



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Identificação de lncRNAs em linfócitos T humano estimulados com anticorpos anti-CD3 recombinantes

Manuela Maragno do Almo

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Co orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF

2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Identificação de lncRNAs em linfócitos T humano estimulados com anticorpos anti-CD3 recombinantes

Manuela Maragno do Almo

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Molecular como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Co orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF

2017

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Ildinete Silva-Pereira (UnB - Banca Interna)

Dr. Gabriel Sérgio Costa Alves (UnB – Banca Externa)

Dra. Isabel Garcia Sousa (UnB - Suplente)

Profª Dra. Andrea Queiroz Maranhão (UnB – Orientadora)

Prof Dr. Marcelo de Macedo Brígido (UnB – Co-orientador)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Imunologia Molecular da Universidade de
Brasília, sob a orientação da Profª. Dra.
Andrea Queiroz Maranhão

“Todos estão loucos, neste mundo? Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça, para o total.”

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	
1. Células T	1
2. Terapia com anticorpos anti-CD3	3
3. ncRNA	4
3.1 lncRNA	5
3.2 Mecanismos moleculares de regulação dos lncRNAs	13
3.3 lncRNAs no sistema imune	16
3.3.1 lnc-DC	19
3.3.2 GAPLINC	20
3.4 lncRNAs e linfócitos T	21
4. Regulação da expressão gênica por anticorpos anti-CD3	26
Justificativa e Objetivos	28
Material e Métodos	
Material	29
1. Iniciadores Sintetizados	29
2. Meios de cultura e soluções para bactéria	30
3. Antibióticos	30
4. Soluções e materiais para preparação de célula competente e transformação bacteriana	32
5. Soluções para extração de DNA plasmidial	32
6. Tampões para gel de eletroforese	32

7. Kits comerciais	33
8. Tampões de endonucleases de restrição	33
9. Endonucleases de restrição	33

Métodos

1. Identificação dos lncRNAs utilizando o Cufflinks	34
2. Síntese de iniciadores	35
3. Síntese de moléculas de cDNA	35
4. Reação de polimerização em cadeia (PCR)	35
5. Análise e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose	35
6. Ligação dos fragmentos de lncRNAs em vetor	36
7. Preparação de células bacterianas competentes	36
8. Transformação de <i>E.coli</i> por choque térmico	36
9. Extração de DNA plasmidial	37
10. Digestão de DNA plasmidial	37
11. Purificação de DNA	37
12. Preparação das amostras para sequenciamento	38
13. Ensaio de RT-qPCR	38

Resultados e Discussão

1. Seleção e identificação dos lncRNAs	39
2. lncRNA RP11-838N2.4	
2.1 Clonagem sequenciamento dos lncRNAs	45
2.2 Expressão relativa	51
2.3 Predição da estrutura secundária	53
3. lncRNA CTD-2319I12.1	
3.1 Clonagem sequenciamento dos lncRNAs	55
3.2 Expressão relativa	59
3.3 Predição da estrutura secundária	60

4. lncRNA COL4A2-AS2	61
5. LINC00861	61
Conclusões e Perspectivas	63
Referências Bibliográficas	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do complexo TCR-CD3	2
Figura 2. Representação da classificação dos lncRNAs de acordo com sua localização no genoma	6
Figura 3. Representação esquemática de lncRNAs que modulam a cromatina	7
Figura 4. Representação esquemática da regulação da expressão gênica pelo lncRNA	8
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA HOTAIR	9
Figura 6. Representação esquemática do lncRNA MALAT1	11
Figura 7. Representação esquemática do controle do splicing alternativo realizado por MALAT1	11
Figura 8. Representação esquemática da inativação do cromossomo X pelo lncRNA XIST	13
Figura 9. Representação esquemática dos diferentes mecanismos de ação dos lncRNAs	16
Figura 10. Representação esquemática da ativação do lincRNA-Cox2	18
Figura 11. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA Lethe	19
Figura 12. Representação esquemática da interação do lnc-DC com o fator de transcrição STAT3	20
Figura 13. Isoformas dos lncRNAs transcritos pelo gene GAPLINC (201, 202, 203 e 204)	21
Figura 14. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA NRON	22
Figura 15. Representação esquemática da ação do lncRNA NeST.	23
Figura 16. Representação esquemática da ação do lincRNA MAF-4	24
Figura 17. Expressão relativa dos lncRNAs determinada por RNAseq	40
Figura 18. Mapeamento das reads no gene lncRNA RP11-838N2.4	41
Figura 19. Mapeamento das reads no gene lncRNA CTD-2319 12	42

Figura 20. Mapeamento das reads no gene lncRNA COL4A2-AS2	43
Figura 21. Mapeamento das reads no gene LINC00861	44
Figura 22. Amplificação de fragmentos correspondentes ao lncRNA RP11-838N2.4 por PCR	45
Figura 23. Análise de restrição para a confirmação da construção dos vetores contendo os fragmentos de lncRNA em vetor pGEM-T easy.	46
Figura 24. Amplificação de fragmentos correspondentes ao lncRNA RP11-838N2.4 por PCR	47
Figura 25. Representação do alinhamento realizado pelo BLAST	48
Figura 26. Representação esquemática das isoformas do lncRNA GAPLINC	48
Figura 27. Alinhamento de sequências	50
Figura 28. Expressão quantitativa dos lncRNAs em linfócitos TCD3 ⁺ tratados com anticorpos anti-CD3	51
Figura 29. Representação esquemática de um locus gênico no cromossomo 18	52
Figura 30. Representação esquemática das diferentes versões dos anticorpos anti-CD3	53
Figura 31. Representação esquemática das estruturas secundárias do GAPLINC-202 e RP11-838N2.4	54
Figura 32. Representação esquemática das estruturas secundárias das variantes 1 e 2 do GAPLINC-204	55
Figura 33. Amplificação de fragmentos correspondentes ao lncRNA CTD-2319I12.1 por PCR	56
Figura 34. Análise de restrição para a confirmação da construção dos vetores contendo os fragmentos de lncRNA em vetor pGEM-T easy	57
Figura 35. Representação esquemática do alinhamento de sequências	58
Figura 36. Expressão quantitativa dos lncRNAs em linfócitos TCD3 ⁺ tratados com anticorpos anti-CD3	59
Figura 37. Representação esquemática da estrutura secundária do LOC645638	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores escolhidos para cada lncRNA	29
Tabela 2. lncRNAs selecionados após análise dos dados de RNAseq utilizando o pacote <i>Cufflinks</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Marcador de diferenciação)
CDR	Região Determinante de Complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
DC	<i>Dendritic cell</i> (Célula dendrítica)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGO	<i>Eosinophil Granule Ontogeny</i>
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
FR	Arcabouço (<i>Framework</i>)
Fv	Fragmento variável de anticorpo
HAMA	<i>Human Anti-Mouse Antibody</i>
IL	Interleucina
lincRNA	RNA intergênico longo não codificador
lncRNA	RNA longo não codificador
M	Molar
MALAT1	<i>Metastasis-Associated Long Adenocarcinoma Transcript 1</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
miRNAs	microRNAs
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	Nanograma
ncRNA	RNA não codificador
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares de sangue periférico)
PiRNA	<i>Piwi interacting RNA</i>
PRC2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerização
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
snRNA	<i>Small Nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>Small Nucleolar RNA</i>
siRNAs	<i>Small Interfering RNA</i>
TCR	Receptor de célula T
Tc	Linfócito T Citotóxico
Th	Linfócito T Helper
Treg	Linfócito T Regulatório
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

RESUMO

A terapia com anticorpos anti-CD3 pode induzir a imunossupressão e diversos mecanismos foram propostos para explicar tais efeitos. Apesar disso, os mecanismos imunorregulatórios dessas moléculas ainda não foram elucidados. Um dos mecanismos propostos envolve a participação de lncRNAs (RNAs longos não codificadores), que atuam em linfócitos T regulatórios, regulando diversas vias, inclusive aquelas envolvidas na tolerância imunológica. Em trabalhos anteriores do grupo de Imunologia Molecular, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram cultivadas na presença ou ausência do anticorpo monoclonal OKT3 ou de um fragmento recombinante da sua versão humanizada (Silva *et al.*, 2009). O RNA de células T CD3⁺ tratadas foram submetidos a sequenciamento de alto desempenho. A partir dos dados obtidos previamente, no presente trabalho, foram identificadas regiões com expressão diferencial sob o tratamento desses anticorpos, que poderiam corresponder a novos lncRNAs. Para uma melhor caracterização desses transcritos, foram extraídos RNAs de linfócitos TCD3⁺, em seguida retrotranscritos, clonados e sequenciados pelo método Sanger. Dentre as sequências testadas, foram identificados dois lncRNAs putativos regulados em linfócitos T tratados com anticorpos anti-CD3 humanos. Os níveis desses transcritos foram determinados em ensaios de PCR em tempo real. Análise de similaridades de sequências em bancos de dados, indicam que esses transcritos correspondem a isoformas com alta similaridade aos lncRNAs: GAPLINC e lnc-DC. Ambos apresentaram uma diminuição da expressão nas amostras tratadas com os anticorpos, sugerindo que eles possam estar associados a processos imunomodulatórios.

Palavras-chave: anticorpos anti-CD3, linfócitos T, lncRNAs, imunomodulação

ABSTRACT

Anti-CD3 antibody therapy may induce immunosuppression and several mechanisms have been proposed to explain such effects. Despite of that, the immunoregulatory mechanisms of these molecules have not yet been completely elucidated. One of the proposed mechanisms involves the participation of lncRNAs (long non-coding RNAs), which act on regulatory T lymphocytes, regulating several pathways, including those involved in immunological tolerance. In previous work of Molecular Immunology Group, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured in the presence or absence of the monoclonal antibody OKT3 or a recombinant fragment of their humanized counterpart (Silva *et al.*, 2009). RNAs from treated and untreated CD3⁺ T cells were subjected to Next Generation Sequencing (NGS). This previous work pointed out regions with differential expression in samples treated with the antibodies, which could correspond to new lncRNAs. For a better characterization of these transcripts, RNA was extracted from antibody treated CD3⁺ lymphocytes, which were retrotranscribed, cloned and sequenced by the Sanger method. Among the sequences tested, two putative lncRNAs that were regulated on T lymphocytes treated with human anti-CD3 antibodies were identified. The levels of these transcripts were determined in real-time PCR assays. Analysis in databases indicates that these transcripts correspond to isoforms with high similarity to lncRNAs: GAPLINC and lnc-DC. Both were downregulated in samples treated with the antibodies, suggesting that they may be associated with immunomodulatory processes.

Keywords: anti-CD3 therapy, T lymphocytes, lncRNAs, immunomodulation

INTRODUÇÃO

1. Células T

O sistema imune é composto por diversas células e moléculas que juntas trabalham para manter a homeostase do organismo. Para isso, esse sistema dispõe de duas formas de resposta, a inata e a adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e seus principais componentes são os fagócitos, como macrófagos e células dendríticas (UEMATSU; AKIRA, 2008).

A imunidade adaptativa é capaz de montar uma resposta específica a determinado antígeno, pode gerar memória imunológica e suas principais células são os linfócitos B e T. Os linfócitos T são centrais nesse processo quando interagem com as células apresentadoras de antígeno (APC) e podem se diferenciar em linfócitos citotóxicos (Tc), auxiliares (Th) ou reguladores (Treg) de acordo com os estímulos do microambiente molecular, e dessa forma controlam a resposta imune adaptativa (ABAIS-BATTAD *et al.*, 2017).

Os linfócitos T expressam na sua superfície o receptor TCR (do inglês, *T cell receptor*), um complexo protéico constituído de duas cadeias polipeptídicas glicosiladas (alfa - α e beta - β) mantidas juntas por ligações bissulfeto e que se associa a proteína CD3, formando o complexo funcional TCR-CD3 na superfície dos linfócitos T (WILSON & GARCIA, 1997) (**Figura 1**). A molécula CD3 é um antígeno de superfície específico de linfócito T e compõe o complexo do TCR, que pode se associar com os coreceptores CD4 ou CD8 e interagir com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (CD8⁺) ou MHC de classe II (CD4⁺) (RUDOLPH *et al.*, 2006).

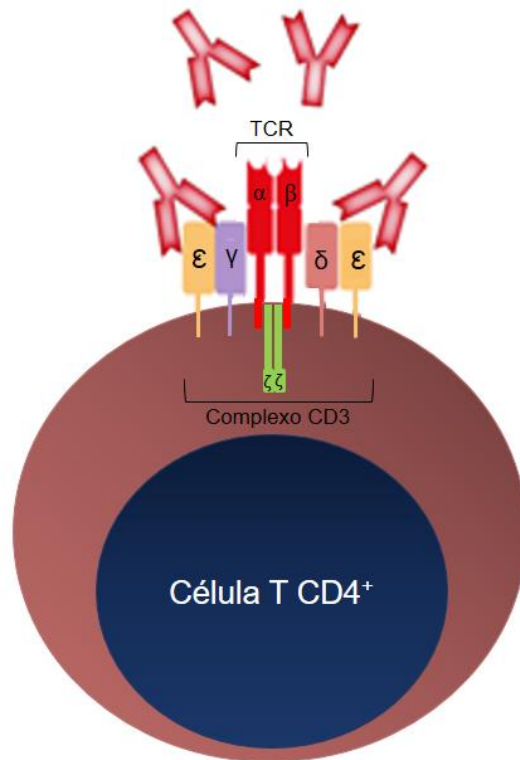


Figura 1. Representação do complexo TCR-CD3. O TCR é formado pelas cadeias α e β e se associa com a cadeia ζ , e com o complexo protéico CD3 que é formado pelas cadeias ϵ , γ e δ (Adaptado de SOUSA, 2015).

O complexo TCR-CD3 possui uma região transmembrânica conservada capaz de desencadear uma cascata de sinalização intracelular que leva a ativação do linfócito. Uma vez ativado, o linfócito T sofre diferenciação e proliferação por meio da ativação de diversos genes importantes para sua atividade funcional (SANTANA; ESQUIVEL-GUADARRAMA, 2006).

As células T CD4⁺ exercem um papel fundamental na regulação da imunidade adaptativa, auxiliando as células B na produção de anticorpos, interagindo com os linfócitos T CD8⁺ e com células da imunidade inata, além de estarem envolvidas nas respostas a diversos patógenos e doenças (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

Na periferia, os linfócitos T naíve ao interagirem com células apresentadoras de antígenos (APC) sofrem ativação e podem se diferenciar em subtipos distintos de célula efetora e de memória, e dessa forma são capazes de controlar a resposta a diversos antígenos (PAGANI *et al.*, 2013). Esses linfócitos T naíve são influenciados por citocinas e fatores de transcrição, que além de controlarem a expressão de determinados genes, promovem a diferenciação

dessas células para um fenótipo específico, como: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, T reg, Tfh, dentre outros (SUN; ZHANG, 2014).

De uma forma geral, o sistema imune reage constantemente às diferentes experiências imunológicas, sejam elas de manutenção, interação com agentes patogênicos, interação com autoantígenos ou de perturbação. Essa reação se dá pela ativação de inúmeras moléculas e células, dentre elas os linfócitos T que são posteriormente regulados, auxiliando assim na manutenção do estado de homeostase.

2. Terapia com anticorpos anti-CD3

O OKT3 foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-CD3 aprovado para uso clínico em humanos, indicado para terapia de rejeição a transplantes. De uma forma geral, esse anticorpo diminui a severidade da maioria dos episódios de rejeição (COSIMI *et al.*, 1981). No entanto, por ser um anticorpo monoclonal murino, o OKT3 causa uma resposta imunogênica no paciente, caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, ***Human Anti-Mouse Antibody***) (KIMBALL *et al.*, 1995).

Esse anticorpo provoca a ativação das células T, desencadeando a produção e a liberação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-2 (KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016), reação adversa severa conhecida como tempestade de citocinas (HANSEL *et al.*, 2010). Além disso, a resposta HAMA induz a produção de imunoglobulinas contra os anticorpos murinos, e estas promovem uma neutralização do OKT3, limitando o seu uso a longo prazo no tratamento de rejeição a transplante (ABRAMOWICZ *et al.*, 1989). Por esses motivos, em 2010, o uso do OKT3 foi descontinuado (REICHERT, 2012).

Com o objetivo de diminuir a resposta HAMA causada pelo OKT3, foram desenvolvidas técnicas que visavam a construção de um anticorpo praticamente humano. Esses anticorpos, conhecidos como humanizados, possuem apenas as regiões CDRs (do inglês, ***Complementarity Determining Regions***) murinas, enquanto o *framework* (FR) das cadeias leves e pesadas de anticorpos humanizados são humanas (JONES *et al.*, 1986; MARANHÃO & BRÍGIDO, 2001). O Grupo de Imunologia Molecular da UnB iniciou o processo de

humanização do anticorpo OKT3 em 1997 no intuito de torná-lo menos imunogênico e melhorar seu potencial terapêutico.

Os anticorpos anti-CD3 são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, que podem promover o controle de autoimunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (CHATENOUD, 2003). Nesse sentido, trabalhos anteriores do grupo mostraram diversos resultados promissores que envolvem esses anticorpos anti-CD3 humanizados.

Em pesquisas realizadas recentemente foi analisado o perfil imunorregulatório (SILVA, 2009; BEZERRA, 2014), o perfil transcritômico de linfócitos T por meio de sequenciamento de alto desempenho (RNA-Seq) e RT-qPCR (SIMI, 2014; SOUSA, 2015) e o perfil de expressão de miRNAs em linfócitos T (SOUSA *et al.*, 2017) tratados com os anticorpos anti-CD3. Os dados obtidos sugerem a existência de uma indução de células T reguladoras promovida por esses anticorpos. Contudo, não há na literatura um consenso sobre a participação de RNAs não codificadores (ncRNA) na diferenciação de células T e seu papel regulatório. De forma que ainda restam algumas questões precisam ser abordadas, como a caracterização de forma mais aprofundada dos efeitos dos anticorpos anti-CD3 humanizados na diferenciação de linfócitos T e na expressão diferencial de moléculas como os lncRNAs.

3. ncRNAs

RNAs não codificadores (ncRNAs) são moléculas que não são traduzidas em proteínas. Os ncRNAs podem controlar diversos genes e são classificados de acordo com o seu tamanho. Podem ser pequenos ncRNAs, como os miRNAs (*microRNAs*), siRNAs (*small interfering RNAs*) e piRNAs (*Piwi-interacting RNAs*), e longos, como os lncRNAs (*long non coding RNAs*) e lincRNA (*long intergenic ncRNA*) (GUAN *et al.*, 2013).

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificadores, com aproximadamente 20 nucleotídeos, que controlam diversos processos celulares e desempenham um papel importante na regulação pós-transcricional de genes (SOUSA *et al.*, 2017). A biogênese e o processamento desses RNAs são realizados pelos fatores Drosha e Dicer que são essenciais para a formação dos microRNAs (GUAN *et al.*, 2013).

siRNAs são pequenos RNAs de interferência, da classe dos RNAs de dupla fita (dsRNA), utilizados para silenciamento gênico. Esses RNAs interferem na tradução das proteínas, se ligando ao mRNA e promovendo a degradação de sequências específicas (CAVALLARO *et al.*, 2017). Os siRNAs apresentam um potencial terapêutico, pois podem ser utilizados para o silenciamento de genes envolvidos com a patogênese de diferentes doenças, como infecção viral, câncer e doenças hereditárias (WHITEHEAD *et al.*, 2011).

Os piRNAs podem ter entre 24 e 31 pares de base e sua principal função é regular a atividade de transposons no genoma, especialmente para preservar a gametogênese e reprodução corretas (IWASAKI; SIOMI, 2015). PIWI, é uma das subfamílias da proteína Argonata, cujas proteínas são expressas principalmente nas células germinativas e interagem com ncRNAs conhecidos como piRNAs (PIWI-interacting RNAs). De maneira geral, a proteína Argonata tem um papel fundamental no processo de silenciamento de genes e se liga aos diferentes tipos de pequenos ncRNAs que vão direcioná-la às suas sequências alvo (WEICK; MISKA, 2014).

O avanço dos estudos de transcriptomas permitiu a descoberta e caracterização de diversos ncRNAs e aprofundou os conhecimentos sobre o envolvimento dessas moléculas em diversas vias biológicas humanas (WANG *et al.*, 2015). Esses estudos também mostraram que os ncRNAs possuem mecanismos que regulam a expressão gênica em níveis transcricionais, pós-transcricionais e epigenéticos (CHEN; ZHANG, 2015). No entanto, 75-90% do genoma é composto por genes transcritos como ncRNAs, e por isso, essa classe de moléculas ainda não foi completamente explorada (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

3.1 lncRNAs

Os RNAs longos não codificadores (lncRNAs) apresentam mais de 200 pares de base, características que os distingue dos pequenos RNAs não codificadores, como: miRNAs, siRNAs, piRNAs, tRNA, snRNA e snoRNA (YANG; WEN; ZHU, 2015). Assim como os mRNAs, a maioria dos lncRNAs descritos atualmente possuem a extremidade N terminal adicionada de um nucleotídeo de guanosina metilado (cap 5'), são poliadenilados, sofrem *splicing* e são transcritos pela RNA polimerase II (AUNE; SPURLOCK, 2016). A

nomenclatura da maioria dos lncRNAs varia de acordo com os genes nos quais eles estão próximos ou genes que eles regulam (SPURLOCK; CROOKE; AUNE, 2016).

