UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MAX JORDAN DE SOUZA DUARTE

**O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células
tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por
CRISPR-Cas9.**

**Ribeirão Preto – SP
2018**

MAX JORDAN DE SOUZA DUARTE

O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por CRISPR-Cas9.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva
Passos Júnior

**Ribeirão Preto – SP
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação da Publicação

Duarte, Max Jordan

O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por CRISPR-Cas9.

Ribeirão Preto, 2018.

119p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética

1. Células tímicas epiteliais medulares (mTECs). 2. Gene *Autoimmune Regulator* (Aire). 3. CRISPR-Cas9 4. Long noncoding RNA. 5. Expressão Gênica 6. Adesão Celular

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto Individual Processo 13/17481-1;
 - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP.
-

Nome: DUARTE, Max Jordan de Souza

Título: O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por CRISPR-Cas9.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho

A ciência e a pesquisa do nosso Brasil

Agradecimentos

Agradeço, a minha família, que mesmo sem entender meus objetivos, confiam em mim e regam de amor, carinho, orgulho e admiração;

Agradeço, ao meu pai Jorge Duarte, que me deu apoio em todas as importantes decisões da minha vida e transfigura um grande exemplo de ser humano, me ensinando mesmo em silêncio. Amo sua vida e sou eternamente grato a Deus e a você por tudo.

Agradeço, ao apoio de amigos espalhados por diversas cidades, estados e países, em quem sempre encontro uma palavra alegre, de otimismo, ajuda e apoio.

Agradeço, aos amigos do Laboratório de Imunogenética Molecular, por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos, companhias essenciais para o crescimento profissional e pessoal.

Agradeço, ao Prof. Geraldo Passos, que respira ciência e nos inspira todos os dias. A ciência carece de cientistas como você. Sou imensamente grato pela oportunidade e confiança depositada para que um bom trabalho fosse feito.

“Por mais que agora não se consiga elucidar as etapas que nos confrontam, sei que um mar de entendimentos está por vir”

Max Jordan Duarte

RESUMO

Duarte, Max Jordan. **O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por CRISPR-Cas9.** 2018. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O timo é um órgão linfóide primário essencial para a manutenção da tolerância central através da seleção e eliminação de células T autoreativas. Precusores de células T, oriundas da medula óssea, chegam ao timo e migram do córtex para região da medula. As células epiteliais medulares tímicas (mTECs) expressam em sua superfície antígenos de tecidos periféricos (em inglês *tissue-restricted antigens* ou TRAs) que representam autoantígenos de todos os tecidos do corpo. Atuando como um fator de transcrição não clássico em células mTEC, o gene *Autoimmune Regulator* (Aire) desempenha um papel na expressão dos TRAs, cuja proteína codificada libera a RNA polimerase II (RNA Pol II) ancorada na cromatina e regula a expressão de mRNAs na glândula timo. A função biológica deste gene está ligada à indução de tolerância imunológica central impedindo o aparecimento de doenças autoimunes. Isso é resultado da seleção negativa de timócitos (precusores de células T) autoreativos que interagem fisicamente com as mTECs. Os timócitos autoreativos que reconhecem os TRAs como elementos estranhos são eliminados por apoptose. O co-cultivo de mTECs com timócitos representa um sistema-modelo *in vitro* adequado para se aproximar da interação celular que ocorre dentro do timo. Os resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que além do controle de mRNA de TRAs, o gene Aire também participa da modulação de miRNAs em mTECs uma vez que estas espécies de RNA são transcritas pela RNA Pol II. Continuando com essa linha de estudos, neste trabalho nós demonstramos pela primeira vez que Aire também modula a expressão de long non-coding RNAs (lncRNAs) em mTECs. Para isto fizemos uso da estratégia da perda de função analisando a expressão dessa espécie de RNA, assim como de mRNAs, em células mTEC Aire +/+ e mTEC Aire nocautes (KO Aire -/-) obtidas pela edição gênica por Crispr-Cas9. O transcriptoma dessas células que passaram ou não por adesão com timócitos, foi então analisado por hibridizações com microarrays. Isso evidenciou que Aire e adesão celular influenciam a expressão tanto de mRNAs como de lncRNAs. A reconstrução de redes de interação lncRNAs-mRNAs possibilitou evidenciar uma nova via de regulação pós-transcricional em células mTEC. **Palavras-chave** Células tímicas epiteliais medulares (mTECs), Gene *Autoimmune Regulator* (Aire), CRISPR-Cas9, Long noncoding RNA, Expressão Gênica, Adesão Celular.

