimulation with anti-human CD3 antibody. qPCR was performed in triplicate 72 h post stimulation; the results are expressed as fold changes relative to levels in T cells (n = 4-5; p < 0,05). RNU48 snRNA was used as an internal control for data normalization.



**Fig. 2.** Differentiation of CD3<sup>+</sup> T cell subsets following stimulation with anti-human CD3 antibodies. The percentages of peripheral T cells, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in PBMCs from healthy volunteers were analyzed using flow cytometry after different stimulation conditions. (A) Unstimulated cells. The gated population of unstimulated lymphocytes is marked in the scattering plot. (B) Percentage of CD3<sup>+</sup> cells gated in A. CD4 and CD8 labeling of cells stimulated with (C) OKT3 or (D) FvFcR.

**Table 1.** MicroRNA ranking in CD3<sup>+</sup> T cells according to p-value.

OKT3			FvFcR		
miRNA	P-value	Fold change	miRNA	P-value	Fold change
<b>Sample 1</b>					
			mir-155	<b>0.000000</b>	16.66
			miR-21	<b>0.000000</b>	4.12
			miR-17	<b>0.000000</b>	8.42
			miR-146a	<b>0.000001</b>	4.20
			miR-106b	<b>0.000002</b>	2.17
			miR-301a	<b>0.000013</b>	10.16
			miR-210	<b>0.000363</b>	2.60
<b>Sample 2</b>					
miR-17	<b>0.000021</b>	7.92	miR-155	<b>0.000023</b>	4.03
miR-155	<b>0.000024</b>	15.78	miR-301a	<b>0.000230</b>	1.92
miR-210	<b>0.000033</b>	3.92	miR-17	<b>0.000265</b>	2.04
miR-301a	<b>0.000036</b>	3.63	miR-21	<b>0.001588</b>	-2.12
miR-106b	<b>0.000191</b>	1.92	miR-210	<b>0.002740</b>	2.18
miR-146a	<b>0.000226</b>	-2.09			
<b>Sample 3</b>					
miR-155	<b>0.000001</b>	16.07	miR-155	<b>0.000000</b>	16.02
miR-17	<b>0.000008</b>	4.10	miR-106b	<b>0.000000</b>	1.99
miR-21	<b>0.000019</b>	-1.99	miR-17	<b>0.000001</b>	4.13
			miR-21	<b>0.000001</b>	4.05
			miR-146a	<b>0.000011</b>	1.99
			miR-301a	<b>0.000019</b>	2.04
			miR-210	<b>0.000110</b>	2.01
<b>Sample 4</b>					
miR-155	<b>0.000000</b>	15.24	miR-155	<b>0.000000</b>	7.58
miR-146a	<b>0.000001</b>	3.89	miR-301a	<b>0.000003</b>	3.71
miR-17	<b>0.000002</b>	7.81	miR-146a	<b>0.000063</b>	4.07
miR-301a	<b>0.000003</b>	8.09	miR-106b	<b>0.000072</b>	1.95
miR-21	<b>0.000004</b>	3.85	miR-21	<b>0.000150</b>	1.91
miR-106b	<b>0.000009</b>	3.87	miR-17	<b>0.000307</b>	1.96
miR-210	<b>0.000083</b>	8.24	miR-210	<b>0.000329</b>	1.98
<b>Sample 5</b>					
miR-21	<b>0.000018</b>	15.81	miR-21	<b>0.000003</b>	15.45
miR-155	<b>0.000023</b>	29.58	miR-155	<b>0.000006</b>	15.13
miR-106b	<b>0.000033</b>	3.85	miR-17	<b>0.000010</b>	1.98
miR-146a	<b>0.000049</b>	3.89	miR-106b	<b>0.000014</b>	3.95
miR-17	<b>0.000248</b>	1.88	miR-146a	<b>0.000052</b>	3.99
miR-301a	<b>0.000841</b>	2.04			

P-values are shown for the miRNAs that were statistically significantly up- or down-regulated between treated and untreated cells. (n = 4-5; p < 0,05).