A localização dos lncRNAs no genoma é o parâmetro utilizado para a classificação dessas moléculas, que podem ser divididas em categorias, como: **senso** – lncRNAs que sobrepõem um ou mais éxons de um determinado transcrito na mesma fita; **antisenso** – lncRNAs que sobrepõem um ou mais éxons de um transcrito na fita oposta (antisense); **intrônico** – lncRNAs derivados de um íntron da mesma fita ; **intergênico** – lncRNAs localizados entre dois genes na mesma fita; **divergente** – lncRNAs que iniciam a transcrição na fita oposta de um gene (CHEN & ZHANG, 2015; PAGANI *et al.*, 2013) (**Figura 2**).

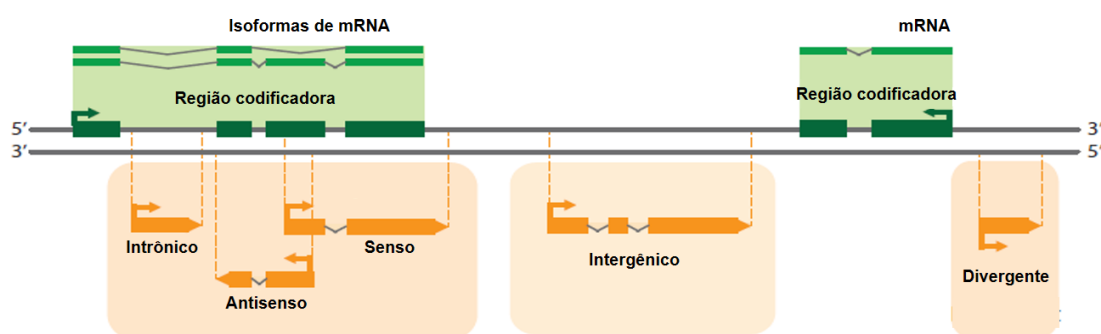


Figura 2. Representação da classificação dos lncRNAs de acordo com sua localização no genoma. lncRNAs senso são aqueles que sobrepõem um ou mais éxons de um determinado transcrito na mesma fita; lncRNAs **antisense** sobrepõem um ou mais éxons de um transcrito na fita oposta (antisense); lncRNAs **intrônicos são** derivados de um íntron da mesma fita; lncRNAs **intergênicos estão** localizados entre dois genes na mesma fita e os lncRNAs **divergentes são aqueles** que iniciam a transcrição na fita oposta de um gene (Adaptado de PAGANI *et al.*, 2013)

A maioria dos ncRNAs, pequenos ou longos, passam por diversas etapas de sua biogênese no núcleo (YU; SHAN, 2016), o que facilita o envolvimento dessas moléculas na regulação epigenética tendo efeito direto na cromatina (QUINN; CHANG, 2016). lncRNAs nucleares afetam a adição do Cap 5', a poliadenilação do mRNA e o splicing do pré-mRNA, que é um processo importante para a produção de diferentes proteínas em organismos eucariotos (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015). No entanto, é no citoplasma que os lncRNAs estão presentes em maior número, (QUINN; CHANG, 2016), pois essa região é o destino final e local de ação para algumas dessas moléculas (RASHID; SHAH; SHAN, 2016).

Estudos prévios mostraram que as estruturas secundárias e terciárias dos lncRNAs são conservadas, característica que pode ter relação com a função biológica dessas moléculas (LI; ZHU; LUO, 2016). A regulação da expressão gênica pelos lncRNAs pode ocorrer por meio de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e epigenéticos (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015), na forma *cis* - quando lncRNAs controlam a expressão de genes posicionados próximos a eles ou *trans* - quando controlam a expressão gênica em outros *loci* (FATICA; BOZZONI, 2013).

Na regulação transcricional, os lncRNAs podem agir como co-ativadores de diferentes proteínas, se ligando especificamente a uma delas e promovendo a ativação de fatores de transcrição e modulação da cromatina (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015).

Alguns lncRNAs, como HOTAIR e ANRIL, regulam a transcrição gênica por meio da ligação com complexos modificadores da cromatina (**Figura 3**) (GEISLER; COLLER, 2013). Outros, podem interagir com a RNA polimerase II (RNAPII) e dessa forma bloquear a transcrição, como ocorre com o lncRNA 7Sk que previne que o fator de transcrição PTEF β fosforile o domínio carboxi-terminal da RNAPII (KORNIENKO *et al.*, 2013) (**Figura 4**).

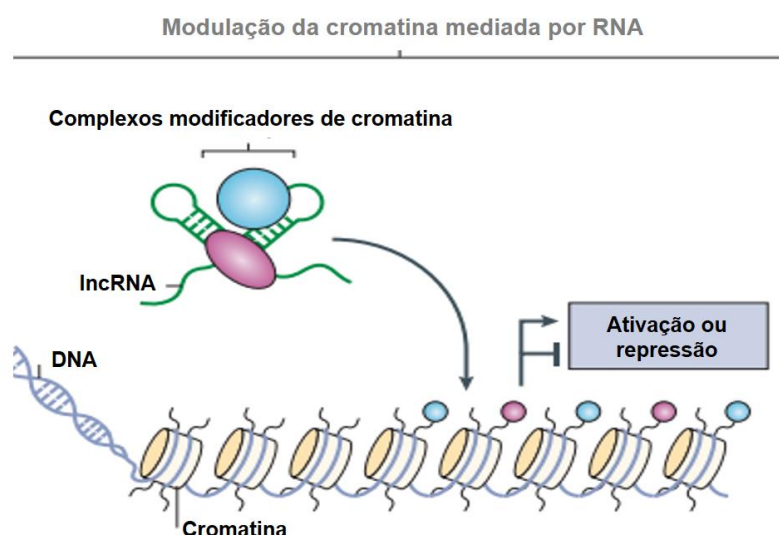


Figura 3. Representação esquemática de lncRNAs que modulam a cromatina. lncRNAs se ligam a complexos modificadores de cromatina e os direcionam ao alvo específico, ativando ou reprimindo o gene no *locus* (Adaptado de GEISLER; COLLER, 2013).

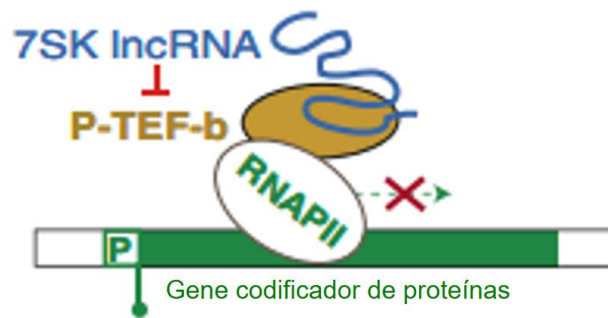


Figura 4. Representação esquemática da regulação da expressão gênica pelo lncRNA. lncRNAs podem bloquear a ligação de fatores como PTEF β na RNA polimerase II (RNAPII), e impedir que ocorra a transcrição (Adaptado de KORNIENKO *et al.*, 2013).

HOTAIR é um lncRNA envolvido com viabilidade celular, metástase, tumorigênese e um importante regulador de silenciamento gênico. Este lncRNA é produto da transcrição do gene HoxC e atua em trans, ou seja, em genes localizados em outros loci (BHAN; MANDAL, 2014). HOTAIR interage com o PRC2 (do inglês *Polycomb Repressive Complex 2*), complexo multiprotéico que realiza o silenciamento epigenético durante diversos processos, incluindo desenvolvimento de câncer (HAJJARI; SALAVATY, 2015).

O complexo PRC2 é composto pela histona H3K27 metiltransferase (EZH2) e outras três subunidades: SUZ12, EED e RBAP48/46. O lncRNA HOTAIR também interage com a histona H3K4 dimetilase (LSD1) e com os complexos repressores CoREST/REST. A interação com essas histonas é imprescindível para o silenciamento gênico (GEISLER; COLLER, 2013). HOTAIR é um lncRNA que funciona como uma plataforma que recruta esses complexos para os promotores do gene alvo e dessa forma regula a trimetilação da H3K27 e a demetilação da H3K4, suprimindo a expressão desse gene alvo (BHAN; MANDAL, 2014) (**Figura 5**).

HOTAIR pode ser utilizado como um biomarcador para vários tipos de câncer, visualizando e analisando sua alta expressão como um potencial prognóstico, além de possibilitar acompanhar a progressão da doença e o estágio do tumor (HAJJARI; SALAVATY, 2015).

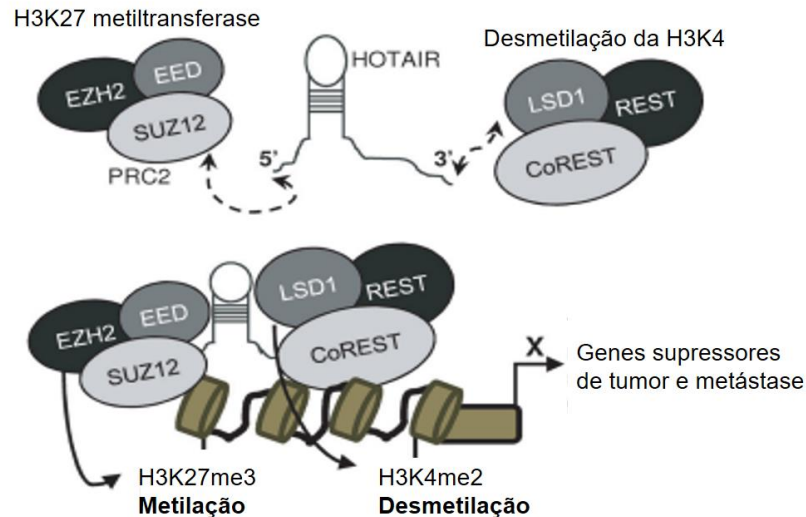


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA HOTAIR. O lncRNA age como plataforma e interage com os complexos PRC2 e LSD1, recrutando-os para o promotor do gene alvo onde ocorre a regulação da trimetilação da histona H3K27 e demetilação da H3K4, suprimindo a expressão gênica (Adaptado de BHAN; MANDAL, 2014).

Outro lncRNA envolvido na regulação da transcrição é o antisense ANRIL, que está no local no mesmo *locus* onde se encontram os genes produtores das proteínas INK4A, INK4B e ARF. Esse lncRNA se liga a duas proteínas provenientes do complexo PRC, a CBX7 (PRC1) e a SUZ12 (PRC2), e as recruta para seu *locus* gênico, regulando a modificação de histona no local (ANGRAND *et al.*, 2015). Esse mesmo *locus* também é conhecido por possuir os genes supressores de tumor p15, CDKN2A, CDKN2B e sabe-se que o ANRIL desempenha um papel regulador na supressão de tumores (BHAN; MANDAL, 2014).

A nível pós-transcricional, os lncRNAs podem inibir ou promover alguns processos como o *splicing*, degradação e tradução de mRNAs alvos, podendo ou não necessitar do auxílio do miRNAs como mediadores. Juntos, podem ser os precursores de pequenos RNAs e ainda regulam a meia vida dessas moléculas (*mRNA turnover*). Os lncRNAs MALAT1 e o lincRNA-p21 são exemplos envolvidos nesses processos (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015).

MALAT1 (do inglês **M**etastasis **A**ssociated **L**ong **A**denocarcinoma **T**ranscript 1), é um lncRNA nuclear relacionado com metástase celular, que

desempenha um papel importante no *splicing* alternativo de pré-mRNA modulando os níveis das proteínas SR, fatores regulatórios desse processo (ANGRAND *et al.*, 2015).

O lncRNA MALAT1 faz parte de domínios nucleares (nuclear speckles) que são regiões subnucleares enriquecidas com fatores envolvidos no processamento do mRNA e no *splicing*, como as proteínas SR, que modulam a expressão gênica (YU; SHAN, 2016). Esse lncRNA regula o *splicing* alternativo pois age como uma plataforma para fatores como o PC2, que é uma subunidade do complexo '*polycomb-repressive*' de proteínas reguladoras, e E2F1 que é um fator de transcrição, que juntos compõem o '*polycomb body*', onde esses fatores estão metilados (YOSHIMOTO *et al.*, 2016)

MALAT1 atrai PC2 e E2F1 para seu milieuo de ativação no domínio nuclear (*nuclear speckles*) e dessa forma interage com os aminoácidos serina e arginina para regular o *splicing* alternativo (TANO; AKIMITSU, 2012) (**Figura 6**). Na presença do MALAT1, as proteínas SR fosforiladas tem uma maior facilidade de se ligarem ao pré-mRNA e regular o *splicing*; já na ausência desse lncRNA há um aumento das proteínas SR desfosforiladas e com isso, mudanças no *splicing* alternativo do pré-mRNA (YOSHIMOTO *et al.*, 2016) (**Figura 7**).

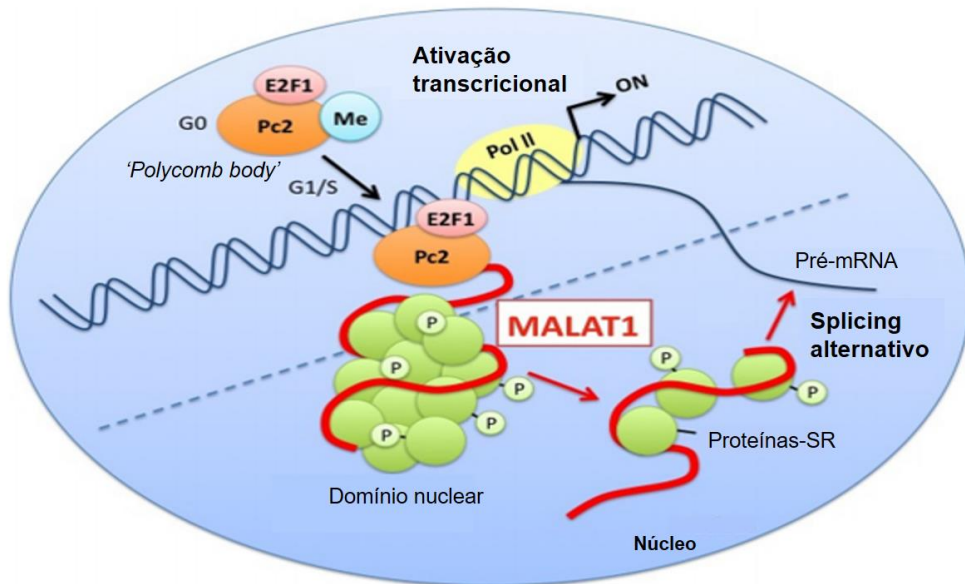


Figura 6. Representação esquemática do IncRNA MALAT1. O IncRNA MALAT1 integra o domínio nuclear (*Nuclear speckles*) e regula o *splicing* alternativo pois interage com os fatores reguladores de *splicing* (proteínas SR) e com complexo '*polycomb-repressive*' de proteínas reguladoras (E2F1 e PC2). Dessa forma ele é capaz de interferir e modular o *splicing* alternativo do pré-mRNA. (Adaptado de TANO; AKIMITSU, 2012)

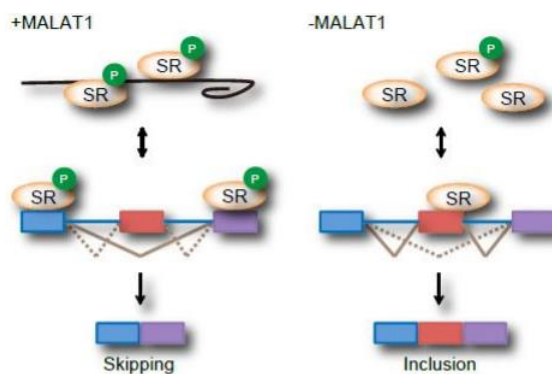


Figura 7. Representação esquemática do controle do *splicing* alternativo realizado por MALAT1. Esse IncRNA se associa com os fatores reguladores de *splicing* (proteínas SR), que fosforilados tem uma maior facilidade de regularem o *splicing* do pré-mRNA. Na ausência desse IncRNA, há um aumento do número de proteínas SR desfosforiladas e com isso, ocorre uma diminuição na eficiência do *splicing* (Adaptado de YOSHIMOTO *et al.*, 2016).

A proteína p53 é um importante fator de transcrição que regula as respostas celulares ao estresse por meio da ativação e repressão de diversos genes alvos. O lincRNA-p21 é um alvo da p53 que induz esse lincRNA a modular a resposta pós-transcricional por meio de determinadas proteínas (ZHAO; SUN; WANG, 2016). Sob condições estressantes, lincRNA-p21 também pode regular a apoptose, com um mecanismo de *feedback* no qual há um aumento da atividade transcricional da proteína p53 no núcleo, uma vez que esse lincRNA é necessário para a indução da apoptose por essa proteína (CHILLÓN; PYLE, 2016).

Uma outra forma de regulação tem consequências epigenéticas que pode ser realizada pelos lincRNAs e está envolvida no controle da expressão gênica, por meio de mecanismos de metilação do DNA, inativação do cromossomo X, modificação de histonas e *imprinting*, que podem modificar a organização da cromatina (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015). O lincRNA Xist foi um dos primeiros a ser descoberto em mamíferos e por isso é tido como um modelo para entender a regulação epigenética (LEE, 2012). Um outro exemplo de lincRNA envolvido com essas funções é o Air, um lincRNA que sofre *imprinting* e é expresso apenas no alelo paterno (QUINN; CHANG, 2016).

A inativação do cromossomo X é um processo que ocorre durante a embriogênese nos mamíferos do sexo feminino para atingir uma compensação de dose entre os genes dos gêneros. Esse processo acontece sob a regulação do lincRNA Xist, que é transcrito pelo gene *Xist* no centro de inativação do cromossomo X (*Xic*) (PONTIER; GRIBNAU, 2011).

O lincRNA Xist é controlado por outros lincRNAs, por exemplo, o Jpx que é um regulador positivo da ativação do lincRNA Xist e o Tsix que é antagonista do Xist e regulado pelo *enhancer* Xite (LEE, 2012). Junto com eles, está o 'motivo conservado' RepA que age no recrutamento do fator de silenciamento PRC2 para o promotor do Xist, formando o complexo RepA-PRC2 (CHEN; CHEN; ZHANG, 2015).

O cromossomo inativo, chamado de Xi é revestido pelo lincRNA Xist, que recruta fatores de silenciamento, como o PRC2, levando a uma repressão da expressão gênica desse cromossomo (LI; ZHU; LUO, 2016) **(Figura 8)**.

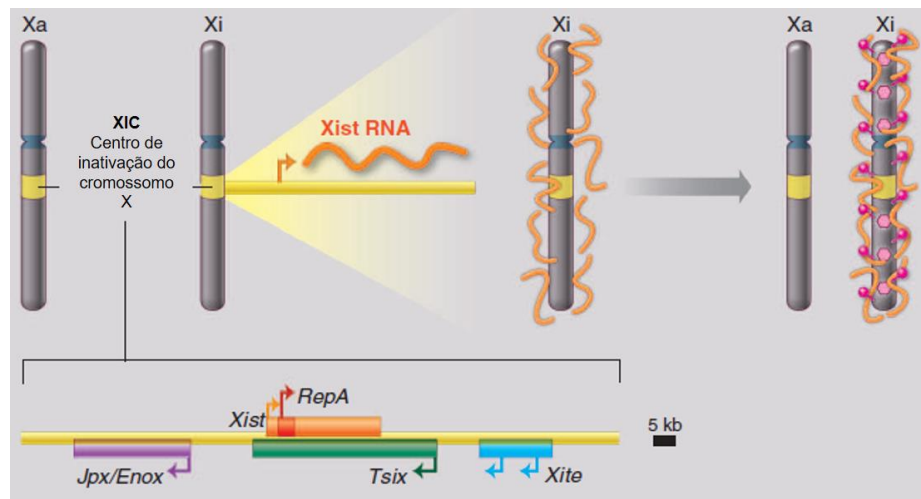


Figura 8. Representação esquemática da inativação do cromossomo X pelo lncRNA XIST. XIST é transcrito pelo XIC (centro de inativação do cromossomo X) presente no cromossomo inativo (Xi) e reveste esse cromossomo e por mecanismos epigenéticos, silencia a expressão do Xi. (Adaptado de LEE, 2012)

O lncRNA Air é um outro exemplo que está relacionado com a regulação epigenética em camundongos. Este lncRNA sofre um processo de *imprinting*, um do mecanismo de silenciamento gênico. Air é expresso no cromossomo paterno, cujo alelo não sofre metilação e dessa forma ocorre o silenciamento do promotor do gene *Igf2r* (*Insulin Like Growth Factor 2 Receptor*) (WANG; CHANG, 2011). No alelo materno, Air está localizado em uma região hipermetilada e por isso o lncRNA é suprimido e os genes presentes nesse *locus* são expressos (QUINN; CHANG, 2016).

3.2 Mecanismos moleculares de regulação dos lncRNAs

Os lncRNAs estão envolvidos em diversas funções biológicas no organismo e a execução dessas funções é baseada em quatro mecanismos moleculares e um lncRNA específico pode estar relacionado com mais de um desses mecanismos.