ABSTRACT

Duarte, Max Jordan. **Aire gene can control mRNAs as well as lncRNAs in medullary thymic epithelial cells as evidenced by genome editing by CRISPR-Cas9.** 2018. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The thymus is a primary lymphoid organ essential for the maintenance of central tolerance through the selection and elimination of autoreactive T cells. Precursors of T cells, originating from the bone marrow, reach the thymus and migrate from the thymic cortex to the medullary region. Thymic medullary epithelial cells (mTECs) express on their surface tissue-restricted antigens (TRAs) that represent autoantigens of all tissues in the body. Acting as a non-classical transcription factor in mTEC cells, the Autoimmune regulator (Aire) gene plays a role in the expression of TRAs, whose encoded protein releases the RNA polymerase II (RNA Pol II) anchored in the chromatin and regulates the expression of mRNAs in the thymus gland. The biological function of this gene is associated to the induction of central immune tolerance preventing the onset of autoimmune diseases. This is a result of negative selection of autoreactive thymocytes (T cell precursors) that interact physically with mTECs. Self-reactive thymocytes that recognize TRAs as foreign elements are eliminated by apoptosis. The co-culture of mTECs with thymocytes represents an appropriate in vitro model system to approximate the cellular interaction that occurs within the thymus. Previous results from our laboratory demonstrated that in addition to the control of TRA mRNAs, Aire also participates in the modulation of miRNAs in mTECs since these RNA species are transcribed by RNA Pol II. Continuing with this line of studies, in this study we demonstrate for the first time that Aire also modulates the expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) in mTECs. For this, we used the loss-of-function strategy to analyze the expression of this RNA species, as well as mRNAs in mTEC Aire + / + or Aire knockout mTEC cells (KO Aire - / -) obtained by the gene editing by Crispr-Cas9. The transcriptome of these cells, whether or not adhered to thymocytes, was then analyzed by microarray hybridizations. This demonstrated that Aire and cell adhesion influence the expression of both mRNAs and lncRNAs. The reconstruction of lncRNAs-mRNAs interaction networks made possible to evidence a new post-transcriptional regulation pathway in mTEC cells. **Keywords** Medullary thymic epithelial cells (mTECs), Autoimmune Regulator (*AIRE*), CRISPR-Cas9, Long noncoding RNA, Gene expression, Cell adhesion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUTURA ANATÔMICA DO TIMO E INVOLUÇÃO TÍMICA.	21
FIGURA 2 LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DO TIMO.	23
FIGURA 3 MECANISMOS DE SELEÇÃO NEGATIVA E POSITIVA NO AMBIENTE TÍMICO.	23
FIGURA 4 DIVERSIDADE DE ANTÍGENOS PRÓPRIOS EXPRESSOS EM CÉLULAS MTECS.....	27
FIGURA 5 AIRE E FEZF2 NA EXPRESSÃO DE TRAS.....	28
FIGURA 6 GRÁFICO REPRESENTANDO A PROPORÇÃO DE TRAS EM MTECS REGULADOS PELOS GENES AIRE E FEZF2	29
FIGURA 7 REGIÕES CODIFICANTES DO GENE AIRE EM HUMANOS E CAMUNDONGOS E SEUS RESPECTIVOS DOMÍNIOS	30
FIGURA 8 INDUÇÃO DA PGE VIA AIRE EM ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS PROTEÍNAS.	32
FIGURA 9 DESCRIÇÃO DOS PRINCIPAIS SINAIS CLÍNICOS APRESENTADOS NO ESTABELECIMENTO DA DOENÇA EM PACIENTES COM APECED.....	33
FIGURA 10 MUTAÇÕES DESCRITAS NOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA AIRE	34
FIGURA 11 ESTRUTURA E INTERAÇÃO DOS LNCRNAs.	37
FIGURA 12 DIFERENTES INTERAÇÕES ENTRE LNCRNA E MIRNA.	38
FIGURA 13 CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO DOS LNCRNAs..	39
FIGURA 14 WESTERN BLOT DA PROTEÍNA AIRE EM MTECS KO E WT.	61
FIGURA 15 CO-CULTIVO DE MTECS – TIMÓCITOS MOSTRADOS POR UMA MICROFOTOGRAFIA.	62
FIGURA 16 ANÁLISE DO ÍNDICE DE ADESÃO ENTRE MTECS – TIMÓCITOS.	62
FIGURA 17 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.	63
FIGURA 18 HEATMAP EVIDENCIANDO O PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS..	64
FIGURA 19 TOP GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTEC WT 3.10 CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS NOS TEMPOS DE 12 E 36H.....	65
FIGURA 20 ANÁLISE IN SILICO (A-D) DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DOS MRNAS MODULADOS NAS CÉLULAS MTECS WT EM CO-CULTIVO COM TIMÓCITOS NOS TEMPOS DE 12 E 36H	67
FIGURA 21 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS VALORES DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS MTEC 3.10 KO PARA O GENE AIRE.....	68
FIGURA 22 HEATMAP DO AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO DOS MRNAS MODULADOS NAS CÉLULAS MTECS KO PARA O GENE AIRE EM CO-CULTIVO COM TIMÓCITOS NOS TEMPOS DE 12 E 36H.....	69
FIGURA 23 TOP GENES LONGO NÃO CODIFICANTES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTEC AIRE ^{-/-} CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS.	70
FIGURA 24 ANÁLISE IN SILICO DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NAS CÉLULAS MTECS KO PARA O GENE AIRE EM CO-CULTIVO COM TIMÓCITOS NOS TEMPOS DE 12 E 36H	67