**Table 2.** Differentiation of CD3<sup>+</sup> T cell subsets following stimulation with anti-human CD3 antibodies.

<b>Anti-human CD3</b>	<b>% T CD4 cells</b>	<b>% T CD8 cells</b>
<b>NT</b>	56.8	39.6
<b>OKT3</b>	59.9	36.3
<b>FvFcR</b>	61.4	29.9

NT (non-treated). Human PBMCs were cultivated in the presence of recombinant antibodies, incubated with PE-conjugated anti-human CD4 or APC-conjugated anti-human CD8, and analyzed by flow cytometry. The percentages of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets are shown.

**Table 3.** Donors information

<b>Donors</b>	<b>Age</b>	<b>Gender</b>
K.C.R.S.	30	F
M.A.G.B.	28	F
T.T.	30	M
N.F.L.	28	M
G.D.	22	M

Healthy PBMC donors; Age in years; F, female; M, male.

## Conclusão e Perspectivas

---

Temos caracterizado fragmentos de anticorpos humanizados que são capazes de se ligar à molécula de CD3 na superfície de células T humanas, e alterar o perfil de expressão de miRNAs nestas células. Muitos desses pequenos RNAs têm sido encontrados enriquecidos em populações de células Th17 e Treg, também foram expressos em resposta à ativação de células T CD8<sup>+</sup>.

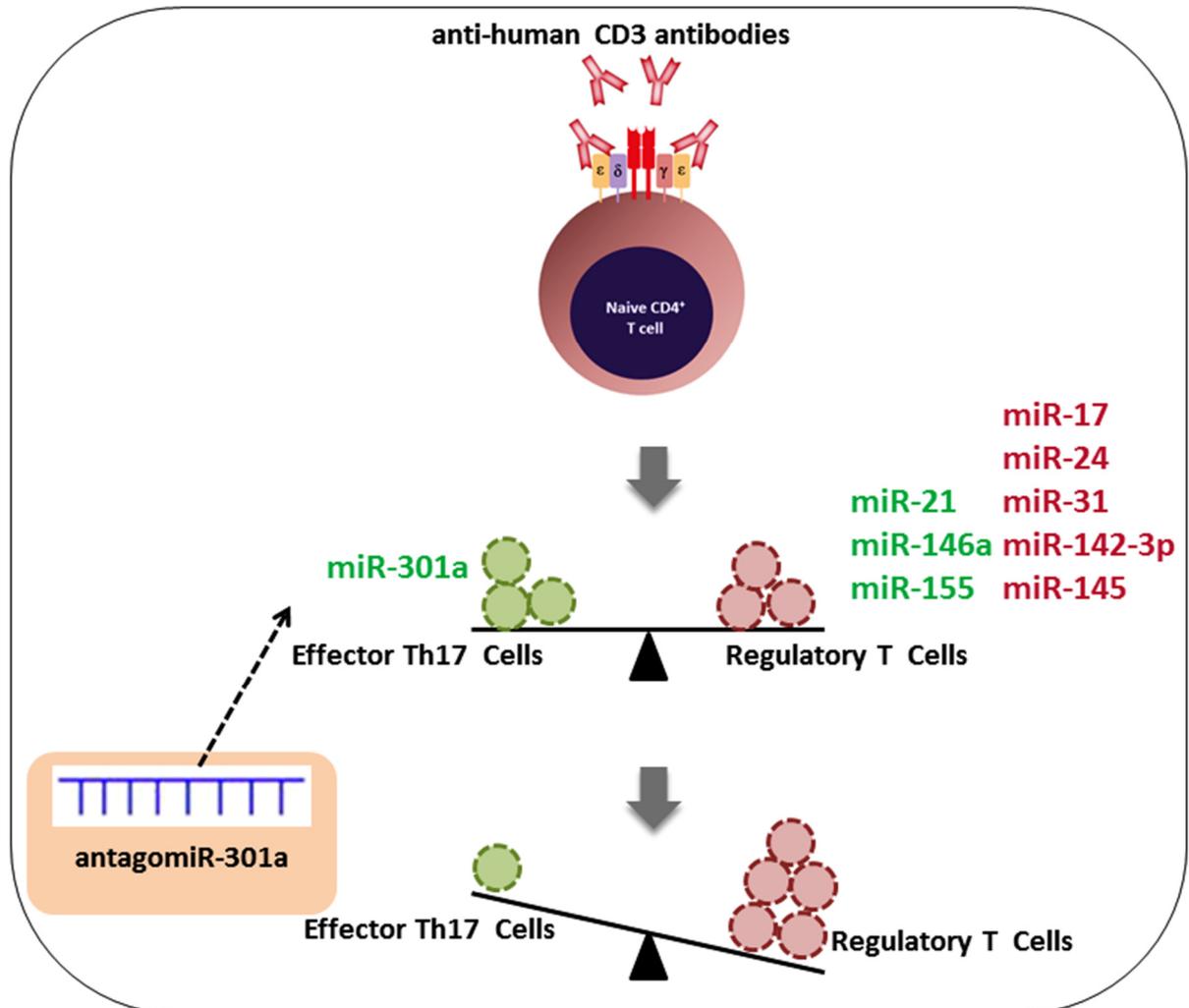
FvFcR parece ter sido capaz de induzir a diferenciação de Treg, uma vez que sua estimulação aumentou a expressão de miRNAs conhecidos como reguladores positivos da expressão de FOXP3. Além disso, FvFcR induziu uma menor expressão de miRNAs descritos como reguladores negativos de FOXP3. Outras investigações são necessárias para dissecar os papéis precisos dos microRNAs diferencialmente expressos na regulação das funções das células T.