O primeiro mecanismo (**Figura 9 I**) é constituído pelos lncRNAs sinalizadores (*signals*), indicadores de atividade transcricional e envolvidos nas vias de sinalização. São classificados dessa forma, pois podem possuir funções regulatórias e sua presença indica que pode ocorrer algum processo de

sinalização celular. Os principais exemplos de lncRNAs que exercem esse mecanismo são: Air, Xist, lincRNA-p21, PANDA (WANG; CHANG, 2012).

Assim como o lincRNA-p21, PANDA é um lncRNA também induzido pela p53, que interage em resposta a danos celulares, com o fator de transcrição NF-YA pra diminuir a expressão de genes pró-apoptóticos e permitir uma pausa no ciclo celular (WANG; CHANG, 2012).

O segundo mecanismo (**Figura 9 II**) engloba os lncRNAs que atuam como armadilhas (*decoys*) para remover ou afastar determinadas proteínas do seu alvo, que podem ser fatores de transcrição, modificadores de cromatina ou qualquer outro fator de regulação e dessa forma ativar ou silenciar genes (YANG; WEN; ZHU, 2015). É um mecanismo de regulação competitiva entre os lncRNAs e outras moléculas com a tentativa de exercer um efeito sob os mesmos alvos moleculares (MATHY; CHEN, 2017). Os principais lncRNAs desse grupo são: TERRA, PANDA e Gas5 (WANG; CHANG, 2012).

O lncRNA TERRA é transcrito a partir dos telômeros, que são estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos e são importantes para sua estabilidade e proteção. O TERRA está envolvido na regulação da homeostase e função dessas estruturas (CUSANELLI; CHARTRAND, 2015), podendo interagir fisicamente com a telomerase para executar essas funções (WANG; CHANG, 2012).

O lncRNA PANDA, mencionado anteriormente, é bastante sensível a danos celulares. Em resposta a esses danos, PANDA inibe a expressão de genes apoptóticos, ligando-se diretamente ao fator de transcrição NF-YA que ativa genes em resposta a danos no DNA, o que leva à sobrevivência das células (WANG; CHANG, 2012).

Gas5 é um lncRNA que está relacionado com uma classe de hormônios esteroides, os glicocorticóides, que desempenham diversas funções no sistema imune, metabólico e cardiovascular (WANG; CHANG, 2012). Esse lncRNA é tido como 'decoy' por interagir com o receptor de glicocorticoide, bloqueando-o e com isso impedindo a via de sinalização desse hormônio. Esse mecanismo constitui a maquinaria de regulação da atividade dos glicocorticoides nos tecidos alvo (YANG; WEN; ZHU, 2015).

O terceiro mecanismo (**Figura 9 III**), dos lncRNAs guias (*guides*), é caracterizado pela ligação dessas moléculas a proteínas e como esses lncRNAs

direcionam esse complexo a alvos específicos, modificando a expressão de genes tanto em *cis* como em *trans* (WANG; CHANG, 2012). Os lncRNAs Xist e Air são exemplos de lncRNAs que regulam a expressão em *cis*, enquanto os lncRNAs HOTAIR e lincRNA-p21, os que regulam a expressão em *trans* (YANG; WEN; ZHU, 2015).

O quarto e último mecanismo é composto pelos lncRNAs que servem de plataforma (*scaffold*) (**Figura 9 IV**) fazendo parte de complexos ribonucleoprotéicos que controlam a especificidade e dinâmica de interações moleculares e processos de sinalização, como ocorre nos lncRNAs ANRIL e HOTAIR, por exemplo (WANG; CHANG, 2012).

Um exemplo desse mecanismo é o lncRNA ANRIL, que apresenta uma interação direta com os complexos protéicos PRC1 e PRC2, importantes para a regulação da cromatina. A ligação do lncRNA com essas moléculas contribui para um melhor desempenho desses complexos, uma vez que o ANRIL serve como plataforma para recrutar complexos modificadores de cromatina e dessa forma regulam a atividade transcricional gênica (WANG; CHANG, 2012; YANG; WEN; ZHU, 2015).

Assim como o ANRIL, o HOTAIR interage com o mesmo complexo PRC2 para promover uma repressão gênica. Ele também pode se ligar a um outro complexo composto pelas proteínas LSD1, CoREST e REST cuja função é demetilar histonas para suprimir a expressão de determinados genes. Dessa forma, o lncRNA HOTAIR pode reprimir a expressão gênica por diversos mecanismos ao mesmo tempo (WANG; CHANG, 2012).

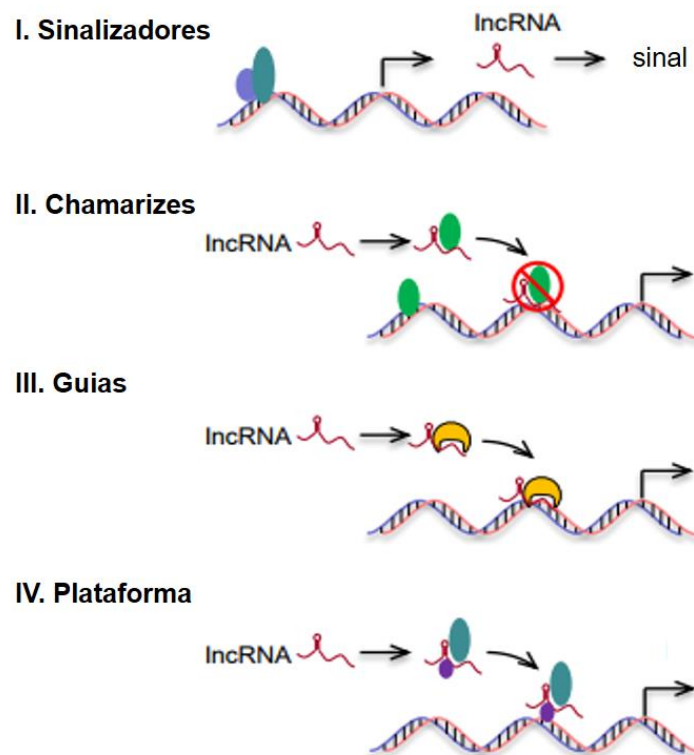


Figura 9. Representação esquemática dos diferentes mecanismos de ação dos lncRNAs. **I - Sinalizadores:** lncRNAs envolvidos em vias de sinalização celular. **II - Chamarizes:** lncRNAs que removem ou afastam fatores de transcrição ou outras proteínas do seu alvo. **III - Guias:** lncRNAs que recrutam proteínas para o gene alvo. **IV - Plataforma:** lncRNAs que servem de apoio para múltiplas proteínas para estabilizar estruturas ou complexos de sinalização (Adaptado de MATHY; CHEN, 2017).

3.3 lncRNAs no sistema imune

O envolvimento dos lncRNAs em diversas vias biológicas e no desenvolvimento celular tem sido cada vez mais elucidado. Atualmente, sabe-se também que essas moléculas regulam o desenvolvimento e diferenciação de diversas linhagens do sistema imune (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017), como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos B e T (BHAT *et al.*, 2016).

Um lncRNA envolvido na regulação de neutrófilos, eosinófilos e monócitos, em humanos e camundongos, é o *Morrbid* (do inglês, **Myeloid RNA Regulator of Bim-Induced Death**), localizado no núcleo e que responde a citocinas como, IL-3, IL-5, GM-CSF, envolvidas com a sobrevivência dessas células (TIAN *et al.*, 2016). O controle da regulação dessas células é importante

para aumentar as respostas imunes a inflamações e ela ocorre por meio da interação do lncRNA com o complexo PRC2, que promove modificações na histona do promotor do gene pró-apoptótico Bcl2L11 (Bim) (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017). Dessa forma, Bim permanece em um estado silenciado.

Células imunes que estão sofrendo o processo de inflamação, também podem ter os níveis do lncRNA Morrbid alterados por mecanismos regulatórios, e dessa forma, podem ser capazes de controlar a apoptose em resposta a sinais provenientes de citocinas (TIAN *et al.*, 2016). Morrbid pode ser um importante alvo terapêutico para o tratamento de desordens envolvendo células mieloides aberrantes (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

O lincRNA-Cox2 é um non coding que está relacionado com a ativação ou repressão da expressão gênica de genes anti-inflamatórios em macrófagos e tem seus níveis aumentados na presença de LPS, Pam3CSK4 (lipopeptídeo sintético de bactéria) e R848 (componente sintético antiviral) (HEWARD; LINDSAY, 2014), que são reconhecidos por receptores do tipo *Toll Like* (TLR) e induzem uma cascata de ativação da via Myd88-NF- κ B (IMAMURA; AKIMITSU, 2014) (**Figura 10**).

A repressão da expressão gênica pelo lincRNA-Cox2 ocorre pela interação dele com as ribonucleoproteínas nucleares (hnRNP) A/B e A2/B1, proteínas que desempenham um papel importante no processamento do pré-mRNA e na regulação da expressão gênica (GENG; TAN, 2016). Além disso, essas proteínas também podem regular a repressão de genes relacionados com a resposta imune, como o das quimiocinas Ccl5 e C13cl1, e os estimulados por IFN, como Ifr7 e Isg15 (IMAMURA; AKIMITSU, 2014).

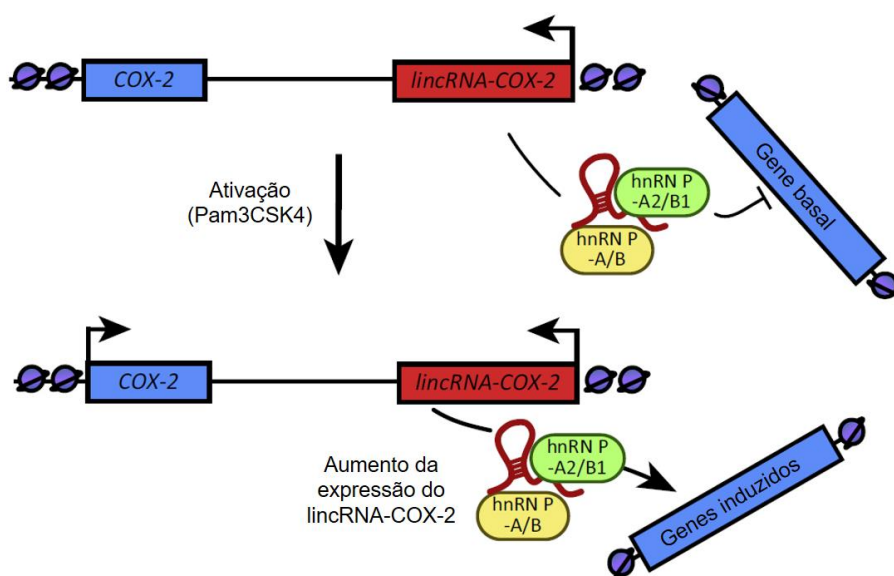


Figura 10. Representação esquemática da ativação do lincRNA-Cox2. O lincRNA-Cox pode ser ativado na presença de componentes como o LPS, R848 e Pam3CSK4 em macrófagos. Pode reprimir a expressão gênica de genes anti-inflamatórios quando interage com as ribonucleoproteínas nucleares hnRNP A/B e A2/B1 (Adaptado de HEWARD; LINDSAY, 2014)

Outro lincRNA que interage com as hnRNP, é expresso em macrófagos e modula a regulação da citocina TNF α é o lincRNA THRIL (do inglês, *TNF α and hnRNPL Related Immunoregulatory LincRNA*) (LI *et al.*, 2014). O complexo THRIL-hnRNP é capaz de se ligar ao promotor do gene TNF α e regular a sua expressão, o que mostra os lincRNAs como moléculas importantes na regulação de genes relacionados com o sistema imune (GENG; TAN, 2016).

No sistema imune, os lincRNAs também estão envolvidos com o desenvolvimento de eosinófilos, como o lincRNA intrônico EGO (do inglês *Eosinophil Granule Ontogeny*), que é importante para a expressão de genes relacionadas com essas células, apresentando-se com níveis de expressão elevado durante o seu desenvolvimento (HU; ALVAREZ-DOMINGUEZ; LODISH, 2012).

Lethe é um lincRNA transcrito pelo pseudogene Rps15a-ps4 e conhecido por bloquear as respostas inflamatórias da via NF-kB em fibroblastos de camundongo, pela associação com as proteínas p50 e p65, que são essenciais para a formação e ativação do fator de transcrição NF-kB (HEWARD; LINDSAY, 2014). A ativação desse lincRNA acontece em resposta a citocinas como TNF α e IL-1 β que levam à junção do Lethe com as proteínas p65 e p50 que impedem que o fator de transcrição NF-kB chegue ao seu promotor no gene da IL-6,

bloqueando parte das respostas inflamatórias (ATIANAND; FITZGERALD, 2015) (Figura 11).

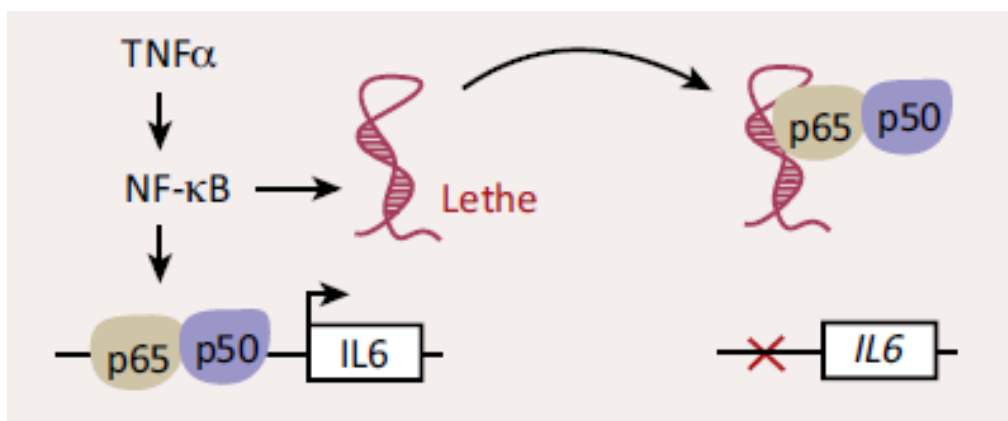


Figura 11. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA Lethe. Esse lncRNA é ativado pelas citocinas TNF α e IL-1 β que levam a associação do lncRNA com as proteínas p65 e p50, envolvidas na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Dessa forma, impedem que esse fator de transcrição chegue ao seu promotor e bloqueiam as respostas inflamatórias (Adaptado de ATIANAND; FITZGERALD, 2015)

3.3.1 lnc-DC

As células dendríticas (DC) funcionam como células apresentadoras de antígenos e são importantes para a interação dos sistemas imunes inato e adaptativo. Recentemente foi descoberto um lncRNA, conhecido por lnc-DC (ou LOC645638), expresso durante a diferenciação de monócitos em células dendríticas (WANG *et al.*, 2014). Sua transcrição é controlada pelo fator de transcrição PU.1, que se liga ao promotor do gene do lnc-DC, para regular a diferenciação dessas células (GENG; TAN, 2016) (Figura 12).

Sabe-se que o *knockdown* desse lnc-DC leva a uma diminuição na expressão de genes relacionados com as funções desse tipo celular, como apresentação de antígenos, indução da proliferação de células TCD4⁺ e produção de citocinas (WANG *et al.*, 2014).

Além disso, o lnc-DC também interage com o fator de transcrição STAT3 por meio da sua porção C-terminal que contém o aminoácido Tyr707 (Y705) cuja fosforilação é essencial para a ativação e translocação nuclear desse fator de transcrição (GENG; TAN, 2016). Essa interação previne a desfosforilação da STAT3 pela SHP-1, uma tirosina fosfatase que regula negativamente vias de sinalização, como a da STAT (ATIANAND; FITZGERALD, 2015).

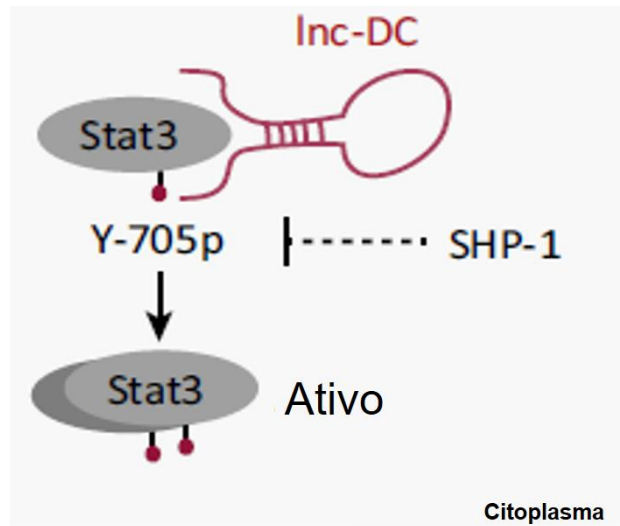


Figura 12. Representação esquemática da interação do lnc-DC com o fator de transcrição STAT3. Na porção C-terminal da STAT3 encontra-se o aminoácido Y-705 que é fosforilando e ativado. Ao mesmo tempo, lnc-DC e STAT3 impedem a desfosforilação da STAT3 pela tirosina fosfatase SHP-1 (Adaptado de ATIANAND; FITZGERALD, 2015).

3.3.2 GAPLINC

GAPLINC é um lncRNA envolvido com câncer gástrico, tendo seus níveis elevados em tecidos acometidos com essa doença e sua supressão pode alterar vias de migração celular. Além disso, GAPLINC está relacionado com o CD44, um receptor de adesão celular altamente expresso em vários tipos de cânceres e metástase (HU *et al.*, 2014).

Pouco se tem descrito sobre o lncRNA GAPLINC, mas sabe-se que ele utiliza a molécula CD44 como uma esponja molecular para o microRNA 211-3p, e aumenta a migração e invasão do tumor. Dessa forma, a expressão de CD44 é aumentada pois a molécula que a marcava para degradação, o miR-211-3p, é reduzida (LIU *et al.*, 2016).

De acordo com o banco de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org>), existem quatro lncRNAs transcritos pelo gene GAPLINC (ENSG00000266835), que se diferenciam pelo tamanho e quantidade de éxons (YATES *et al.*, 2016) (Figura 13).

Show/hide columns (1 hidden)		Filter					
Name ▲	Transcript ID ▲	bp ▲	Protein ▲	Biotype ▲	CCDS ▲	RefSeq ▲	Flags ▲
GAPLINC-201	ENST00000578664.1	440	No protein	lincRNA	-	-	TSL:3
GAPLINC-202	ENST00000579007.5	643	No protein	lincRNA	-	-	TSL:3 GENCODE basic
GAPLINC-203	ENST00000581029.5	613	No protein	lincRNA	-	-	TSL:3 GENCODE basic
GAPLINC-204	ENST00000581442.5	450	No protein	lincRNA	-	NR_110428 NR_110429	TSL:3

Figura 13. Isoformas dos lncRNAs transcritos pelo gene GAPLINC (201, 202, 203 e 204).

O lncRNA RP11-838N2.4 é uma das isoformas do GAPLINC (GAPLINC 202) e foi descrito primeiramente por Yanting Liu e colaboradores como uma importante molécula envolvida no aumento da eficiência do quimioterápico Temozolomide (TMZ) no tratamento de glioblastomas (GBM). Esse lncRNA pode aumentar a citotoxicidade do TMZ no GBM, além de funcionar como uma esponja de microRNA, suprimindo a função do miR-10, envolvido com apoptose, crescimento e proliferação tumoral. O lncRNA também aumenta a expressão da proteína EphA8, que por sua vez, leva a apoptose e intensifica a sensibilidade dos GBM para o TMZ. Os autores também observaram que o lncRNA RP11-838N2.4 inibe a atividade do fator TGF- β (LIU; XU; GUO, 2016).

3.4 lncRNAs e linfócitos T

Os linfócitos T possuem um papel central na regulação do sistema imune e, parte dessa função é realizada por lncRNAs. No timo, cada estágio de diferenciação das células T é caracterizado por um padrão singular de expressão de lncRNAs específicos (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015). A identificação desses lncRNAs e seus genes alvos que regulam os linfócitos T na sua diferenciação, é importante para o desenvolvimento de novas terapias para doenças autoimunes, alergias e câncer (PAGANI *et al.*, 2013). lncRNAs que

regulam os linfócitos T e sua diferenciação por meio da modulação da transcrição gênica e com mecanismos próprios, serão descritos a seguir.

NRON é um lncRNA que inativa o fator de transcrição NFAT em condições normais do organismo. Esse fator de transcrição é cálcio dependente e controla a produção de IL-2 em células T ativadas. Nas células que ainda não foram ativadas, o NFAT fica inativo, fosforilado. (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017). Em resposta ao aumento de Ca^{2+} intracelular, a enzima calcineurina desfosforila o fator NFAT, permitindo sua translocação para o núcleo, onde vai ativar a transcrição de genes alvo, como a IL-2 (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015) (**Figura 14**).

O lncRNA NRON faz parte de um complexo protéico que mantém o fator NFAT (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T Cells*), importante mediador da ativação de células T, fosforilado e assim interfere na translocação desse fator de transcrição, que é retido no citoplasma. NRON é essencial para manter a estrutura desse complexo protéico (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017; AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015). Sem o lncRNA, o complexo não é formado, o NFAT é desfosforilado e encaminhado para o núcleo onde realiza seu papel de fator de transcrição, ativando genes alvos (GENG; TAN, 2016).