FIGURA 25 HEATMAP DOS LNCRNAS MODULADOS NAS CÉLULAS MTECS WT EM CO-CULTIVO COM TIMÓCITOS.	74
FIGURA 26 TOP RNAS LONGO NÃO CODIFICANTES (LNCRNAS) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTEC 3.10 WT CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS.	74
FIGURA 27 HEATMAP DO AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO NÃO SUPERVISIONADO DOS LNCRNAS MODULADOS NAS CÉLULAS MTECS AIRE ^{-/-} PARA O GENE AIRE EM CO-CULTIVO COM TIMÓCITOS	75
FIGURA 28 TOP RNAS LONGO NÃO CODIFICANTES (LNCRNAS) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTEC 3.10 AIRE ^{-/-} CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS.	76
FIGURA 29 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO E DOS LNCRNA MODULADOS NAS CÉLULAS MTEC 3.10 CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS NAS CONDIÇÕES WT (A) E KO (B).	77
FIGURA 30 PAINEL GERAL DA LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS LNCRNAS.	78
FIGURA 31 REDE DE INTERAÇÃO DOS MRNAS ALVO DOS LNCRNAS (WT)	82
FIGURA 32 REDE DE INTERAÇÃO DOS MRNAS ALVO DOS LNCRNAS (KO).	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 GENES CODIFICANTES MAIS PRÓXIMO DO LNCRNA.....	78
TABELA 2 LNCRNAS E SEU POTENCIAL CODIFICADOR.....	81
TABELA 3 MRNAS ALVOS DOS LNCRNAS PREDITOS PELA FERRAMENTA LNCTAR.....	83
TABELA 4 MRNAS ALVOS DOS LNCRNAS PREDITOS PELA FERRAMENTA LNCTAR.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

~	aproximadamente
°C	graus Celsius
3'	extremidade 3'
5'	extremidade 5'
aa	aminoácido
cm ²	centímetros quadrados
kDa	kilodaltons
mL	mililitro
mM	milimolar
pb	pares de base
U	unidade
V	volts
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar

LISTA DE SIGLAS

AIRE: *Autoimmune regulator*

APC: célula apresentadora de antígeno

APECED: (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)

APS1: síndrome autoimune poliglandular do tipo 1

CARD: (Caspase recruitment domain): domínio recrutador de caspase

Cas9: (CRISPR associated protein 9), Proteína 9 associada a CRISPR

Cauda poli A: poli adenilação da porção 3' do RNAm

CBP: proteína ligadora de CREB

CCL19: Chemokine (C-C motif) ligand 19

CCL21: Chemokine (C-C motif) ligand 21

CCL25: Chemokine (C-C motif) ligand 25

CD80: T-Lymphocyte Activation Antigen CD80

cDNA: DNA complementar

CPC: calculador de potencial codificador

CpG: sítios CG

CRISPR: (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas.

cRNA: RNA complementar

CRP: proteína C reativa

cTEC: célula tímica epitelial cortical

Cy3: cianina 3 verde

DC: Célula dendrítica

DM1: Diabetes Mellitus do tipo 1

DN: Duplo negativo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA-PK: proteína quinase

DP: Duplo positivo

EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), Molécula de adesão celular epitelial

FDR (False Discovery Rate), Taxa de falsa descoberta

gRNA: RNA guia

H3K4me3: trimetilação da lisina 4 da histona H3

HDR (homology-directed repair), Reparo direcionado por homologia

Indel: Inserções/deleções

kb: kilobase

KO: knockout, nocaute

lncRNA: RNA longo não codificador

MHC: complexo maior de histocompatibilidade

miRNA: MicroRNA

mRNA: RNA mensageiro

mTEC 3.10: linhagem de células tímicas epiteliais medulares murinas (linhagem contínua)

mTEC: célula tímica epitelial medular

NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), Fator Nuclear Kappa B

NHEJ: (nonhomologous end joining), Junção de extremidades não homólogas

NLS (Nuclear signal localization), Sinal de Localização Nuclear

N-TEF: fator alongador negativo da transcrição

Oct4: fator de transcrição 4 ligador de octâmero

ORF: matriz de leitura aberta

p53: supressor tumoral p53

PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis), Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAM (Protospacer Adjacent Motif), Motivo adjacente ao protoespaçador