Em geral, desprovido de qualquer co-estímulo, a estimulação por anti-CD3 *in vitro* promoveu uma alteração clara na expressão de uma variedade de miRNAs, incluindo os que operam em vias de regulação do sistema imunológico. Finalmente, a molécula FvFcR parece ser promissora para utilização como agente imunomodulador para o tratamento de doenças autoimunes e transplantes de órgãos.

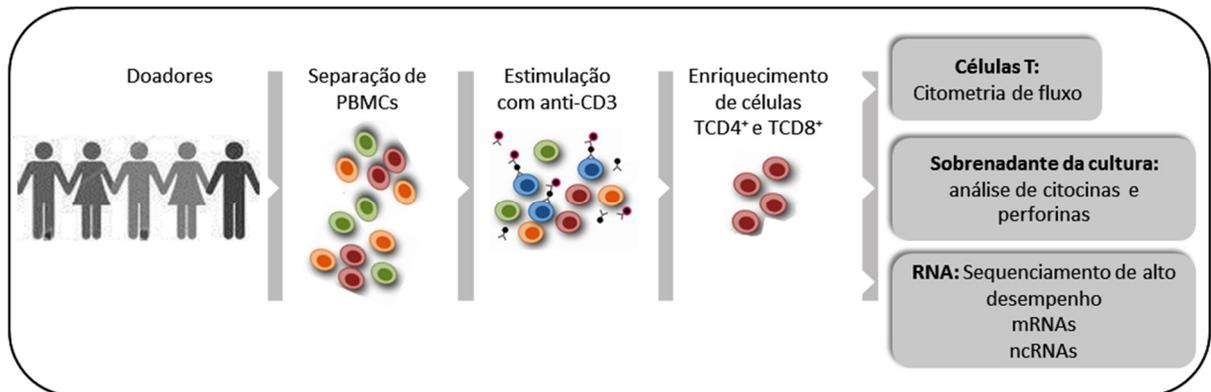
Agora em um novo trabalho pretendemos responder algumas questões como:

1. Qual a subpopulação de células TCD4<sup>+</sup> é predominantemente diferenciada após a estimulação com FvFcR?
2. Em qual subpopulação de células TCD4<sup>+</sup> cada um desses miRNAs estão diferencialmente expressos?
3. Citocinas, perforinas e granzimas estão sendo secretadas pelos subtipos de linfócitos T após estimulação?

Nós propomos aqui um modelo para a regulação negativa do miR-301a após estimulação com anti-CD3 *in vitro*, que é mostrado abaixo.



**Modelo esquemático da diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> controlada por miRNAs após os efeitos imunomoduladores de anticorpos anti-CD3 humano.** Anticorpos anti-CD3 humanos em cultura com células T foram capazes de induzir a diferenciação de subconjuntos de células TCD4<sup>+</sup>. miRNAs mostrados em cores verdes são relatados por regular positivamente enquanto aqueles na cor magenta regulam negativamente a diferenciação de sub-populações das células efetoras Th17 e T reguladoras. Como miR-301a regula positivamente as células efetoras Th17, um antagomiR-301a diminuiria a diferenciação de células Th17 após a estimulação com anti-CD3.