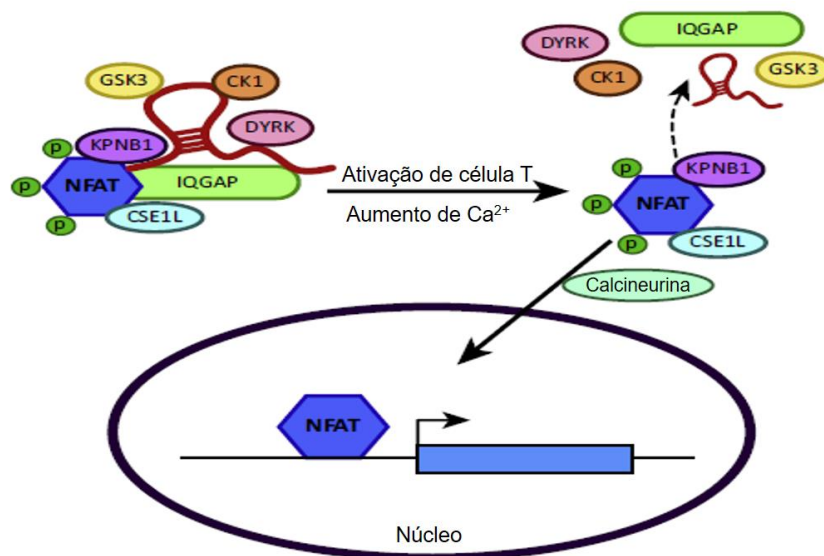


Figura 14. Representação esquemática do mecanismo de ação do lncRNA NRON. NRON se associa com um complexo protéico para manter o fator de transcrição NFAT (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T Cells*) que é fosforilado e inativado (Adaptado de HEWARD; LINDSAY, 2014).

NeST, também conhecido como IFNG-AS1 ou Tmevpg1, é um lncRNA que regula a diferenciação dos linfócitos T no subtipo Th1 e por isso é dependente da expressão dos fatores de transcrição T-bet e STAT4. Esse lncRNA é transcrito na orientação antisense do gene que codifica o IFN γ e é expresso nos linfócitos T CD4⁺ Th1, T CD8⁺ e células natural killer (NK), (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017) **(Figura 15)**.

O complexo da histona H3K4 metiltransferase possui uma subunidade conhecida como WDR5, na qual o lncRNA NeST se liga. Com essa associação, esse complexo protéico altera por mecanismos epigenéticos, a metilação do *locus* do gene IFN γ , regulando a sua expressão (GENG; TAN, 2016). A presença dos fatores de transcrição T-bet e STAT4 são essenciais para a expressão de IFN γ , uma vez que sozinho o lncRNA NeST não consegue realizar essa função (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

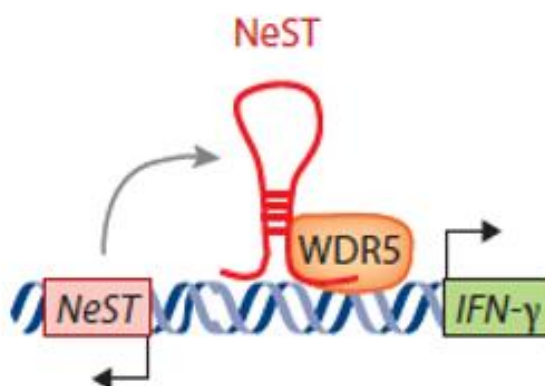


Figura 15. Representação esquemática da ação do lncRNA NeST. NeST interage com a subunidade da histona H3K4, WDR5 e regula a expressão do gene IFN γ por mecanismos epigenéticos (Adaptado de ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

Um outro lncRNA envolvido na diferenciação de células T na linhagem Th1, é o RNA intergênico longo não codificador MAF-4 (linc-MAF-4). O gene MAF-4 codifica um fator de transcrição que promove a expressão de genes que codificam citocinas específicas da linhagem Th2 de linfócitos T CD4⁺ (RANZANI *et al.*, 2015) **(Figura 16)**.

Linc-MAF-4 reprime a expressão do gene MAF, que por sua vez, interrompe a diferenciação das células T em Th2 e promove a diferenciação da linhagem Th1. Tanto o non coding como o gene MAF estão próximos no cromossomo, o que facilita a ação do linc-MAF-4 em *cis* para regular a expressão

do gene (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017). O linc-MAF-4 se associa com modificadores de cromatina, como o LSD1 e EZH2, para facilitar a trimetilação de marcadores de histona H3K27 no promotor do gene MAF, com a formação de um looping na cromatina, e assim silenciar a sua expressão em células Th1 (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015).

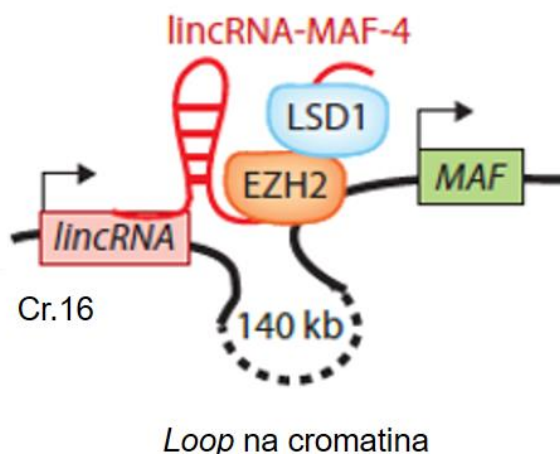


Figura 16. Representação esquemática da ação do lincRNA MAF-4. O lincRNA-MAF-4, localizado no cromossomo 16, silencia a expressão do gene MAF (associado com a polarização Th2) e leva à diferenciação das células T CD4⁺ para a linhagem Th1, estabilizando um *loop* na cromatina para recrutar os fatores PRC2, EZH2 e LSD1 para o locus gênico (Adaptado de ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

O subtipo Th2 dos linfócitos T CD4⁺ pode ser regulado por alguns lincRNAs como o Th2LCRR e o lincR-Ccr2-5'. O lincRNA Th2LCRR é coexpresso com as citocinas características dessa polarização: IL-4, IL-5, IL-13 e é transcrito no sentido antisenso do gene RAD50 (SPURLOCK *et al.*, 2015). Esse lincRNA se liga ao componente WDR5 do complexo da histona H3K4 metiltransferase para manter os marcadores dessa proteína nos promotores dos genes que codificam as interleucinas IL-4, IL-13, IL-15 e com isso regular a polarização das células T (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015).

O lincR-Ccr2-5' AS é transcrito na direção antisenso do gene Ccr2 e controla a expressão de genes relacionados com a resposta do subtipo Th2 (ATIANAND; FITZGERALD, 2015). O nocaute desse lincRNA altera de forma negativa a expressão de genes de quimiocinas como o Ccr1, 2, 3 e 5, que estão localizados no mesmo *loci* genômico que o non coding intergênico Ccr2-5' AS (HEWARD; LINDSAY, 2014).

Os linfócitos T que se diferenciam no subtipo Th17 estão envolvidos com a patogênese de doenças autoimunes e exercem um papel importante na defesa

de patógenos extracelulares (DONG, 2008). O fator de transcrição responsável por essa diferenciação, juntamente com as citocinas IL-6 e TGF- β é o ROR γ t. Esse gene pode ser ativado pela DEAD box RNA helicase DDX5, molécula importante no desdobramento de RNAs, e associados, coordenam a transcrição de genes envolvidos na resposta Th17 (ATIANAND; CAFFREY; FITZGERALD, 2017).

A interação do fator ROR γ t com a DDX5 requer o lncRNA RMRP (do inglês, *RNA component of the Mitochondrial RNase complex*), que está localizado no núcleo. Esse complexo DDX5-RMRP é essencial para regular a função efetora do ROR γ t em diversos genes específicos da linhagem Th17. O lncRNA age em *trans* nos genes dependentes desse fator de transcrição, com a ajuda da helicase DDX5 (HUANG *et al.*, 2015).

A descoberta desse complexo RMRP-DDX5 na regulação do ROR γ t mostra dois fatores importantes: a complexidade nas células Th17 e a possibilidade de outras células imunes utilizarem a associação de ncRNAs com helicases de RNA para controlar a expressão gênica (ELLING; CHAN; FITZGERALD, 2016).

Alguns lncRNAs não são exclusivos dos linfócitos T, porém suas funções influenciam o desenvolvimento e ativação dessas células, como os lncRNAs CD244 e o Fas-AS1. O receptor coestimulatório CD244 regula algumas funções das células natural killer (NK), está presente em células T CD8⁺ e sua sinalização persistente está associada com algumas infecções virais humanas, como Hepatite B e C (WANG *et al.*, 2015).

Na tuberculose, esse receptor está envolvido com a inibição da expressão de citocinas como IFN- γ e TNF- α (protegem o hospedeiro contra a doença), pois induz a expressão do lncRNA-CD244. Este, cuja expressão é estimulada pela molécula CD244, regula por mecanismos epigenéticos a repressão dos genes IFNG e TFN. Esse lncRNA pode ser um importante alvo para intervenção terapêutica na tuberculose (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Fas é uma proteína membro da superfamília dos receptores de necrose tumoral e está envolvida na via de apoptose. É ativada pelo seu ligante FasL, que desencadeia uma cascata de eventos que culminam na apoptose. O receptor de Fas é expresso em diversos tecidos, células tumorais, linfócitos B e

T (SEHGAL *et al.*, 2014). O lncRNA Fas-AS1 está envolvido na via de apoptose, e controla a síntese de Fas e sFas, que é a forma solúvel dessa proteína. Quando sFas se liga a FasL, ela inibe a apoptose que ocorre pela ativação de Fas-FasL (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2015).

4. Regulação da expressão gênica por anticorpos anti-CD3

Em pesquisas realizadas anteriormente pelo Grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília - UnB, foi analisado o perfil imunorregulatório de linfócitos T tratados com os anticorpos OKT3, sua versão humanizada FvFcR e a versão quimérica FvFcM.

Nesse contexto, Silva *et al.* (2009) observaram que o anticorpo FvFcR induzia um perfil de citocinas anti-inflamatórias com expressão tardia do fator FOXP3 quando comparado ao OKT3, que apresentou uma expressão transiente. Além disso, eles também descrevem que o FvFcR tem uma expressão diminuída de IFN- γ e aumentada de IL-10 em relação ao OKT3. Esses e outros dados sugerem que o anticorpo humanizado pode induzir um microambiente anti-inflamatório, o que pode favorecer o desenvolvimento de condições imunorregulatórias pela ativação de mecanismos supressores a partir da citocina IL-10.

De acordo com os dados obtidos por Bezerra M.A.G. (2014), quando as versões FvFcR e FvFcM foram comparadas, a humanizada apresentou menor mitogenicidade em células T CD4⁺ e CD8⁺ e ambas as versões induziram o aumento da expressão do gene Fas nessas populações de células T. Além disso, dentro das populações CD4⁺ e CD8⁺, esses anticorpos aumentaram o número de células positivas para alguns marcadores de linfócitos T regulatórios (CD25, GARP e CTLA-4). A versão humanizada FvFcR foi a que revelou o maior aumento de células CD25⁺ GARP⁺, sugerindo a indução de um fenótipo imunorregulatório.

Para uma melhor caracterização do tratamento com os anticorpos anti-CD3 em linfócitos T, Simi K.C.R. (2014) realizou um sequenciamento de alto desempenho para a obtenção de dados necessários para desenvolver um conhecimento sobre o perfil transcricional dessas células. Pela análise dos dados do RNAseq foi possível identificar vários genes envolvidos na

imunorregulação e fenótipo de célula T regulatória, onde o anticorpo FvFcR apresentou um perfil similar ao OKT3.

Com o avanço dos estudos sobre RNAs não codificadores e sua importância na regulação de linfócitos T, Sousa *et al.* (2017) caracterizou as alterações induzidas pelos anticorpos anti-CD3 a nível de expressão de microRNAs em linfócitos T humanos. Foram validados 31 microRNAs em populações de células Th17 e Treg, envolvidos com vias imunorregulatórias. A versão humanizada FvFcR aumentou a expressão de miRNAs que regulam a expressão de FOXP3, o que sugere uma diferenciação em células T regulatórias.

Os dados obtidos pelos trabalhos anteriores, sugerem a existência de uma indução de células T reguladoras promovida pela ação desses anticorpos. Porém, ainda é necessária uma caracterização mais precisa dos efeitos dos anticorpos anti-CD3 humanizados na diferenciação de linfócitos T e na expressão diferencial de moléculas como os lncRNAs. Estes por sua vez, tem se mostrado envolvidos em várias vias relacionadas a linfócitos T regulatórios, característica que os tornam alvos interessantes de estudo quando analisada a resposta dessas moléculas aos anticorpos anti-CD3.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

De maneira geral, os lncRNAs podem afetar a diferenciação, modulação e regulação celular, interagindo com moléculas ou cromatina e regulando-as a níveis transcricionais, pós transcricionais ou epigenéticos por meio de diversos mecanismos moleculares. Sabe-se também que os lncRNAs desempenham papéis importantes nos linfócitos T, participando do seu desenvolvimento e diferenciação dos seus subtipos celulares.

Com isso, se faz necessária a caracterização da atividade transcricional dos lncRNAs em linfócitos T com ou sem a estimulação de anticorpos anti-CD3 humano. Tal caracterização pode aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de ação desenvolvidos pelos anticorpos anti-CD3, que podem ter aplicações terapêuticas, além de reconhecer o papel dos lncRNAs como importantes biomarcadores.

OBJETIVO

Identificar lncRNAs diferencialmente expressos em linfócitos T quando tratados com anticorpos anti-CD3, por meio da amplificação, clonagem e sequenciamento desses transcritos, bem como determinar e confirmar seus níveis de expressão por PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Iniciadores sintetizados

Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) e diluídos para 100µM em água Mili-Q.

A **Tabela 1** mostra as sequências de cada um dos iniciadores, onde os números entre parênteses representam os seus transcritos específicos para facilitar sua visualização e descrição no texto.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores escolhidos para cada lncRNA.

lncRNA	Transcritos	Número de éxons totais	Sequências
RP11-838N2.4	TCONS_00018843 (1)	3	5' - CTTCTCTGCGTTCACACACA - 3' 3' - ACCACATAATCCTCAGGTATGGA - 5'
	TCONS_00018846 (2)	2	5' - GCAGAGCTTGATCCAGAGGT - 3' 3' - AATCAGGGCTCTTGGACTCC - 5'
CTD-2319I12.1	TCONS_00018307 (3)	5	5' - CCAAGACCTGAGCCCTGTAA - 3' 3' - CTTCCCTGCCTCCCATATCC - 5'
	LOC645638 (4)	3	5' - TCCTCCTCCTGTGATCCTCA - 3' 3' - CCAGGAAGGGATGACGATCT - 5'
COL4A2-AS2	TCONS_00011352 (5)	4	5' - TTTTCATCTCACACAGCTGGC - 3' 3' - CCTGCATCTGTGGTTGTCTC - 5'
	COL4A2-AS2 (6)	5	5' - GAGAGAGGCAGGGACAGATC - 3' 3' - CCTGCATCTGTGGTTGTCTC - 5'
LINC00861	TCONS_00038502 (7)	6	5' - CTCTTGCGCTTATCAACCCT - 3' 3' - TCCCTTTCCTGTAGACTGTGA - 5'
	TCONS_00038503 (8)	6	5' - TCTCCATGAGCTCCTATGGC - 3' 3' - AACCTATGTCTCCCCTTGC - 5'
	TCONS_00038504 (9)	3	5' - ACTCGGCCATCTCCTACTTG - 3' 3' - ATTGCAATAGGAGTGGGGCA - 5'
	LINC00861 (10)	2	5' - TGAGTGGGCATCTGTTCTCA - 3' 3' - ACTGGGTGAAGAAAGCAGGA - 5'

2. Meios de cultura e soluções para bactérias

Todos os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microorganismos foram confeccionados com água destilada e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos a 1 ATM.

2.1 Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

pH 7,0.

2.2 Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

3. Antibióticos

3.1 Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm, estocada a -20° C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção para plasmídios transformados em células de *E. coli*.

3.2 Tetraciclina

A tetraciclina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20° C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado para a semeadura e manutenção de células *E. coli* das linhagens XL1-blue, que possuem o gene de resistência a esse antibiótico.

4. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana

4.1 Solução de CaCl₂

CaCl₂ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4° C

4.2 Solução IPTG 0,1M

IPTG 1,226 g

H₂O para um volume final de 50mL. Esterilizar por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm e estocar a 4°C.

4.3 Solução X-gal (2mL)

X-gal 100mg

Dissolver em 2mL de Dimetilformamida

5. Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio 3 M

Ácido Acético 2 M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

RNase A

RNase A (Invitrogen®, no de catálogo 12091-021).

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6 1 v
Clorofórmio 1 v
B-hidroxiquinilona 0,05% (p/v)
Equilibrado com 0,1 v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6

Clorofil

Clorofórmio 24 v
Álcool isoamílico 1 v
Equilibrado com 0,25 v de tampão TE

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Acetato de sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

6. Tampão de corrida para gel de eletroforese

6.1 Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 10X

Tris-Acetato 40 mM
EDTA 1 mM
pH ajustado para 8,5

6.2 Tampão de Amostra (10X) para análise de DNA por eletroforese

TAE 20X 50 % (v/v)
Glicerol 30% (v/v)
Azul de Bromofenol 0,25 % (p/v)

6.3 Marcador de massa molecular para DNA

1 Kb Plus ladder (Invitrogen)

7. Kits comerciais

SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)

Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen)

Pgem-T Easy Vector System I (Promega)

QIAquick PCR Purification (QIAGEN)

8. Tampões de Endonucleases de Restrição

NEBuffer 3 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 150 mM

MgCl₂ 10 mM

NaCl 100 mM

DTT 1 mM

9. Endonucleases de restrição

9.1 New England Biolabs

Nco I (10U/μL)

Not I (10U/μL)

MÉTODOS

Os métodos resumidos a seguir foram realizados em um trabalho anterior (SIMI, 2014) cujos dados foram essenciais para a realização do presente trabalho.

O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado e a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizada por gradiente de densidade com Ficoll-Paque Plus (GE). Essas células ficaram em cultura na presença ou ausência dos anticorpos anti-CD3 (anti-CD3ε Muromonab-CD3 - OKT3, o humanizado FvFcR e a quimera FvFcM), após 72 horas, as células T CD3⁺ foram enriquecidas por seleção negativa utilizando beads magnéticas. O método de seleção negativa nesse experimento, consiste na marcação e separação de populações de células mononucleares que compõe o sangue periférico, com exceção dos linfócitos T CD3⁺, para evitar que esses linfócitos sofram uma estimulação. O RNA total dos linfócitos T isolados de dois doadores foi extraído e enviado para sequenciamento.

Essa dissertação foi inspirada e baseada a partir desses dados de RNAseq.

1. Identificação dos lncRNAs utilizando o *Cufflinks*

Para a escolha dos lncRNAs foram utilizados os seguintes critérios a partir da análise com o pacote do *Cufflinks* (TRAPNELL *et al*, 2010): diferencialmente expressos pelo tratamento com os anticorpos OKT3, FvFcR e FvFcM (fold change >2); valores de expressão significativo (p-value ≥ 0,05) e *locus* não codificador de proteínas.

Cada locus não codificador de proteínas e diferencialmente expresso detectado com o *Cufflinks*, foi analisado manualmente utilizando o visualizados IGV. Vários candidatos foram descartados principalmente quanto a baixa cobertura (número de reads que suportavam o modelo). Os dados utilizados nessa análise estão disponíveis em <http://silo.bioinf.uni-leipzig.de/gero/kelly/>

2. Síntese de Iniciadores

Iniciadores foram desenhados para as moléculas de interesse e sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) (**Tabela 1**).

3. Síntese das moléculas de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído de linfócitos T de 6 doadores, tratados com os anticorpos anti-CD3 (SIMI, 2014) com o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), seguindo as orientações do fabricante.

4. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para amplificar o cDNA, os sistemas de PCR foram montados para um volume final de 50µl e com os seguintes componentes: aproximadamente ~200ng de cDNA; 0,2µM de cada primer; 0,2Mm da solução de dNTPs; tampão de PCR para uma concentração final de 1x; cloreto de magnésio (na concentração ótima para cada primer) e Taq DNA Polimerase 1U (Platinum Taq DNA Polimerase – Invitrogen).

Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems). A amplificação foi executada por 35 ciclos onde o DNA foi desnaturado a 94 °C por 30 segundos, anelado a temperatura ideal para cada par de oligonucleotídeo por 30 segundos e alongado a 72 °C por 1 minuto.

5. Análise e eluição de fragmentos de DNA em gel de agarose

A agarose foi preparada numa concentração de 0,8% em tampão TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram aplicadas com o tampão de amostra azul de bromofenol 6x e submetidas à eletroforese, como descrito por (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). A visualização do DNA foi realizada pelo transluminador E-Gel Imager (Invitrogen).

Após análise do gel, os fragmentos de DNA de interesse foram cortados e a eluição realizada com o filtro de centrifugação Ultrafree DA (Millipore), conforme as determinações do fabricante.