**Plano de trabalho para experimentos futuros.** PBMCs de cinco doadores serão cultivados juntamente com anticorpos anti-CD3. Após o cultivo as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> serão separadas negativamente com *beads* magnéticas, o RNA será extraído para realizar-se-á o transcriptoma através de sequenciamento de alto desempenho, no sobrenadante de cultura investigaremos a presença de algumas citocinas e perforinas, e ainda com as células intactas realizaremos uma imunofenotipagem.

## Referências

---

- ABTO, Associação Brasileira De Transplantes De Órgãos, **Dados Numéricos Da Doação De Órgãos E Transplantes Realizados Por Estado E Instituição No Período: Janeiro / Junho - 2015**. Disponível Em: [www.abto.org.br](http://www.abto.org.br)
- ANDERS S; PYL PT; HUBER W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**; 31(2):166-9, 2015.
- ANTIGANO F; ZAPH C. Regulation of CD4 T-cell differentiation and inflammation by repressive histone methylation. **Immunology and Cell Biology**; 93(3):245-52, 2015.
- ASKENASY N; YOLCU ES; YANIV I; SHIRWAN H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulatory. **Blood**; 105:4, 2005.
- AUCHINCLOSS H. In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance. **Am J Transplant**; 1:6-12, 2001.
- BALTIMORE D; BOLDIN MP; O'CONNELL RM; RAO DS; TAGANOV KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. **Nat Immunol**; 9:839-45, 2008.
- BAUMJOHANN D, ANSEL KM. MicroRNA regulation of T helper cell differentiation and plasticity. **Nat Rev Immunol**; 13:666–78, 2013.
- BERNER B; AKÇA D; JUNG T; MULLER GA; REUSS-BORST MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. **Journal of Rheumatology**; 27(5):1128-35, 2000.
- BRAUD C; BAETEN D; GIRAL M; et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. **J Cell Biochem**; 103: 1681-1692, 2008.
- BROUARD S; MANSFIELD E; BRAUD C; et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. **Proc Natl Acad Sci**; 104:15448-15453, 2007.
- CALDAS C; et al. T-Cell Response to Self HSP60 Peptides in Renal Transplant Recipients: A Regulatory Role? **TransplantProc**; 36(4):833-835, 2004.
- CALDAS C; LUNA E; SPADAFORA-FERREIRA M; PORTO G; IWAI LK; OSHIRO SE; MONTEIRO SM; FONSECA JA; LEMOS F; HAMMER J; HO PL; KALIL J; COELHO V. Cellular autoreactivity against heat shock protein60in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. **ClinExpImmunol**; 146(1):66-75, 2006.
- CLARKSON MR; SAYEGH MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. **Transplantation**; 80(5):555-63, 2005.
- CHATENOUD L. Natural and induced T CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. **Methods Mol Biol**; 677:3-13, 2011.
- CHATENOUD L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. **Nat Rev Immunol**; 3:123-32, 2003.
- CHOY JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. **Cell Death and Differentiation**; 17, 567–576, 2010.

- CHOMCZYNSKI P; SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**; 162(1):156-9, 1987.
- COELHO V; et al. Evidence of Indirect Allorecognition in Long-Term Human Renal Transplantation. **Clin Immunol**; 90(2):220-229, 1999.
- COSIMI AB; Burton RC; Colvin RB; Goldstein G; Delmonico FL; La Quaglia MP; et al. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation**; 32:535-539, 1981.
- DANTAL J; HOURMANT M; CANTAROVICH D; et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: Randomised comparison of two cyclosporin regimens. **Lancet**; 351:623-628, 1998.
- DONOVITCH GM. Handbook of Kidney Transplantation. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 1996.
- DUGAST E; CHESNEAU M; SOULILLOU J; BROUARD S. Biomarkers and possible mechanisms of operational tolerance in kidney transplant patients. **Immunological Reviews**; 258:208-217, 2014.
- GABARDI S; HALLORAN PF; FRIEDEWALD J. Managing Risk in Developing Transplant Immunosuppressive Agents: The New Regulatory Environment. **Am J Transplant**; 11(9):1803-9, 2011
- GARCIA G; HARDEN P; CHAPMAN J. The Global Role Of Kidney Transplantation. **J Nephrol**; 25(1): 1-6, 2012.
- GAO Y; LIN F; SU J; GAO Z; LI Y; YANG J; et al. Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. **Genes Immun**; 13:1-13, 2012.
- GRANJA C; et al. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. **Hum Immunol**; 65(2):124-134, 2004.
- GOTO N; PRINS P; NAKAO M; BONNAL R; AERTS J; KATAYAMA T. BIORUBY: bioinformatics software for the Ruby programming language. **Bioinformatics**; 26(20):2617-2619, 2010.
- HALLORAN P. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **N Engl J Med**; 351:2715-2729, 2004.
- HALLORAN PFE; HUNSICKER LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. **Am J Transplant**; 1(2):115-20, 2001.
- HA T-Y. The Role of MicroRNAs in Regulatory T Cells and in the Immune Response. **Immune Netw**; 11:11-41, 2011.
- HEIDT S; WOOD KJ. Biomarkers of operational tolerance in solid organ transplantation. **Expert Opin Med Diagn**; 6(4):281-293, 2012.
- HOFFMANN S; OTTO C; DOOSE G; TANZER A; LANGENBERGER D; CHRIST S; KUNZ M; HOLDT L; TEUPSER D; HACKERMUELLER J; STADLER PF. A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing, and fusion detection. **Genome Biology**; 15:R34, 2014.
- HORI S; NOMURA T; SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**; 299:1057-61, 2003.
- HOYNE GF. Mechanisms that regulate peripheral immune responses to control organ-specific autoimmunity. **Clinical and Developmental Immunology**; 2011.

- JANSSEN-CILAG. Orthoclone®OKT3 muromonab-CD3 – Worldwide discontinuation [press release], January 4, 2010.
- JEKER LT; MARONE R. Targeting microRNAs for immunomodulation. **Curr Opin Pharmacol**; 23:25-31, 2015.
- JOOSTEN SA; et al. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. **Kidney Int**; 68(1):1-13, 2005.
- JOVANOVIC V; LAIR D; SOULILLOU J-P; BROUARD S. Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model. **Transpl Int**; 21:199-206, 2008.
- KAWASAKI MIM; KOSHIBA T; FUJINO M; et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living-donor liver transplant recipients. **Int Surg**; 92: 276–286, 2007.
- KIMBALL JA; NORMAN DJ; SHIELD CF; SCHROEDER TJ; LISI P; GAROVOY M; et al. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. **Transpl Immunol**; 3:212-21, 1995.
- KLIPA D; MAHMUD N; AHSAN N. Antibody immunosuppressive therapy in solid organ transplant: Part II. **mAbs**; 2:607-12, 2010.
- KYEWSKI B; KLEIN L. A central role for central tolerance. **Annu Rev Immunol**; 24:571-606, 2006.
- LAL G; BROMBERG JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. **Blood**; 114:3727-3735, 2009.
- LAL G; YIN N; XU J; LIN M; SCHROPPEL S; DING Y; et al. Distinct inflammatory signals have physiologically divergent effects on epigenetic regulation of Foxp3 expression and Treg function. **Am. J. Transplant**; 11:203-214, 2011.
- LINDSAY MA. MicroRNAs and the immune response. **Trends Immunol**; 29:343-351, 2008.
- LIU YJ. A unified theory of central tolerance in the thymus. **Trends Immunol**; 27(5):215-21, 2006.
- LONDONO MC; DANGER R; GIRAL M; SOULILLOU JP; SÁNCHEZ-FUEYO A; BROUARD S. A Need for Biomarkers of Operational Tolerance in Liver and Kidney Transplantation. **American Journal of Transplantation**; 12:1370-1377, 2012.
- LONDON NJ; FARMERY SM; WILL EJ; DAVISON AM; LODGE JP. Risk of neoplasia in renal transplant patients. **Lancet**; 346:403-406, 1995.
- LOZANO JJ; PALLIER A; MARTINEZ-LLOREDELLA M; et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. **Am J Transplant**; 11:1916-1926, 2011.
- LOVE MI; HUBER W; ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**; 15:550, 2014.
- LODISH HF; ZHOU B; LIU G; CHEN C-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. **Nat Rev Immunol**; 8:120-30, 2008.
- LUTHER S; CYSTER JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. **Nat Immunol**; 2:102-7, 2001.
- MARTINEZ-LLOREDELLA M; PUIG-PEY I; ORLANDO G; et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. **Am J Transplant**; 7:309-319, 2007.