As quantificações das amostras de DNA foram realizadas no espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Scientific).

6. Ligação dos fragmentos de lncRNAs no vetor (vetor-inserto)

O vetor utilizado para clonagem foi o pGEM-T System I (Promega) que apresenta 3kb de tamanho e possui o gene de resistência a ampicilina. O protocolo de ligação seguiu as orientações do fabricante.

7. Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico (CaCl₂)

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) com modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM estéril e gelado. Em seguida as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB ágar e incubadas a 37°C durante a noite.

8. Transformação de *E. coli* (XLIBLue) por choque térmico (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Uma alíquota de célula termocompetente previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. Em seguida, foram adicionados 10 µL do sistema de ligação às células e estas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 3 minutos e incubadas novamente no gelo por 2 minutos. Posteriormente foram adicionados 900 µL de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 hora sob agitação. Em seguida, as células foram semeadas em placas contendo meio LB-ágar, X-Gal (80µg/mL), IPTG (0,5mM) e o antibiótico ampicilina (200µg/mL) e incubadas a 37 °C durante a noite.

9. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (método por lise alcalina - adaptado de De-Sousa *et al.*, 2016)

Foi inoculado uma colônia de bactéria em 5 mL de meio LB, contendo ampicilina 200 µg/mL e incubado por aproximadamente 16 a 18 horas a 200 rpm a 37 °C. A suspensão bacteriana foi centrifugada (5000 rpm por 2 minutos), o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 200µL de solução I (Tris-HCl 25Mm e EDTA 10mM) e incubado por 5 minutos no gelo. Em seguida, foram adicionados 400µL da mistura da solução II (NaOH 0,2M e SDS 1%) e a homogeneização se deu por inversão do tubo; foi adicionado 300µL de uma solução III (acetato de potássio 5M e ácido acético glacial) e incubado no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo, acrescentou-se 10µL de RNase (10mg/ml) e a mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Foi adicionada a solução de fenol/clorofórmio e as proteínas extraídas por vortex por 2 minutos. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo e acrescentou-se 300µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Após agitação em vortex por 1 minuto, centrifugou-se por 10000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo. Foram adicionados 2,5v de etanol absoluto gelado e 1µL da solução GlycoBlue Coprecipitant (Applied Biosystems) a 50µg/ml de e incubados a -20°C por 16 horas.

Centrifugou-se a 12000 rpm por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200µL de etanol 70% gelado e a mistura centrifugada por 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e esperou-se até que o pellet secasse para que fosse ressuscitado em 30µL de H₂O.

10. Digestão do DNA plasmidial

A digestão do plasmídeo pGEM-T foi realizada utilizando as enzimas *Nco* I e *Not* I, de acordo com as instruções do fabricante.

11. Purificação de DNA

As amostras foram purificadas utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

12. Preparo das amostras para sequenciamento e análise das sequências

As amostras purificadas foram aliqüotadas seguindo as recomendações da empresa Helixxa (Paulínia-SP), que realizou o sequenciamento utilizando a metodologia Sanger.

A qualidade das sequências obtidas na reação de sequenciamento bidirecional foi analisada utilizando-se as ferramentas de bioinformática: PHRED; Cross-match e CAP3, disponíveis na página: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Após a análise de qualidade, as seqüências que apresentaram qualidade igual ou superior a PHRED ≥ 20 e tamanho ≥ 100 nucleotídeos, foram analisadas pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), contra a base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e o programa BioEdit Sequence Aligment Editor (HALL, 2007).

13. Ensaio de RT-qPCR

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com o RNA total de 5 doadores, em triplicata, utilizando o equipamento ABI Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para calcular os níveis dos transcritos de lncRNA (fold change). Para a análise dos dados obtidos, foi utilizado o software RT² Profiler PCR Array Data Analysis (SABiosciences) (BIOSYSTEMS, 2001). Para a normalização de cada amostra foi realizada uma subtração da média dos valores Ct (*cycle threshold*) das amostras tratadas e não tratadas. O p-value foi calculado baseado no método estatístico Student's t. As figuras das análises foram obtidas utilizando o programa GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados utilizados como base para o desenvolvimento desse trabalho foram publicados por SIMI, 2014 em sua Tese de Doutorado pela Universidade de Brasília.

1. Seleção e identificação dos lncRNAs

Utilizando a ferramenta de predição de transcritos, Cufflinks, foram selecionados 4 lncRNAs que perfaziam os critérios para a descoberta de lncRNA e que apresentaram uma expressão diferencial em linfócitos T após os tratamentos com os anticorpos OKT3 e FvFcR. O anticorpo FvFcM não foi representado por não ter apresentado relevância estatística. Esses lncRNAs foram significativamente expressos, não codificavam proteínas e estavam menos expressos quando tratados com os anticorpos OKT3 e FvFcR (**Tabela 2 e Figura 17**).

Tabela 2. lncRNAs selecionados após análise dos dados de RNAseq utilizando o pacote Cufflinks

<i>LOCUS</i>	FOLD CHANGE (OKT3)	FOLD CHANGE (FvFcR)	lncRNA
chr18:3466252-3478967	-6.6219	-3.44962	RP11-838N2.4
chr17:58160920-58169276	-4.14345	-2.11776	CTD-2319I12.1
chr13:111108978-111115621	-7.25039	-2.1614	COL4A2-AS2
chr8:126921449-26963476	-7.27638	-4.15215	LINC00861

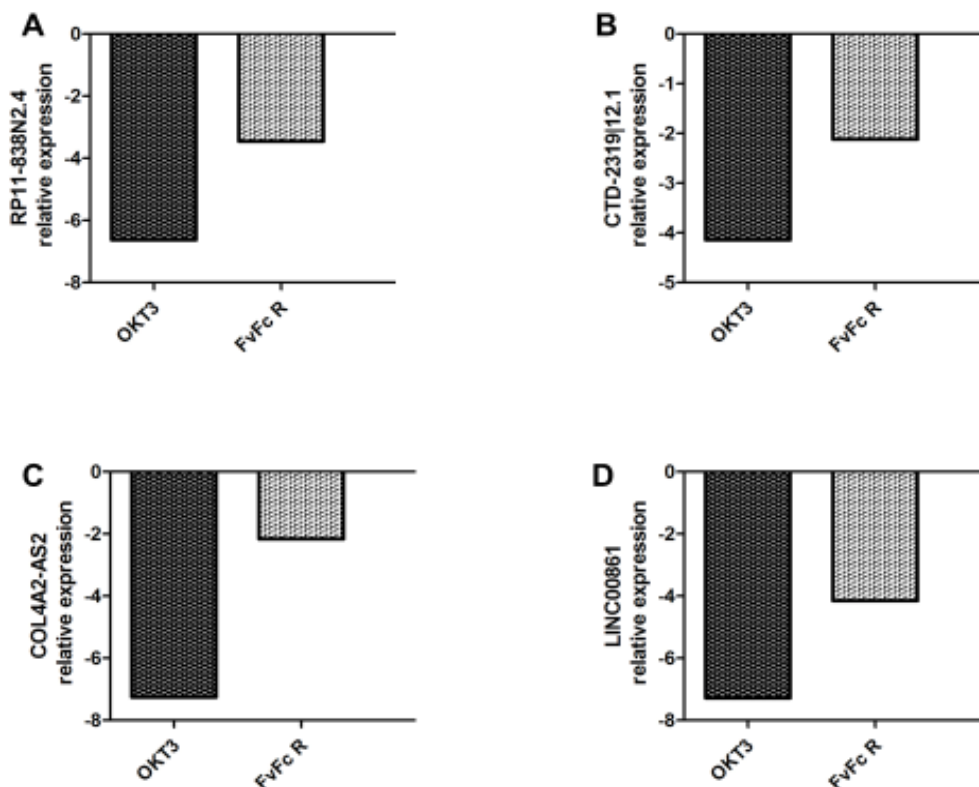


Figura 17. Expressão relativa dos lncRNAs determinada por RNAseq. Os lncRNAs foram tratados com os anticorpos OKT3 e FvFcR e selecionados utilizando a ferramenta de predição de transcritos Cufflinks. A- lncRNA RP11-838N2.4; B- CTD-2319|12.1; C- COL4A2-AS2; D- LINC00861.8.

Os lncRNAs selecionados foram analisados utilizando a plataforma UCSC Genome Bioinformatics (Universidade da Califórnia, <http://genome.ucsc.edu/>) que compara os transcritos obtidos a partir do RNAseq com diversos bancos de dados que apresentam sequências similares (**Figuras 18 a 21**).

A partir dos resultados obtidos por essa análise, foram desenhados *primers* para anelamento na região dos éxons das sequências de interesse (**Tabela 1**), com o intuito de obter os lncRNAs preditos pelo Cufflinks e novas moléculas observadas a partir dos transcritos do RNAseq.

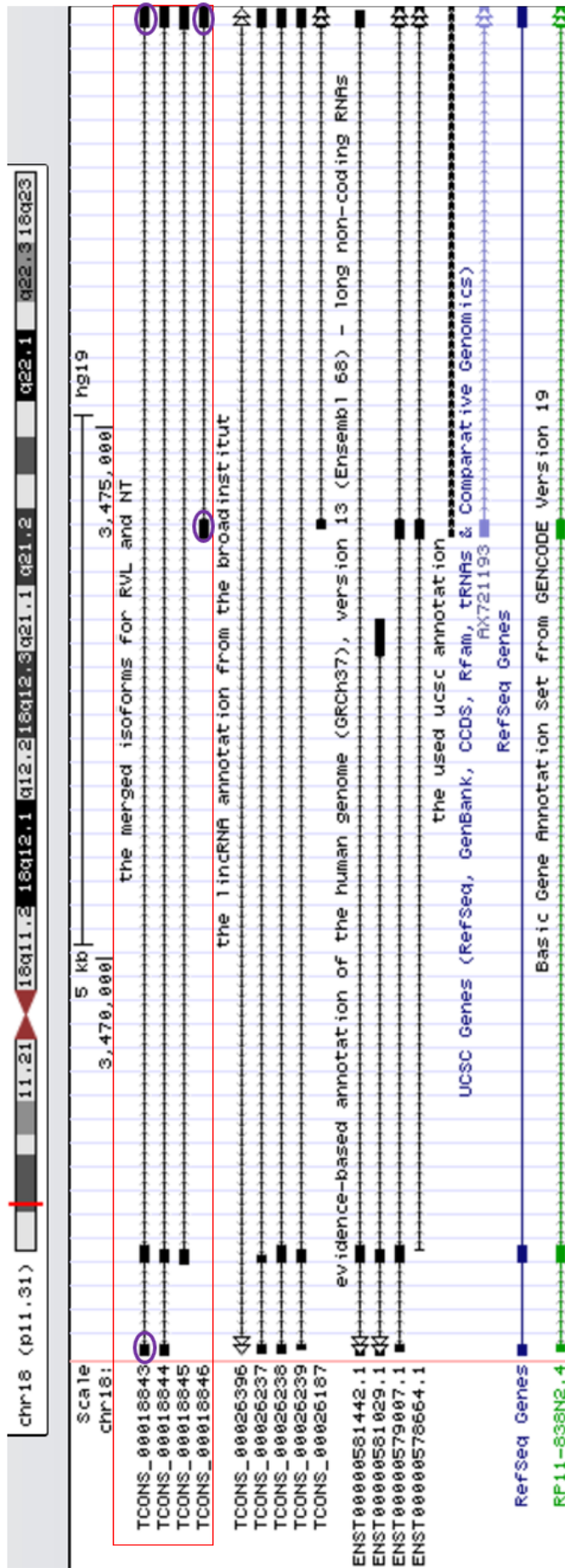


Figura 18. Mapeamento das reads no gene **lincRNA RP11-838N2.4**, localizado no cromossomo 18 humano. Em cada isoforma, representa o centrômero do cromossomo; a localização do gene no cromossomo; éxons; região intrônica; transcritos do RNAseq; éxons para os quais foram desenhados iniciadores.

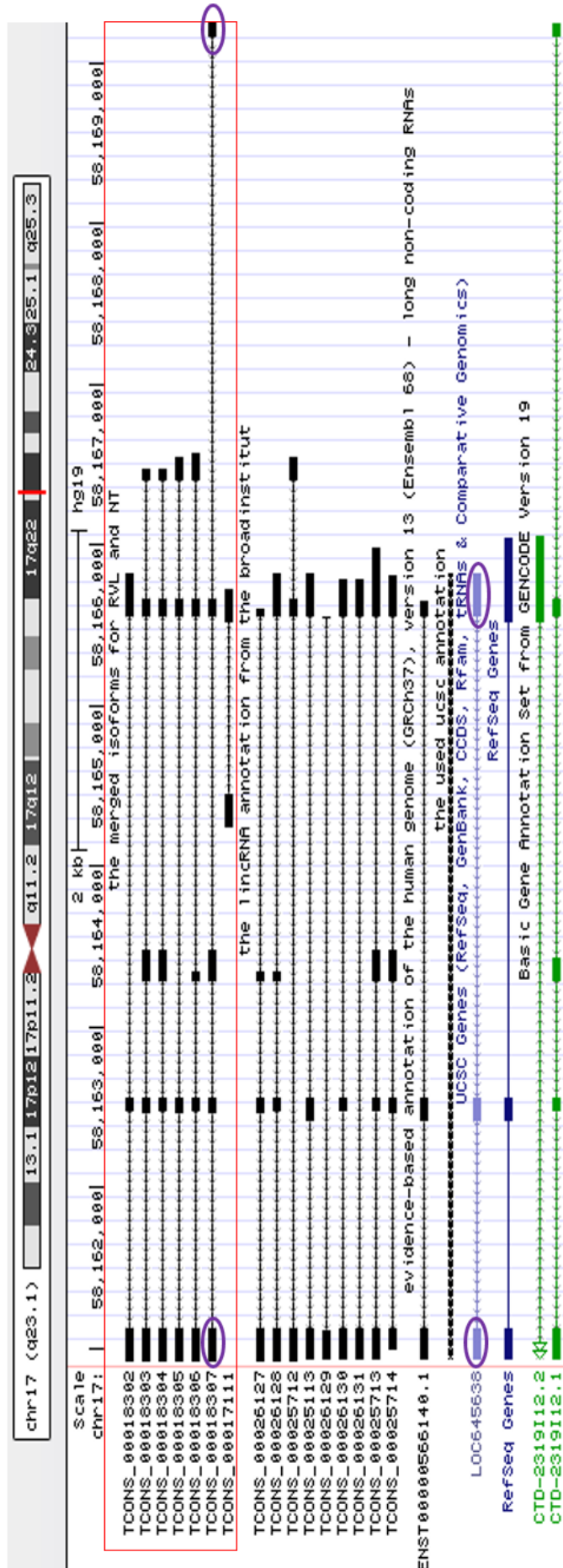


Figura 19. Mapeamento das reads no gene **lincRNA CTD-2319112**, localizado no cromossomo 18 humano. Em cada isoforma, representa o centrômero do cromossomo; a localização do gene no cromossomo; éxons; região intrônica; transcritos do RNAseq; éxons para os quais foram desenhados iniciadores.

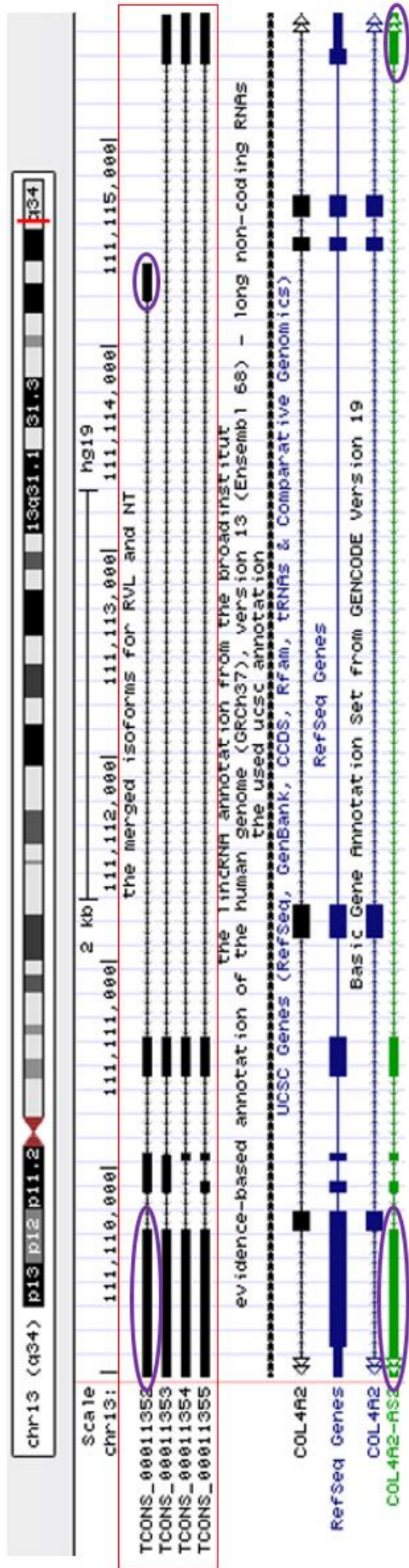


Figura 20. Mapeamento das reads no gene **lncRNA COL4A2-AS2**, localizado no cromossomo 18 humano. Em cada isoforma,  representa o centrômero do cromossomo; a  localização do gene no cromossomo;  éxons;  região intrônica;  transcritos do RNAseq;  éxons para os quais foram desenhados iniciadores.

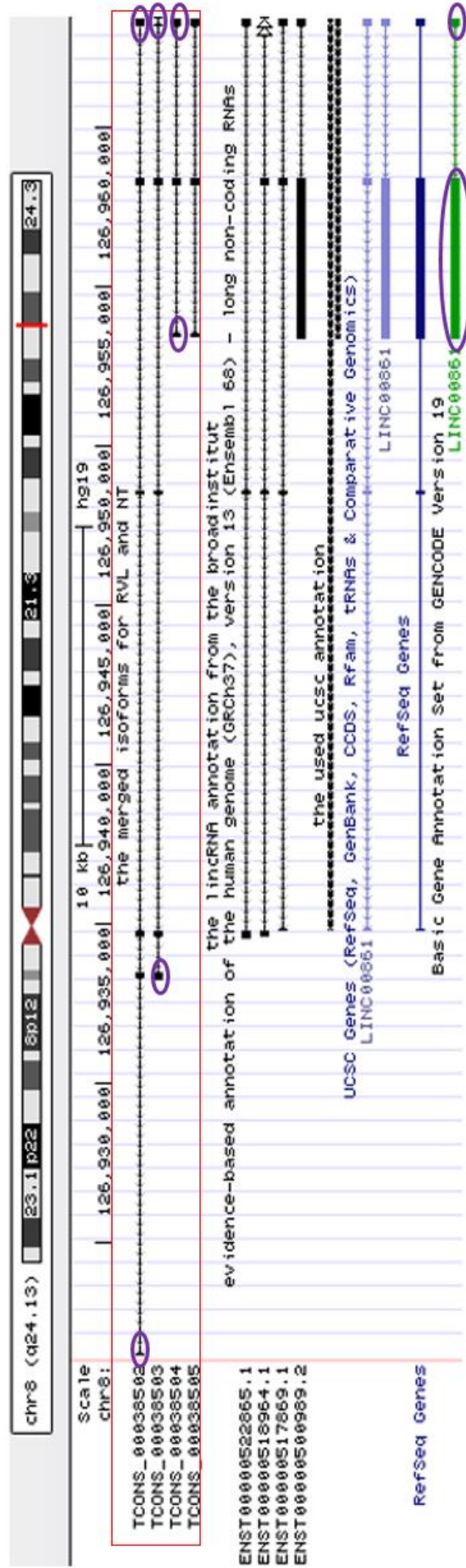




Figura 21. Mapeamento das reads no gene **lincRNA LINC00861**, localizado no cromossomo 18 humano. Em cada isoforma,  representa o centrômero do cromossomo;  a localização do gene no cromossomo;  éxons;  transcritos do RNAseq;  transcritos para os quais foram desenhados iniciadores.

2. IncRNA RP11-838N2.4

2.1 Clonagem e sequenciamento dos IncRNAs

Os amplicons dos IncRNAs foram obtidos por PCR e possuem entre 275 e 325 pb (**Figura 22**). A melhor temperatura de anelamento para os iniciadores desenhados para o transcrito TCONS_00018843, foi de 51°C e a concentração ideal de MgCl₂ foi de 2mM.