- MARTÍNEZ-LLORDELLA MLJ; PUIG-PEY I; ORLANDO G; et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. **J Clin Invest**; 118:2845-2857, 2008.
- MARANHÃO AQ; BRÍGIDO MM. Anticorpos Humanizados. **Biotecnologia Científica e Desenvolvimento**; 23:38-43, 2001.
- MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **Embnet journal**; 17:1, 2011.
- MAHMUD SA; MANLOVE LS; FARRAR MA. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. **JAKSTAT**; 2:1, 2013.
- MORRIS PJ. Transplantation – a medical miracle of the 20th century. **N Engl J Med**; 351:2678-2680, 2004.
- MORELON E; STERN M; KREIS H. Interstitial pneumonitis associated with sirolimus therapy in renal-transplant recipients. **N Engl JMed**; 343:225-226, 2000.
- NANKIVELL BJ; KUYERS DRJ. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. **Lancet**; 378:1428–1437, 2011.
- NEWELL KA; ASARE A; KIRK AD; et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. **J Clin Invest**; 120: 1836-1847, 2010.
- O'SHEA JJ; PAUL WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T Cells. **Science**; 327:1098-1102, 2010.
- PAGANI M; et al. Role of microRNAs and long-noncoding RNAs in CD4<sup>+</sup> T-cell Differentiation. **Immunological Reviews**; 253:82-96, 2013.
- PAVANELLI LR. Expressão diferencial de miRNAs em linfócitos T de indivíduos transplantados renais. **Dissertação de mestrado**. Universidade Católica de Brasília, 2013.
- PAULEY KM; CHAN EKL. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. **Ann NY AcadSci**; 1143:226-39, 2008.
- PICCIRILLO CA; SHEVACH EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. **J Immunol**; 167(3):1137-40, 2001.
- PONS JA; REVILLA-NUIN B; BAROJA-MAZO A; et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. **Transplantation**; 86:1370-1378, 2008.
- PORTUGAL K; et al. Renal transplant patients show variations in their self-reactive repertoires: a serial study. **Int Immunol**; 13(6):747-755, 2001.
- QUINTANA FJ; BASSO AS; IGLESIAS AH; KORN T; FAREZ MF; BETTELLI E; CACCAMO M; OUKKA M; WEINER HL. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**; 453:65-71, 2008.
- RACUSEN LC; SOLEZ K; COLVIN RB; BONSI B; CASTRO MC; CAVALLO T; et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney Int**; 55(2):713-23, 1999.
- REIMAND J; KULL M; PETERSON H; HANSEN J; VILO J. g:Profiler -- a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. **Nucleic Acids Research**; 35(Web Server issue):W193-200, 2007.
- ROUSSEY-KESLER G; et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. **Am J Transplant**; 6(4):736-746, 2006.