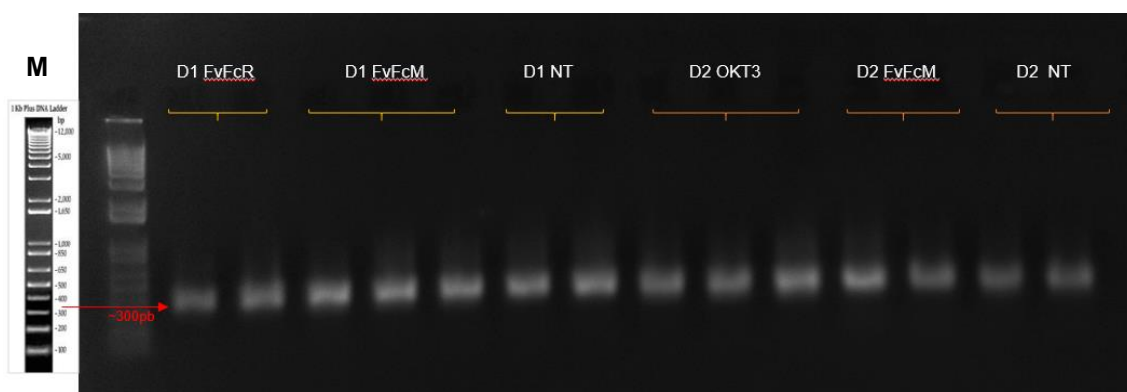


Figura 22. Amplificação de fragmentos correspondentes ao IncRNA RP11-838N2.4 por PCR. Os amplicons, indicados pela seta vermelha e com tamanho de ~300 pb, foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3% ug/mL). **D1** e **D2** representam os doadores e **FvFcR**, **FvFcM** e **OKT3**, os anticorpos. **NT** representa as amostras que não receberam tratamento. **M** - Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a amplificação, procedeu-se a clonagem em vetor *pGEM-T Easy Vector*. Para a obtenção de uma quantidade e qualidade suficiente de material para posterior sequenciamento. Os vetores foram transformados em células competentes, extraído o DNA plasmidial, digeridos com as enzimas *Nco I* e *Not I* para confirmação da clonagem (**Figura 23**) e enviados para sequenciamento na empresa Helixxa (SP).

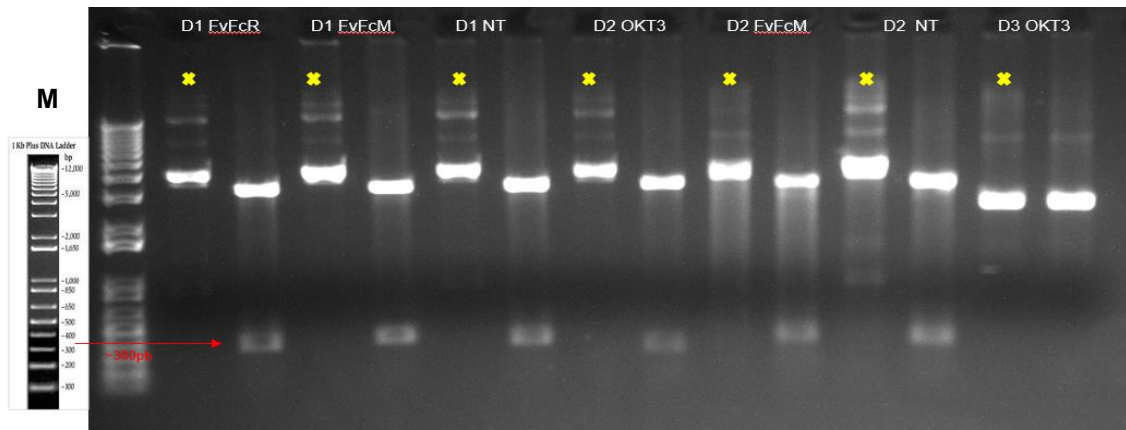


Figura 23. Análise de restrição para a confirmação da construção dos vetores contendo os fragmentos de lncRNA em vetor pGEM-T easy. A digestão de DNA plasmidial foi analisada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3% ug/mL). A seta vermelha representa a amplificação do fragmento correspondente ao lncRNA, com um tamanho aproximado de ~300 pb. **D1**, **D2** e **D3** representam os doadores e **FvFcR**, **FvFcM** e **OKT3**, os anticorpos. **NT** representa as amostras que não receberam tratamento. O (*) representa os plasmídeos intactos. **M** - Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Do total de 18 amostras amplificadas com os iniciadores para o transcrito TCONS_00018843 **(1)**, 12 foram enviadas para o sequenciamento e apenas 11 seqüências de qualidade foram obtidas (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100nt), correspondente a 61% do total das seqüências geradas. Estas seqüências se distribuem em: **D1** – NT, FvFcR e FvFcM; **D2** – NT, OKT3, FvFcR e FvFcM; **D3** - NT, OKT3, FvFcR e FvFcM.

Os amplicons correspondentes aos lncRNAs obtidos com os iniciadores desenhados para o transcrito TCONS_00018846 **(2)** possuíam entre 275 e 325 pb **(Figura 24)**, sendo a melhor temperatura de anelamento para os iniciadores de 52°C com a concentração ideal de MgCl₂ de 2mM.

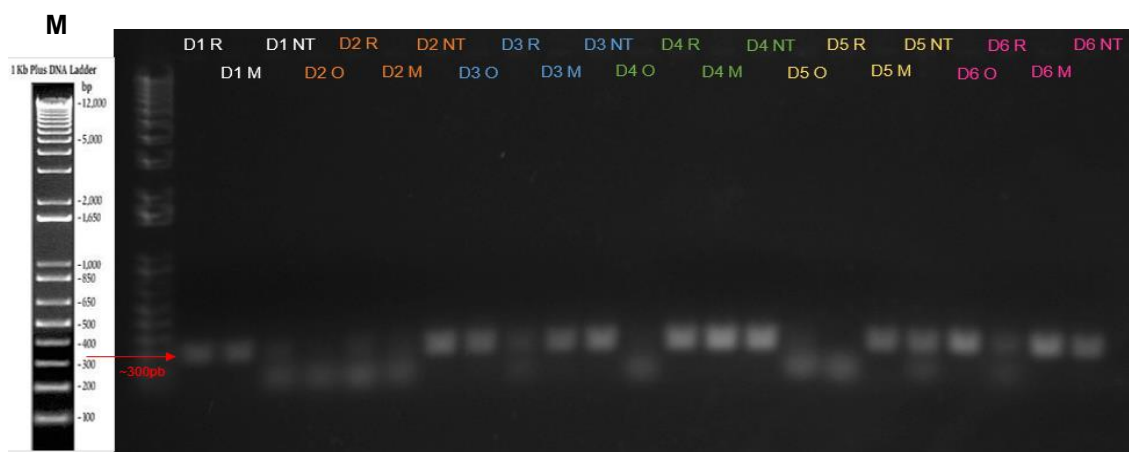


Figura 24. Amplificação de fragmentos correspondentes ao IncRNA RP11-838N2.4 por PCR. Os amplicons, indicados pela seta vermelha e com tamanho de ~300 pb, foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3% ug/mL). **D1, D2, D3, D4, D5 e D6** representam os doadores e **O, R e M** representam os anticorpos **OKT3, FvFcR e FvFcM**. **NT** representa as amostras que não receberam tratamento. **M** - Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a amplificação, procedeu-se a clonagem em vetor pGEM-T Easy Vector e transformação em células competentes *E.coli* XLIBLue. Extraído o DNA plasmidial, este foi enviado para sequenciamento. Um total de 8 amostras foram enviadas e obtiveram seqüências de qualidade (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100nt). Estas seqüências se distribuem em: **D2 – NT, OKT3, FvFcR, FvFcM; D4 – NT, OKT3, FvFcR e FvFcM.**

Pela análise dos dados obtidos pelo sequenciamento, foi possível constatar uma grande identidade entre os IncRNAs analisados. Utilizando os iniciadores desenhados para amplificar a seqüência correspondente ao IncRNA RP11-838N2.4 (**1**), foi identificada uma segunda seqüência descrita como IncRNA GAPLINC-204. Esse IncRNA possui duas variantes (1 e 2) que entre elas possuem 100% de cobertura e 95% de identidade. Quando se compara os amplicons obtidos nesse trabalho com as seqüências da variante 1 do GAPLINC-204, observa-se 100% de cobertura e identidade (**Figura 25**). Já quando os amplicons são comparados com a variante 2, essa análise apresenta 100% de cobertura e 91% de identidade.

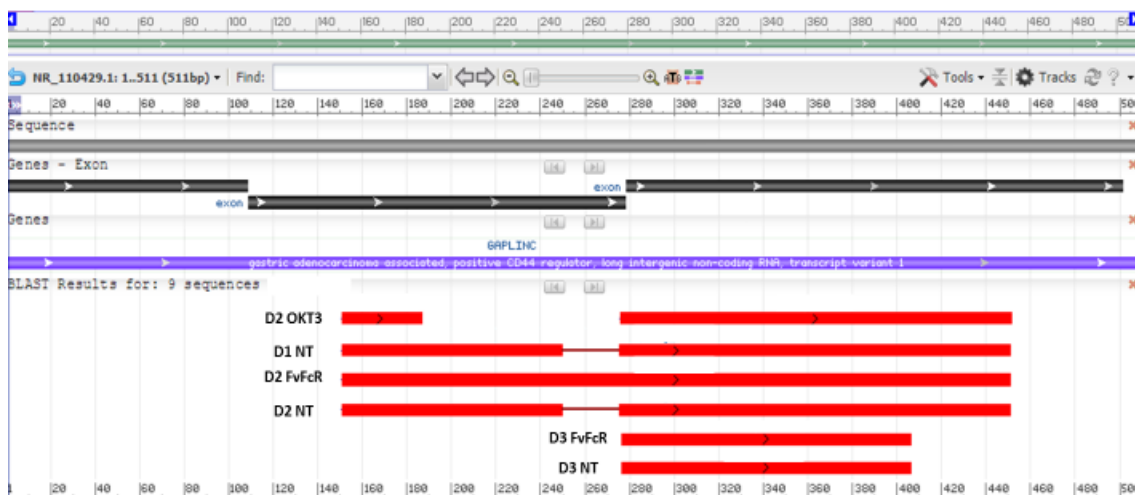


Figura 25. Representação do alinhamento realizado pelo BLAST. As linhas na cor preta representam os éxons do GAPLINC-204 variante 1, em roxo a sequência completa e em vermelho as sequências deste trabalho amplificadas com o iniciador 1. D2 e D3 representam os doadores e OKT3, FvFcR e FvFcM os anticorpos utilizados. NT representa as amostras que não receberam tratamento.

Com uma análise mais criteriosa das sequências do lncRNA GAPLINC foi constatado que este lncRNA apresenta 4 isoformas distintas (**Figura 26**), que se diferenciam pelo percentual de cobertura com relação à sequência do lncRNA GAPLINC-204. Quando analisada a cobertura e identidade entre lncRNA GAPLINC-204 e o GAPLINC-202 (RP11-838N2.4) estes apresentam 89% de cobertura e 100% de identidade. Quando se compara estes parâmetros entre as outras isoformas, é possível constatar que o GAPLINC-204 apresenta 100% de identidade e 56% de cobertura com o GAPLINC-203, e 100% de identidade e 45% de cobertura com o GAPLINC-201.

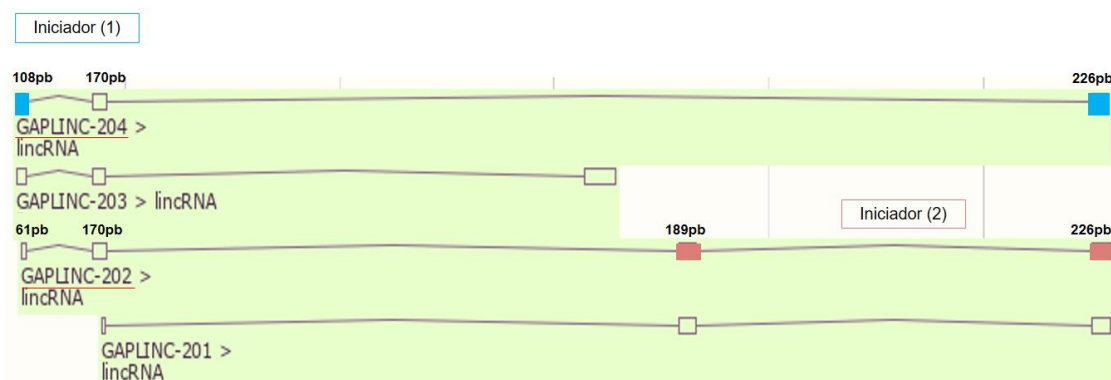


Figura 26. Representação esquemática das quatro isoformas do lncRNA GAPLINC. As cores azul e rosa representam as regiões de éxon para as quais foram desenhados os iniciadores 1 e 2, respectivamente. O tamanho correspondente a cada éxon dos lncRNAs GAPLINC-204 e 202 está representado em pares de base (pb) (Adaptado de <http://www.ensembl.org>).

Para verificar as similaridades de alinhamento entre as sequências provenientes do sequenciamento, os transcritos resultantes do RNAseq, o GAPLINC-204 e o RP11-838N.2, foi utilizada a ferramenta de análise Bioedit. O alinhamento foi realizado individualmente para cada éxon e o (*) representa posições com resíduos conservados (**Figura 27**).

A partir desse alinhamento foi possível observar que as sequências apresentam tamanhos diferentes. Esta diferença pode ser devido aos distintos tratamentos realizados, nos quais as sequências que previamente haviam sido tratadas com o anticorpo OKT3 apresentaram um tamanho menor quando comparado à sequência do GAPLINC-204, fato observado apenas com a amostra obtida do doador 2.

Uma possível explicação para o fato dessa sequência ser menor é a ocorrência de *splicing* alternativos que podem ter acontecido devido a influência do anticorpo OKT3. Autores como YOSHIMOTO *et al.*, 2016 e TANO; AKIMITSU, 2012, demonstraram a regulação de *splicing* por lncRNAs. No caso da amostra tratada com OKT3, este anticorpo pode ter induzido o recrutamento de outros lncRNAs ou distintos fatores regulatórios que podem ter realizado o *splicing*, modificando o tamanho do lncRNA encontrado nas amostras do Doador 2. Outro ponto que se deve considerar é que o sequenciamento da amostra foi realizado apenas uma vez e, portanto, o tamanho menor observado pode ser de algum artefato dessa técnica.

Com relação as demais sequências, estas apresentaram uma grande cobertura e similaridade com as sequências usadas para comparação (os transcritos resultantes do RNAseq, o GAPLINC-204 e o RP11-838N.2), confirmando a identidade proposta pelo programa BLAST.

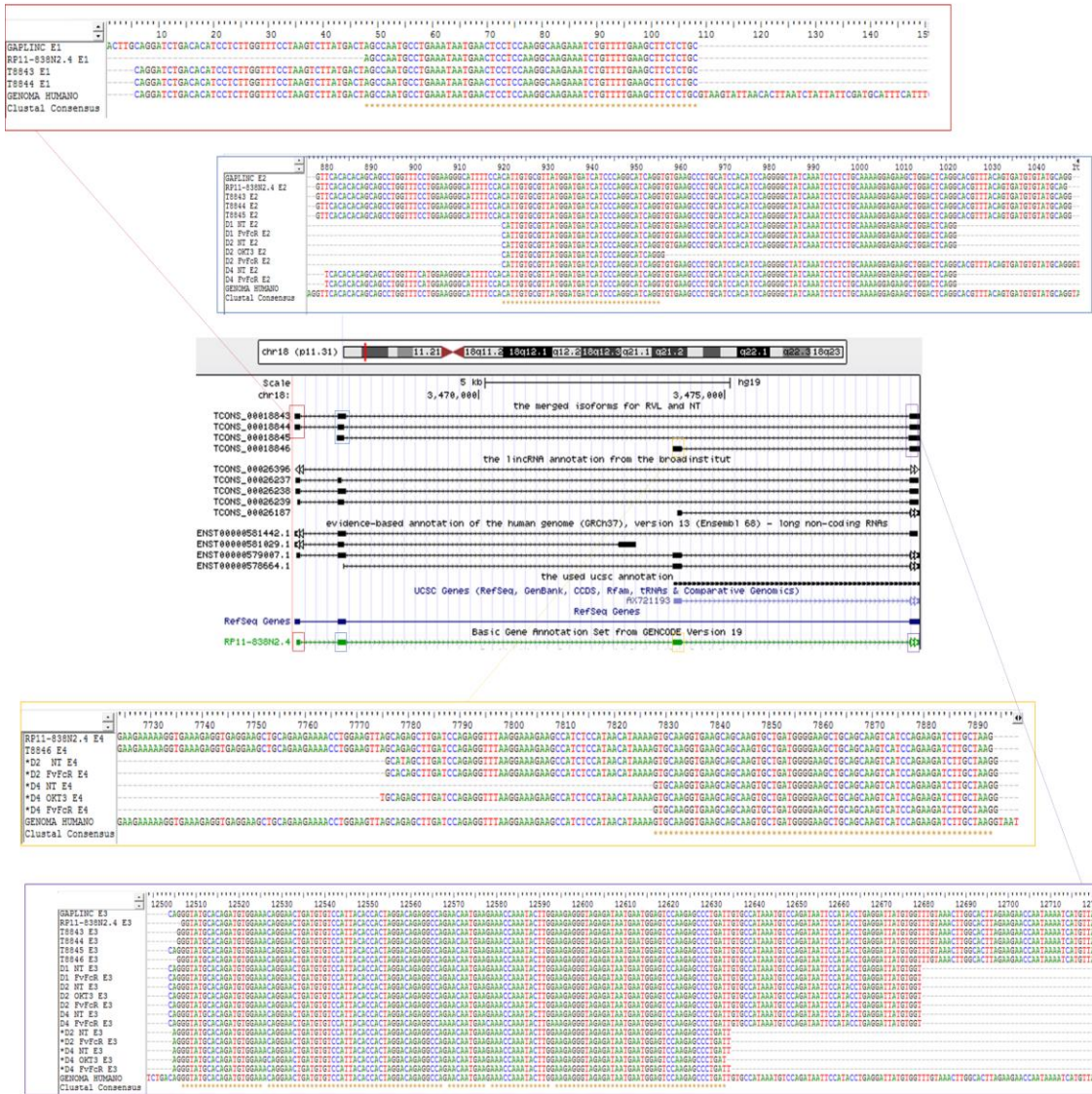


Figura 27. Representação esquemática do alinhamento de seqüências. As seqüências provenientes do sequenciamento, os transcritos resultantes do RNAseq, o GAPLINC-204 e o RP11-838N.2 foram alinhadas pelo Bioedit, utilizando o genoma humano como referência (GRCh37/hg19). D1, D2, D3 e D4 representam os dados obtidos a partir do RNAseq de linfócitos T CD3+ de diferentes doadores.

2.2 Expressão relativa

Com o objetivo de quantificar a expressão desses lncRNAs foram realizadas PCR em tempo real utilizando o RNA total das amostras de 5 doadores (n=5), tratados com os anticorpos OKT3, FvFcR e FvFcM. Iniciadores foram desenhados para as duas variantes do GAPLINC-204 e para os éxons 3 e 4 do GAPLINC-202. Este endereçamento dos primers se deve a análises realizadas anteriormente por RNAseq onde se evidenciou a existência destes lncRNAs. Como controle endógeno foi utilizado o gene B2M (Beta-2-Microglobulina). O gene para TGF β também foi quantificado (**Figura 28**).

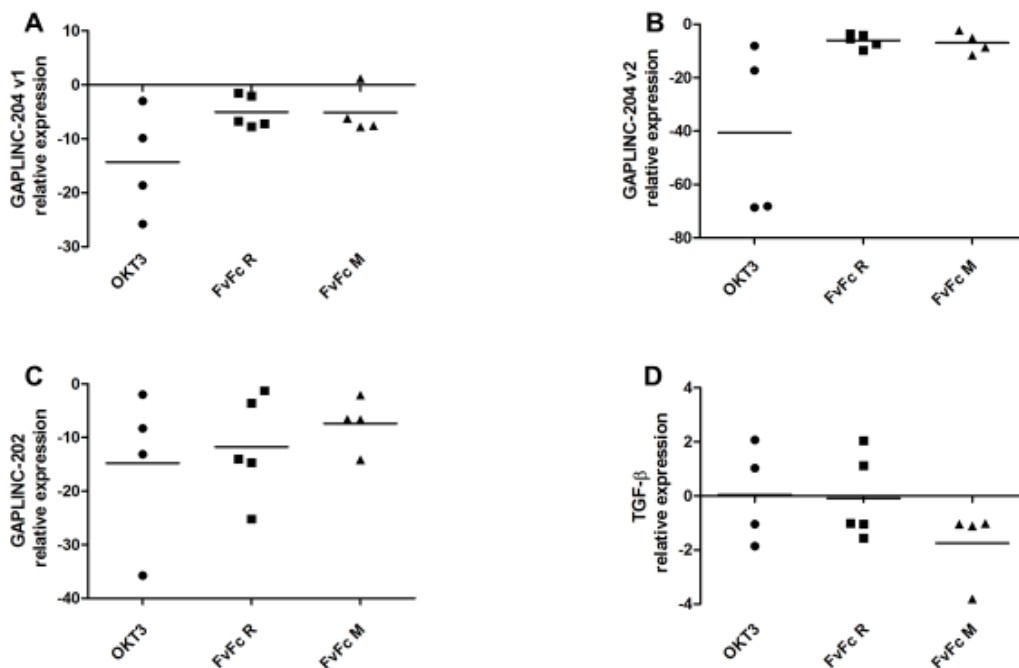


Figura 28. Expressão quantitativa dos lncRNAs em linfócitos TCD3⁺ tratados com anticorpos anti-CD3. Os resultados são expressos de acordo com o fold change de cada amostra (n=5; p<0.05). OKT3, FvFcR e FvFcM representam os anticorpos testados. A- Variante 1 do GAPLINC-204; B- Variante 2 do GAPLINC-204; C- GAPLINC-202; D- TGF- β . Cada ponto representa a média da triplicata técnica dos indivíduos.

As análises de qPCR demonstram que o lncRNA GAPLINC-204 apresentou uma diminuição na expressão (**Figura 28A, B e C**) em relação a amostras não tratadas com os anticorpos. Como predito anteriormente pelos

dados obtidos pelo RNAseq, essa diminuição na expressão pode ser decorrente da ação desses anticorpos que atuam de alguma forma na modulação do sistema imune.

Sabe-se que o lncRNA RP11-838N.4 inibe a via de sinalização de TGF- β (LIU; XU; GUO, 2016). Quando se compara as sequências do RP11-838N.2.4 e do GAPLINC-202, é possível observar 100% de similaridade e identidade. O GAPLINC está localizado no mesmo locus gênico e próximo ao gene TGIF1, que codifica o fator de transcrição homeótico TGIF (do inglês, TG-interacting factor) responsável por silenciar alguns genes (CONDITIONS, 2017) (**Figura 29**). Um desses genes que sofre a ação do TGIF, é o TGFB1, que codifica TGF- β , uma citocina envolvida em diversas respostas do sistema imune, como desenvolvimento de linfócitos T, tolerância, homeostase e diferenciação dos subtipos Treg e TH17 (TU; HONG; CHEN, 2009). Na presença dos anticorpos OKT3 e FvFcR, TGFB1 não sofreu modulação, porém, foi suprimido na presença do FvFcM.

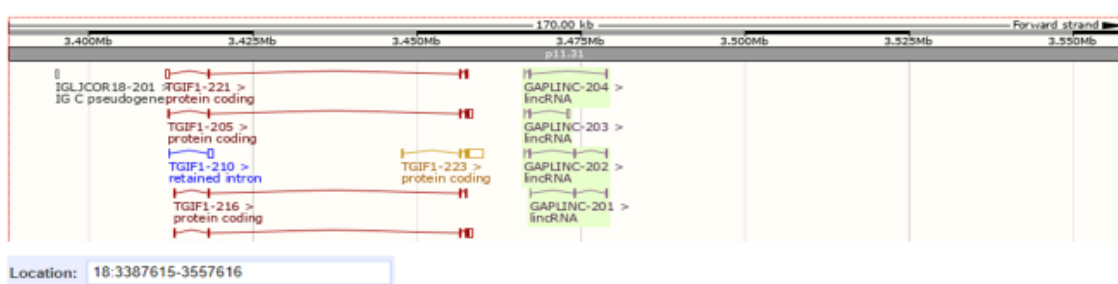


Figura 28. Representação esquemática de um locus gênico no cromossomo 18. Nesse locus se encontram os genes do GAPLINC e o TGIF1 (Retirado de <http://www.ensembl.org>).

Devido à proximidade entre os genes do lncRNA GAPLINC e o TGIF1, é possível sugerir uma regulação em cis por parte do GAPLINC no TGIF1, diminuindo a expressão de TGF- β . Um outro fator a ser considerado, é que pelas análises de qPCR, TGF- β sofreu uma diminuição na presença do anticorpo FvFcM, que pode ter induzido o GAPLINC a regular o gene TGIF1. O fato dos anticorpos OKT3 e FvFcR não apresentarem nenhuma modulação na expressão dessa citocina, não descarta a possibilidade de que eles possam regulá-la de algum modo em um determinado contexto celular.

Nas **Figuras 28 A e B**, é possível observar que os anticorpos FvFcR e FvFcM tem expressões similares, que pode ser devido a sua estrutura, uma vez que são FvFcS, ou seja, possuem a porção Fc e a Fv, constituída pelas cadeias variáveis do anticorpo (scFv) e conectadas por uma sequência peptídica flexível, o peptídeo conector. **A Figura 30** ilustra as diferentes versões dos anticorpos anti-CD3, onde pode-se observar a diferença de tamanho entre as versões FvFcR e FvFcM, bem como o processo de humanização ocorrido com o FvFcR. Esse anticorpo humanizado possui apenas as regiões CDRs murinas do OKT3, enquanto o *framework* das cadeias leves e pesadas de anticorpos humanizados são humanas. A versão quimérica FvFcM do anticorpo OKT3, possui o Fv murino e a porção Fc humana (MARANHÃO & BRÍGIDO, 2001).

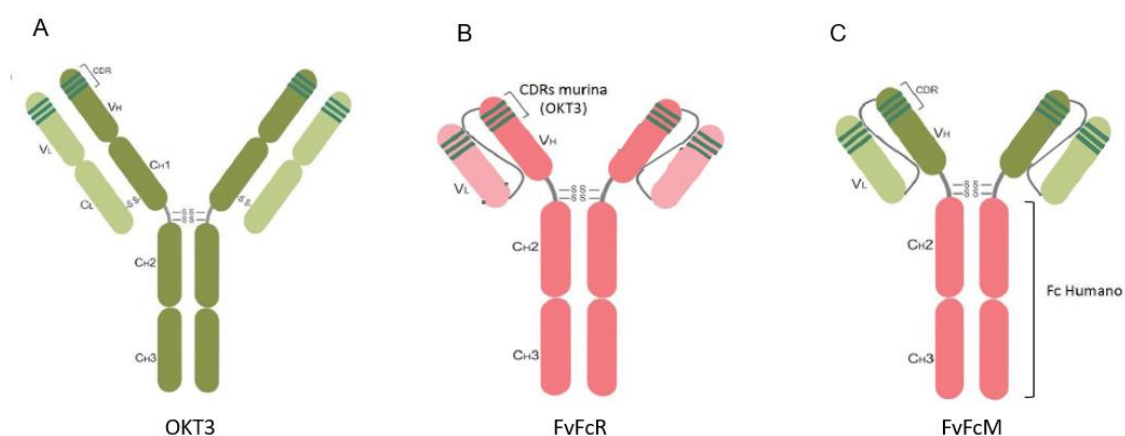


Figura 30. Representação esquemática das diferentes versões dos anticorpos anti-CD3. A- Anticorpos murino OKT3. B- Versão humanizada FvFcR com as CDRs murinas do OKT3. C- Versão quimérica do anticorpo OKT3, FvFcM que possui a porção scFV do anticorpo murino e a porção Fc humana (Adaptado de SIMI, 2014).

2.3 Predição da estrutura secundária

Estudos prévios mostraram que as estruturas secundárias e terciárias dos lncRNAs são altamente conservadas, característica que pode ter relação com a função biológica dessas moléculas (LI; ZHU; LUO, 2016).

Para fazer uma predição de estruturas secundárias de RNA, é necessário avaliar o valor do ΔG , que mostra a estabilidade da molécula *in silico*. No meio

celular, as moléculas de RNA podem formar estruturas secundárias diferentes das previstas, pois interagem com diversas proteínas.

Com o objetivo de analisar e comparar a estrutura secundária das isoformas do lncRNA GAPLINC, essas estruturas foram previstas utilizando o programa mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>).

Inicialmente foram comparadas as estruturas secundárias do GAPLINC-202 e do RP11-838N2.4, que confirmaram serem idênticas e estáveis devido ao valor do ΔG , -156,41 (**Figura 31**).

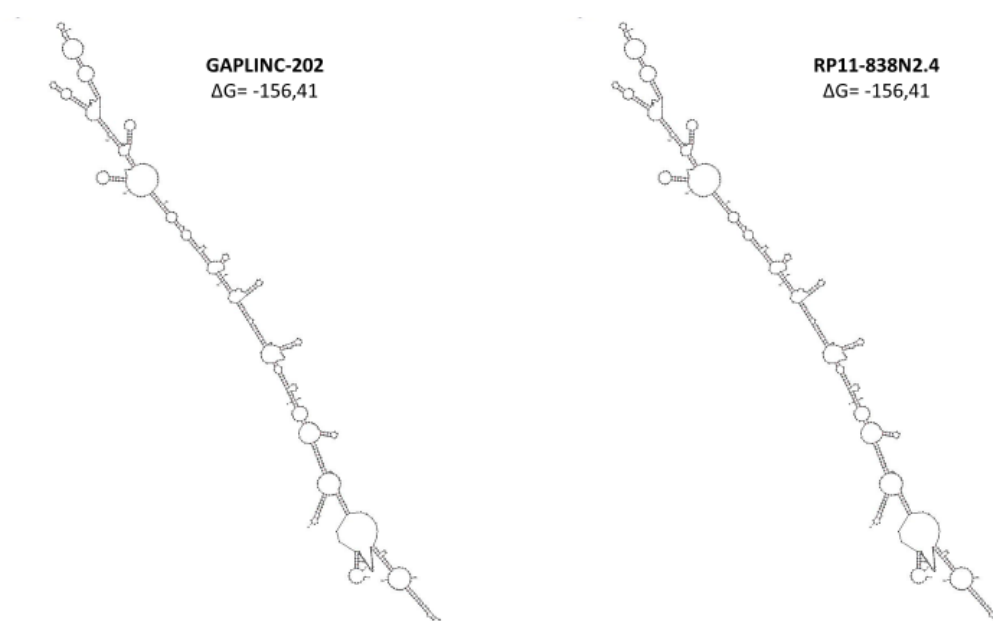


Figura 31. Representação esquemática das estruturas secundárias do GAPLINC-202 e RP11-838N2.4. (Adaptado de <http://unafold.rna.albany.edu>).

Em seguida foram comparadas as estruturas secundárias das variantes 1 e 2 do GAPLINC-204 (**Figura 32**). A variante 1 possui um ΔG menor, sugerindo ser uma estrutura secundária mais estável do que a variante 2.

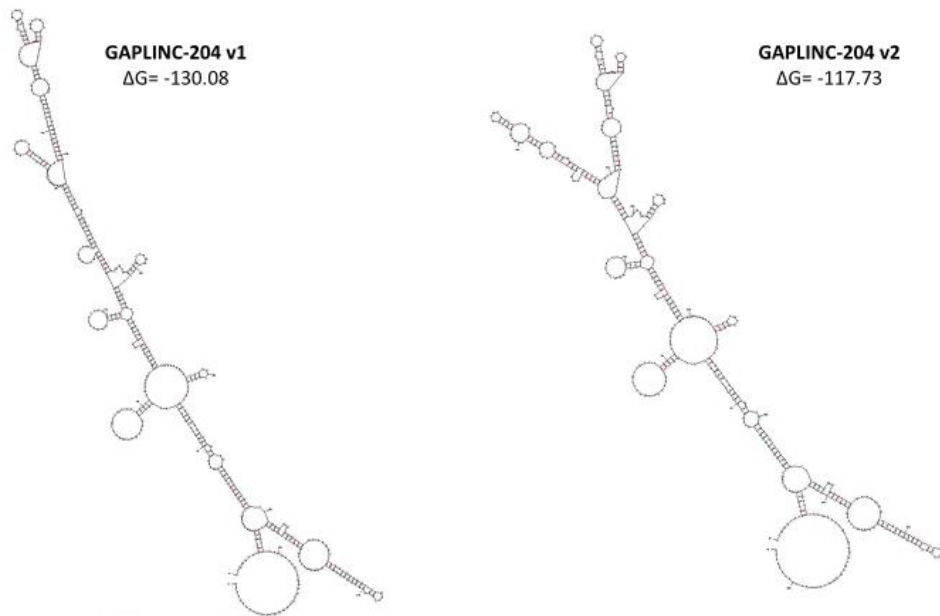


Figura 32. Representação esquemática das estruturas secundárias das variantes 1 e 2 do GAPLINC-204 (Adaptado de <http://unafold.rna.albany.edu>).

Pelo fato das sequências obtidas nesse trabalho não estarem completas, não foram preditas as estruturas secundárias para elas, uma vez que não demonstrariam o seu tamanho e estabilidade característicos.

3. IncRNA CTD-2319I12.1

3.1 Clonagem e sequenciamento dos IncRNAs

Os amplicons dos IncRNAs foram obtidos por PCR, e possuem ~275 pb (**Figura 33**). A melhor temperatura de anelamento para os iniciadores desenhados para o transcrito TCONS_00018307, foi de 52°C e a concentração ideal de MgCl₂ foi de 2mM.

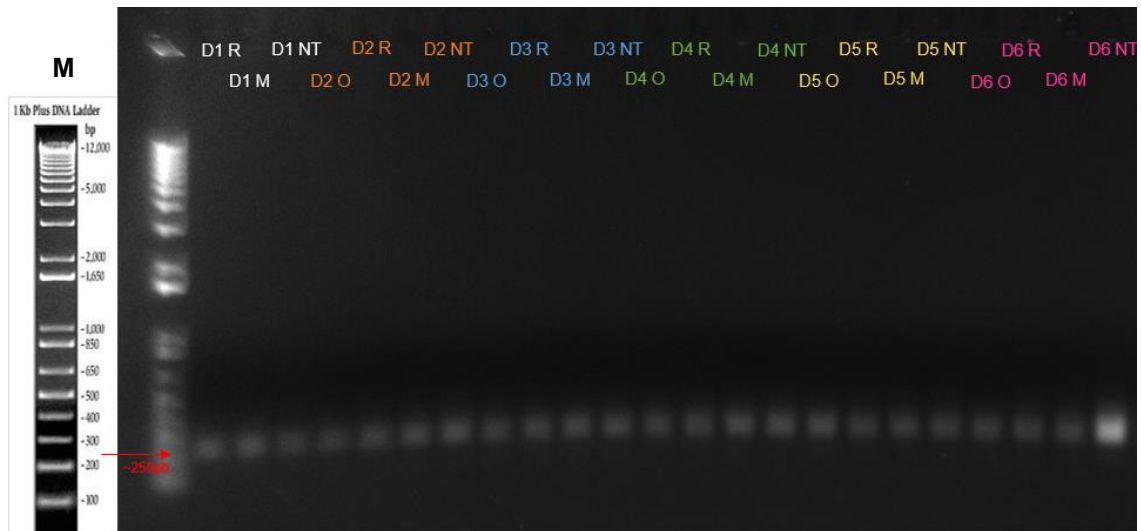


Figura 33. Amplificação de fragmentos correspondentes ao lncRNA CTD-2319112.1 por PCR. Os amplicons, indicados pela seta vermelha e com tamanho de ~250 pb, foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3% ug/mL). **D1, D2, D3, D4, D5 e D6** representam os doadores e **O, R e M** representam os anticorpos **OKT3, FvFcR e FvFcM**. **NT** representa as amostras que não receberam tratamento. **M** - Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a amplificação, foi realizada a clonagem em vetor *pGEM-T Easy Vector*. Os vetores foram transformados em células competentes, extraído o DNA plasmidial e enviado para sequenciamento, da onde retornaram 4 amostras com qualidade, que foram: **D3** – OKT3, FvFcR e FvFcM; **D4** – FvFcR.

Do total de 23 amostras amplificadas com os iniciadores para o transcrito TCONS_00018307, 11 foram enviadas para o sequenciamento e apenas 4 seqüências de qualidade foram obtidas (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100nt), correspondente a 61% do total das seqüências geradas. Estas seqüências se distribuem em: **D3** - OKT3, FvFcR e FvFcM; **D4** – FvFcR.

Os amplicons dos lncRNAs obtidos com os iniciadores desenhados para o transcrito LOC645632 possuíam ~500 pb, a melhor temperatura de alinhamento para os iniciadores foi de 51°C e a concentração ideal de MgCl₂ foi de 3mM. A clonagem foi realizada em vetor *pGEM-T Easy Vector*, o DNA plasmidial de duas colônias foi extraído (**Figura 34**) e enviado para sequenciamento. O total de 6 amostras retornaram com qualidade, que foram: **D1** – FvFcM; **D2** – FvFcR e NT; **D3** - FvFcR e NT; **D4** – NT.

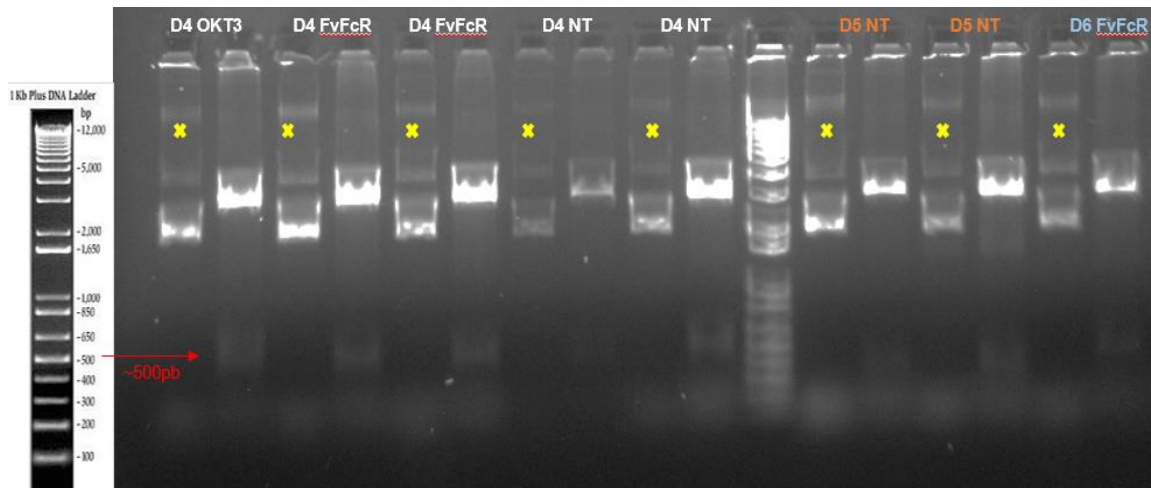


Figura 34. Análise de restrição para a confirmação da construção dos vetores contendo os fragmentos de lncRNA em vetor pGEM-T easy. A digestão de DNA plasmidial foi analisada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,3% ug/mL). A seta vermelha representa a amplificação do fragmento correspondente ao lncRNA, com um tamanho aproximado de ~500 pb. **D4**, **D5** e **D6** representam os doadores e **FvFcR**, **FvFcM** e **OKT3**, os anticorpos. **NT** representa as amostras que não receberam tratamento. O (*) representa os plasmídeos intactos. **M** - Marcador de massa molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). A digestão foi realizada para duas colônias transformadas.

Do total de 12 amostras amplificadas com os iniciadores para o transcrito LOC645638, 11 foram enviadas para o sequenciamento e 8 sequências de qualidade foram obtidas (PHRED \geq 20 e tamanho \geq 100nt). Estas sequências se distribuem em: **D1** – FvFcM; **D2** – FvFcR e NT; **D3** - FvFcR e NT; **D4** – NT; **D5** - NT; **D6** – FvFcR.

Pela análise dos dados obtidos pelo sequenciamento, foi possível observar a identidade entre os lncRNAs analisados. Utilizando os iniciadores desenhados para amplificar a sequências do lncRNA CTD-2319I12.1, e realizando o alinhamento inicial utilizando o programa BLAST, foi possível constatar 100% de cobertura e 100% de identidade entre as sequências e o pseudogene WAP four-disulfide core domain 21 (WFDC21P), também conhecido por lncRNA-DC (codificado pelo gene LOC645638).

Os dados obtidos pelo alinhamento revelaram que as sequências em estudo são iguais às do LOC645638 (**Figura 35**). Esse dado contradiz os resultados obtidos por Pin Wang e colaboradores que afirmaram terem encontrado esse lncRNA-DC apenas em células dendríticas, onde são importantes para a sua diferenciação e função (WANG *et al.*, 2014) Neste trabalho observou-se a presença deste lncRNA-DC em linfócitos T.