- ROBERTSON IB; HORIGUCHI M; ZILBERBERG L; DABOVIC B; et al. Latent TGF- $\beta$ -binding proteins. **Matrix Biology**; 47:44–53, 2015.
- RODRIGUEZ A; VIGORITO E; CLARE S; WARREN MV; COUTTET P; SOOND DR; et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**; 316:608-11, 2007.
- SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**; 101:455-8, 2000.
- SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**; 6:345-52, 2005.
- SAKAGUCHI S; et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev**; 212:8-27, 2006.
- SAKAGUCHI S; WING K; YAMAGUCHI T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. **Eur. J. Immunol**; 39:2331-2336, 2009.
- SIVOZHELEZOV V; BRAUD C; GIACOMELLI L. et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. II: Non-statistical gene microarray analysis. **J Cell Biochem**; 103:1693-1706, 2008.
- SAGOO P; PERUCHA E; SAWITZKI B; et al. Development of a cross- platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. **J Clin Invest**; 120:1848-1861, 2010.
- SETHI A; KULKARNI N; SONAR S; LAL G. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. **Front Genet**; 4:1-13, 2013.
- SPIEGEL JC; LORENZEN JM; THUM T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. **Expert Rev Mol Med**; 13:1-13, 2011.
- SETHI A; KULKARNI N; SONAR S; LAL G. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. **Front Genet**; 4:1-13, 2013.
- SINGER BD; KING LS; D'ALESSIO FR. Regulatory T Cells as Immunotherapy. **Front Immunol**; 5:46, 2014.
- SMITH JA; BLUESTONE JA. T cell inactivation and cytokine deviation promoted by anti-CD3 mAbs. **Curr Opin Immunol**; 9:648-54, 1997.
- SILVA HM; VIEIRA PMMM; COSTA PLN; PIMENTEL BMS; MORO AM; KALIL J; et al. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunol Lett**; 125:129-36, 2009.
- SILVA HM; et al. Preserving the B-Cell Compartment Favors Operational Tolerance in Human Renal Transplantation. **MolMed**; 18:733-743, 2011.
- SPADAFORA-FERREIRA M; et al. Indirect Alloreactivity and Cytokine Production to HLA-DR Peptides in Human Renal Transplantation. **Transplant Proc**; 33(1-2):435-436, 2001.
- SOLEZ K; COLVIN RB; RACUSEN LC; SIS B; HALLORAN PF; BIRK PE; et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). **Am J Transplant**; 7(3):518-26, 2007.
- SOULILLOU J; GIRAL M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. **Transplantation**; 72(Suppl 12): S89-93, 2001.

- SPADAFORA-FERREIRA M; et al. CD4+CD25+FOXP3+ Indirect Alloreactive T cells from Renal Transplant Patients Suppress Both the Direct and Indirect Pathways of Allorecognition. **ScandJImmunol**; 66(2-3):352-361, 2007.
- TUBO NJ; JENKINS MK. TCR signal quantity and quality in CD4+ T cell differentiation. **Trends in Immunology**; 35(12):591-596, 2014.
- TERASAKI PI; et al. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. **N Engl J Me**; 333(6):333-336, 1995a.
- TERASAKI PI; et al. Proposed HLA matching scheme for improved cadaveric kidney allocation. **Transplant Proc**; 27(1):61-63, 1995b.
- UEDA A; ZHOU L; STEIN PL. Fyn Promotes Th17 Differentiation by Regulating the Kinetics of ROR $\gamma$ t and Foxp3 Expression. **The Journal of Immunology**; 188(11):5247-56, 2012.
- VIEIRA PM; et al. Differential Monocyte STAT6 Activation and CD4+CD25+FOXP3+ T cell in Kidney Operational Tolerance Transplanted individuals. **HumImmunol**; 71(5):442-450, 2010.
- VIEIRA PM; et al. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. **ClinImmunol**; 142(2):117-126, 2011.
- WARING P; MÜLLBACHER A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. **Immunology and Cell Biology**; 77:312–317, 1999.
- WHITTAKER JR; VEITH FJ; SOBERMAN R; LALEZARI P; TELLIS I; FREED SZ; et al. The fate of the renal transplant with delayed function. **Surg Gynecol Obstet**; 136(6):919-22, 1973.
- WOOD KJ; SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nat Rev Immunol**; 3:199-210, 2003.
- XU L; KITANI A; FUSS I; STROBER W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3 T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- $\beta$ . **J. Immunol**; 178:6725-6729, 2007.
- XIAO C; RAJEWSKY K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. **Cell**; 136:26-36, 2009.
- YOU S; CHATENOU L. New generation CD3 monoclonal antibodies: are we ready to have them back in clinical transplantation? **Curr Opin Organ Transplant**; 15:720-4, 2010.
- YAMANISHI T; CHIKAMATSU K; TAKAHASHI G; ENDO S; MASUYAMA K. Immune Regulation by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Japanese Cedar Pollinosis. **Int Arch Allergy Immunol**; 156:187-195, 2011.
- ZHOU X; JEKER LT; BLUESTONE JA. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. **J Exp Med**; 205:1983-91, 2008.