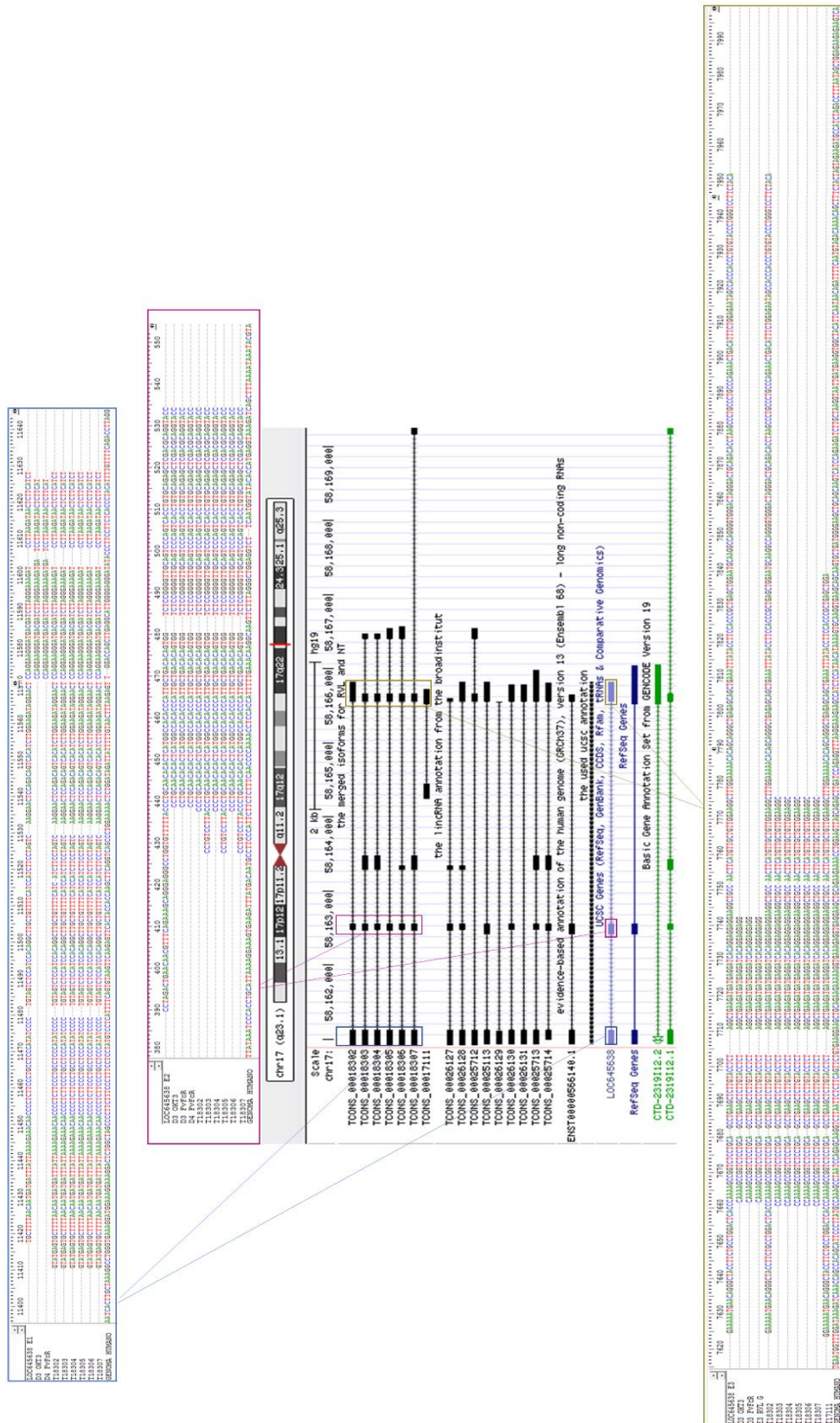


Figura 35. Representação esquemática do alinhamento de seqüências. Seqüências provenientes do sequenciamento, os transcritos resultantes do RNAseq e o LOC645638 alinhados pelo Bioedit, utilizando o genoma como referência (GRCh37/hg19).

3.2 Expressão relativa

Com o objetivo de quantificar a expressão desses lncRNAs foram realizadas PCR em tempo real utilizando o RNA total das amostras de 5 doadores, tratados com os anticorpos OKT3, FvFcR e FvFcM. Iniciadores foram desenhados para o LOC645638, que apresenta 3 éxons na estrutura nativa. Nos dados obtidos pelas análises realizadas foram encontradas duas distintas estruturas uma contendo o formato original 3 exons e uma segunda sequência contendo apenas os dois últimos exons. Como controle endógeno foi utilizado o gene B2M. O gene para STAT3 também foi quantificado (**Figura 36**).

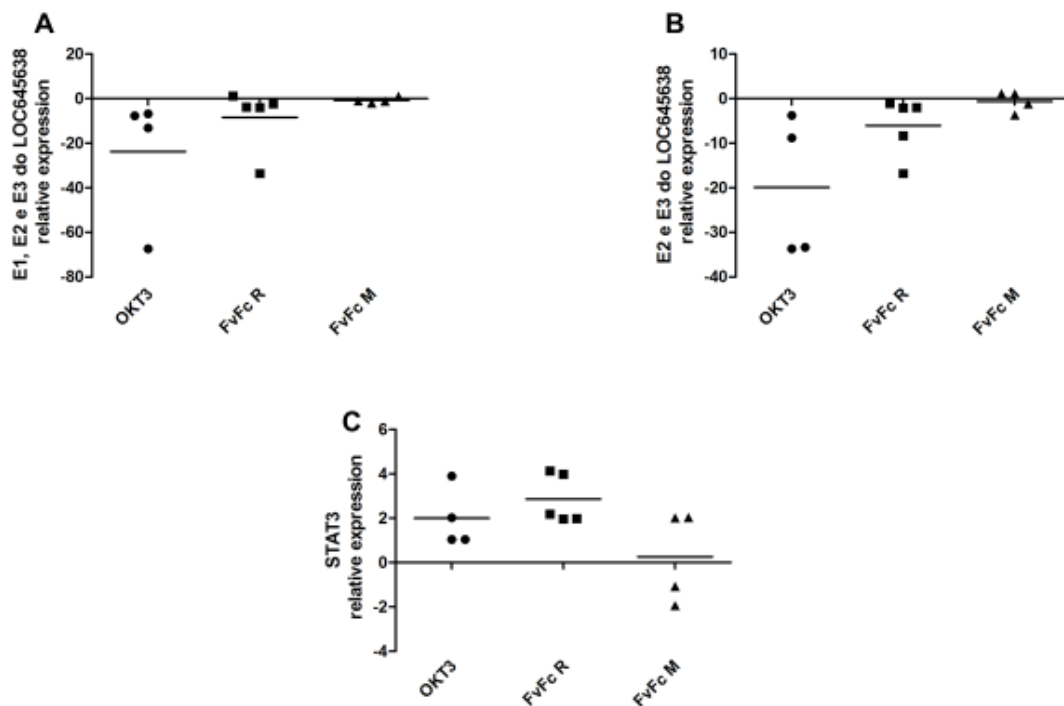


Figura 36. Expressão quantitativa dos lncRNAs em linfócitos TCD3⁺ tratados com anticorpos anti-CD3. Os resultados são expressos de acordo com o fold change de cada amostra (n=5; p<0.05). A - Éxons 1, 2 e 3 do LOC645638; B- Éxons 2 e 3 do LOC645638; C- STAT3. Cada ponto representa a média da triplicata técnica dos indivíduos.

Conforme mostrado anteriormente pelos dados obtidos do RNAseq, o LOC645638 se encontra downregulado nas amostras tratadas com os anticorpos OKT3 e FvFcR quando comparadas aos resultados obtidos com as amostras não tratadas (NT). Estes resultados foram corroborados pelos dados obtidos

com as análises de qPCR realizadas neste trabalho, sugerindo novamente que esses anticorpos podem estar modulando a resposta desse lncRNA.

A quantificação do fator de transcrição STAT3 foi realizada utilizando a técnica de qPCR, com o intuito de comparar os dados obtidos por Pin Wang, que mostra que o lncRNA-DC é importante para a ativação da STAT3, interagindo com o aminoácido presente na porção C terminal desse fator de transcrição que sofre fosforilação e ativa STAT3 (WANG *et al.*, 2014). No entanto, como mostra a **Figura 36 C**, STAT3 teve um aumento de expressão na presença dos anticorpos OKT3 e FvFcR, enquanto os lncRNAs estavam com uma expressão diminuída na presença dos mesmos. Essa diferença entre os dados desse trabalho e os dados do Pin Wang, pode ter acontecido pois com os ensaios de qPCR foi analisado o nível de expressão do transcrito de STAT3, diferente de Pin Wang que analisou o nível de fosforilação do fator STAT3.

3.3 Predição da estrutura secundária

Com o objetivo de analisar a estrutura secundária da isoforma do lncRNA LOC645638, essa estrutura foi predita utilizando o programa mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) (**Figura 37**).

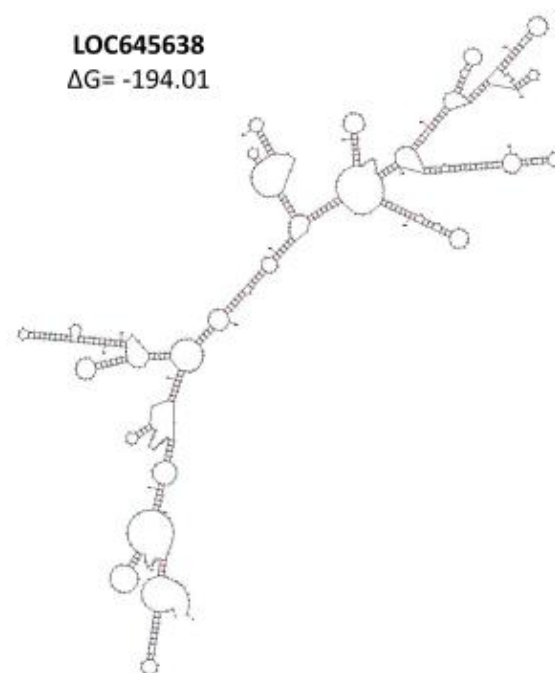


Figura 37. Representação esquemática da estrutura secundária do LOC645638 (Adaptado de <http://unafold.rna.albany.edu>).

A estrutura secundária do LOC645638 sugere que essa molécula seja estável devido ao valor do ΔG , -194,01.

4. IncRNA COL4A2-AS2

Pela análise dos dados obtidos pelo sequenciamento, foi possível constatar que as sequências amplificadas para esse IncRNA obtiveram 96% de cobertura e 100% de identidade com a proteína Dipeptidil peptidase 3 (DPP3 – Gene ID: 10072). Por ser um gene codificador de proteínas, esse IncRNA foi descartado das análises. Esse fato sugere que a predição desse IncRNA realizada pelo Cufflinks como sendo um RNA que não codificava proteínas, pode ter sido feita de forma errada por esse *software*.

5. IncRNA LINC00861

Não foi possível a amplificação dos amplicons do IncRNA LINC00861, mesmo tendo sido realizadas diferentes modificações nos sistemas de reação

das PCRs. Foram desenhados 4 pares de iniciadores para esse lncRNA, que variavam sua T_m (melting temperature) entre 54,9°C e 56,8°C. Foram testadas todas as temperaturas entre os valores de 50°C e 57°C, bem como diferentes concentrações de $MgCl_2$ que variaram de 1mM, 1,5mM, 2mM, 2,5mM e 3mM. As ciclagens também foram alteradas com a intenção de amplificar os fragmentos, porém nenhuma combinação de tentativas funcionou. Esse fato pode ter acontecido pela ausência desses lncRNAs nas amostras ou por uma possível supressão deles por parte dos anticorpos anti-CD3.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

O tratamento com os anticorpos anti-CD3 *in vitro* promoveu uma alteração na expressão de alguns lncRNAs nas amostras testadas, apresentando uma diminuição na expressão na presença dos anticorpos OKT3, FvFcR e FvFcM. Realizado o sequenciamento, foi possível constatar uma similaridade entre os lncRNAs deste trabalho com os lncRNAs GAPLINC e lnc-DC. Inicialmente descrito como um lncRNA exclusivo de células dendríticas segundo Wang *et al.*, 2016, o lnc-DC neste trabalho foi encontrado nas amostras de linfócitos T CD3⁺.

O lncRNA GAPLINC foi descrito por ter seus níveis elevados em pacientes com câncer gástrico (HU *et al.*, 2014). No presente trabalho embora os doadores sejam saudáveis, observou-se que esse lncRNA estava suprimido na presença dos anticorpos em estudo. Este fato pode ter ocorrido simplesmente por estes doadores serem saudáveis ou por ação dos anticorpos utilizados para os experimentos, sugerindo que eles podem estar de alguma forma suprimindo a expressão desse lncRNA para manter a homeostase do organismo.

Como perspectivas para trabalhos futuros com o intuito de melhor caracterizar esses lncRNAs, é fundamental a resolução das seguintes questões:

- Qual a localização celular desses lncRNAs? Nuclear ou citoplasmática?
- Qual a função desempenhada pelos lncRNAs?
- Qual a implicação do seu nocaute? E da sua superexpressão?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAIS-BATTAD, J. M. *et al.* Novel adaptive and innate immunity targets in hypertension. **Pharmacological Research**, v. 120, p. 109–115, 2017.
- ABRAMOWICZ, D.; SCHANDENE, L.; GOLDMAN, M. 1989 Release of tnf, il-2 e inf-g in serum after injection of OKT3, 1989.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215:403-410, 1990.
- ANGRAND, P. O. *et al.* The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. APR, p. 1–12, 2015.
- ATIANAND, M. K.; CAFFREY, D. R.; FITZGERALD, K. A. Immunobiology of Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Immunology**, v. 35, n. January, p. 177–198, 2017.
- ATIANAND, M. K.; FITZGERALD, K. A. Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system. **Complement**, v. 20, n. 11, p. 623–631, 2015.
- AUNE, T. M.; CROOKE, P. S.; SPURLOCK, C. F. Long noncoding RNAs in T lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 99, n. January, p. 31–44, 2015.
- AUNE, T. M.; SPURLOCK, C. F. Long non-coding RNAs in innate and adaptive immunity. **Virus Research**, v. 212, p. 146–160, 2016.
- BEZERRA, MAG Estudo do perfil imunorregulatório de anticorpos humanizados anti-CD3. Brasília, 2014. 163 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- BHAN, A.; MANDAL, S. S. Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. **ChemMedChem**, v. 9, n. 9, p. 1932–1956, 2014.
- BHAT, S. A. *et al.* Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. **Non-coding RNA Research**, 2016.
- BIOSYSTEMS, A. User Bulletin # 2 ABI P RISM 7700 Sequence Detection System SUBJECT : Relative Quantitation of Gene Expression. **System**, v. 1997, p. 1–36, 2001.
- CAVALLARO, G. *et al.* Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: production and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017.
- CHATENOUD, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 123–132, 2003.
- CHEN, M.; CHEN, J.; ZHANG, D. Exploring the secrets of long noncoding RNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5467–5496, 2015.
- CHILLÓN, I.; PYLE, A. M. Inverted repeat Alu elements in the human lincRNA-p21 adopt a conserved secondary structure that regulates RNA function. **Nucleic**

Acids Research, v. 44, n. 19, p. 9462–9471, 2016.

CONDITIONS, G. Genetics home reference. **NIH library**, p. 1–5, 2017.

COSIMI A.B.; BURTON R.C.; COLVIN R.B.; GOLDSTEIN G, DELMONICO F.L.; LA QUAGLIA M.P. *et al.* Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation**, 32:535–539, 1981.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: A noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. MAR, p. 1–9, 2015.

DE-SOUZA, M.T.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2ª Edição. EDU-UnB, 2016.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 337–348, 2008.

ELLING, R.; CHAN, J.; FITZGERALD, K. A. Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 3, p. 504–512, 2016.

FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 1, p. 7–21, 2013.

GEISLER, S.; COLLER, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 11, p. 699–712, 2013.

GENG, H.; TAN, X.-D. Functional diversity of long non-coding RNAs in immune regulation. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 1, p. 72–81, 2016.

GUAN, D. *et al.* Switching cell fate, ncRNAs coming to play. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 1, p. e464, 2013.

HAJJARI, M.; SALAVATY, A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. **Cancer biology & medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2015.

HALL, T.A.; BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HANSEL, T. T. *et al.* The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 4, p. 325–338, 2010.

HEWARD, J. A.; LINDSAY, M. A. Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 9, p. 408–419, 2014.

HU, W.; ALVAREZ-DOMINGUEZ, J. R.; LODISH, H. F. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. **EMBO reports**, v. 13, n. 11, p. 971–983, 2012.

HU, Y. *et al.* Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer. **Cancer**

Research, v. 74, n. 23, p. 6890–6902, 2014.

HUANG, W. *et al.* DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 517–522, 2015.

IMAMURA, K.; AKIMITSU, N. Long non-coding RNAs involved in immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 3–6, 2014.

IWASAKI, Y. W.; SIOMI, M. C.; SIOMI, H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 405–433, 2015.

JONES, P.T.; DEAR P.H.; FOOTE J; NEUBERGER M.S.; WINTER G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, 321:522-525, 1986.

KIMBALL, J. A *et al.* The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. **Transplant immunology**, v. 3, n. 3, p. 212–221, 1995.

KORNIENKO, A. E. *et al.* Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. **BMC biology**, v. 11, n. 1, p. 59, 2013.

KUHN, CHANTAL & WEINER, H. L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies - from bench to bedside. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 889–906, 2016.

LEE, J. T. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. **Science (New York, NY)**, v. 338, n. 6113, p. 1435–1439, 2012.

LI, R.; ZHU, H.; LUO, Y. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

LI, Z. *et al.* The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 3, p. 1002–7, 2014.

LIU, L. *et al.* Hypoxia promotes gastric cancer malignancy partly through the HIF-1 α dependent transcriptional activation of the long non-coding RNA GAPLINC. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–11, 2016.

LIU, Y.; XU, N.; GUO, H. Long noncoding RNA RP11-838N2.4 enhances the cytotoxic effects of temozolomide by inhibiting the functions of miR-10a in glioblastoma cell lines. **oncotarget, Advance Publications**, v. 7, n. 036444, p. 1–17, 2016.

MARANHÃO, AQ.; BRÍGIDO, MM. Anticorpos Humanizados. **Biotecnologia Científica e Desenvolvimento**, Brasília, n. 23, p.38-43, dez. 2001.

MATHY, N. W.; CHEN, X.-M. LncRNAs and Their Transcriptional Control of Inflammatory Responses. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.R116.760884, 2017.

PAGANI, M. *et al.* Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4⁺ T-cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 253, n. 1, p. 82–96, 2013.

PONTIER, D. B.; GRIBNAU, J. Xist regulation and function eXplored. **Human**

Genetics, v. 130, n. 2, p. 223–236, 2011.

QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 1, p. 47–62, 2016.

RANZANI, V. *et al.* The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. **Nature immunology**, v. 16, n. 3, p. 318–25, 2015.

RASHID, F.; SHAH, A.; SHAN, G. Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 73–80, 2016.

REICHERT, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium e c n e i c s o i e t u s i b e r d s t n i a d t o © D e c n e i c s o i e t u s i b e r d s t n i a d t 1 o o © D. n. June, p. 413–415, 2012.

RUDOLPH, M.G. *et al.* How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. **Annual Review of Immunology**, v.24, p. 419-466, 2006.

SAMBROOK J., RUSSELL D.W. Molecular cloning - a laboratory manual, 3rd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SANTANA, M. A.; ESQUIVEL-GUADARRAMA, F. Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation. **International Review of Cytology**, v. 250, n. 06, p. 217–274, 2006.

SEHGAL, L. *et al.* FAS-antisense 1 lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma. **Leukemia**, v. 28, n. 12, p. 2376–2387, 2014.

SILVA, H. M. *et al.* Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology Letters**, v. 125, n. 2, p. 129–136, 2009.

SIMI, K. Análise transcritômica de linfócitos T humanos tratados com anticorpos anti-CD3. 2014. 174f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

SOUSA, I. G. *et al.* MicroRNA expression profiles in human CD3+ T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 124, 2017.

SOUSA, I.G. Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3⁺ humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos. Brasília, 2015. 97p Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

SPURLOCK, C. F. *et al.* Expression and functions of long noncoding RNAs during human T helper cell differentiation. **Nature Communications**, v. 6, n. August, p. 6932, 2015.

SPURLOCK, C. F.; CROOKE, P. S.; AUNE, T. M. Biogenesis and Transcriptional Regulation of Long Noncoding RNAs in the Human Immune System. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 12, p. 4509–4517, 2016.

- SUN, B.; ZHANG, Y. **Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses.** [s.l: s.n.]. v. 841
- TANO, K.; AKIMITSU, N. Long non-coding RNAs in cancer progression. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. OCT, p. 1–6, 2012.
- TIAN, X. *et al.* Long non-coding RNAs in the regulation of myeloid cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, p. 99, 2016.
- TRAPNELL C.; WILLIAMS B.A.; PERTEA G. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiatio. **Nature Biotechnology**. V.28, p:511-515, 2010.
- TU, Y. K.; HONG, Y. Y.; CHEN, Y. C. TGF- β Function in Immune Suppression. **Life Science Journal**, v. 6, n. 4, p. 23–27, 2009.
- UEMATSU, S.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity. **Skin Research**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2008.
- WANG, C. *et al.* The gencode v7. **Nature**, v. 22, n. 2, p. 466–73, 2015a.
- WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 904–914, 2011.
- WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. **Mol Cell**, v. 43, n. 6, p. 904–914, 2012.
- WANG, P. *et al.* The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. April, p. 310–3, 2014.
- WANG, Y. *et al.* Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8⁺ T-cell immune responses in tuberculosis infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. E3883–E3892, 2015b.
- WEICK, E.-M.; MISKA, E. A. piRNAs: from biogenesis to function. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3458–3471, 2014.
- WILSON, I.A.; GARCIA, K.C. T-cell receptor structure and TCR complexes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8(1):124-5, 1997.
- WHITEHEAD, K. A. *et al.* Silencing or Stimulation? siRNA Delivery and the Immune System. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 77–96, 2011.
- YANG, Y.; WEN, L.; ZHU, H. Unveiling the hidden function of long non-coding RNA by identifying its major partner-protein. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.
- YATES, A. *et al.* Ensembl 2016. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D710–D716, 2016.
- YOSHIMOTO, R. *et al.* MALAT1 long non-coding RNA in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 192–199,

2016.

YU, B.; SHAN, G. Functions of long noncoding RNAs in the nucleus. **Nucleus**, v. 1034, n. April, p. 00–00, 2016.

ZHAO, Y.; SUN, H.; WANG, H. Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. **Cell & bioscience**, v. 6, p. 45, 2016.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.