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PCR: reação em cadeia de polimerase

PGE: expressão gênica promíscua

PHD (plant homeodomain), Homeodominio de planta

PHD1: domínio tipo dedo de zinco 1

PHD2: domínio tipo dedo de zinco 2

PLP: lipoproteína da mielina

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer), Analisador de efeitos da variação de proteínas

PTA: antígenos de tecidos periféricos

P-TEFb: fator b alongador positivo da transcrição

qRT-PCR: reação de polimerização em cadeia quantitativa e em tempo real

RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B): Receptor ativador de fator nuclear Kappa B

RIN: número de integridade do RNA

RNA pol II: RNA polimerase II

RNA pol III: RNA polimerase III

rRNA: RNA ribossômico

SAND: domínio denominado SP100, AIRE1, nucP41/P75 and DEAF1

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

siRNA: pequeno RNA interferente

Sox2: box 2 da região Y determinante do sexo

SP: Simples Positivo

STAT3: sinal transdutor e ativador da transcrição 3

SVM: máquina de suporte de vetores

TCR: receptor de célula T

TEC: célula tímica epitelial

TRA: receptor de antígeno tecido-específico

Treg: Célula T reguladora

tRNA: RNA transportador

TSSP: Serina protease tímica específica

TTATTA: sítio TATA-box

UCSC: Universidade da Califórnia, Santa Cruz

V(D)J: v = variável, d = diversidade, j = junção.

WT: Wild-type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DO TIMO.....	21
1.2. TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA CENTRAL	24
1.3. EXPRESSÃO GÊNICA PROMÍSCUA (PGE)	26
1.4. GENE REGULADOR AUTOIMUNE (AIRE)	30
1.5. RNAS LONGOS NÃO CODIFICANTES (LNCRNAs)	35
2. HIPÓTESES.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. OBJETIVO GERAL	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5.1. LINHAGEM CELULAR	49
5.1.1. CLONES DE MTEC 3.10 AIRE NOCAUTE OBTIDAS POR CRISPR-CAS9.....	49
5.2. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR (MTEC-TIMÓCITO)	50
5.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	51
5.4. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DAS PREPARAÇÕES DE RNA TOTAL.....	52
5.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS PREPARAÇÕES DE RNA TOTAL	53
5.6. PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO	54
6. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)	54
7. WESTERN BLOT.....	55
7.1. OLIGOMICROARRAYS	55
7.2. ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRAYS	56
7.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS PARA OBTENÇÃO DOS TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	57
7.4. ANÁLISE FUNCIONAL <i>IN SILICO</i>	57
7.5. IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS RNAS LONGOS NÃO CODIFICANTES.....	57
7.6. CLASSIFICAÇÃO DOS RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES	58
7.7. IDENTIFICAÇÃO E POSICIONAMENTO DOS GENES CODIFICADORES MAIS PRÓXIMOS DOS LNCRNAs	58
7.8. ANÁLISE DO POTENCIAL CODIFICADOR DOS RNA LONGOS NÃO CODIFICANTES UTILIZANDO O CPC 2	58
7.9. ANÁLISE DOS ALVOS (RNAs CODIFICADORES) DE LNCRNAs	59
8. RESULTADOS	61
8.1. ANÁLISE POR WESTERN-BLOT DOS EFEITOS DAS MUTAÇÕES DE AIRE.....	61

8.2. ANÁLISE DA ADESAO ENTRE MTECS-TIMÓCITOS	62
8.3. ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTECS WILD-TYPE CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS.....	63
8.4. LNCRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MTECS KO PARA O GENE AIRE	63
8.5. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL (MTEC 3.10 WT).....	66
8.6. ANÁLISE DE MRNA EM CÉLULAS MTEC 3.10E6 AIRE KO	68
8.7. CARACTERIZAÇÃO DOS LNCRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS MTEC 3.10 WT CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS	73
8.8. ANÁLISE DOS LNCRNAS EM CÉLULAS MTEC 3.10E6 AIRE KO CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS..	75
8.10. DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA DOS LNCRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	78
8.11. IDENTIFICAÇÃO E POSICIONAMENTO DOS GENES CODIFICADORES MAIS PRÓXIMOS	78
8.12. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CODIFICADOR DOS LNCRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	81
8.13. REDE DE INTERAÇÃO ENTRE OS LNCRNAS E SEUS ALVOS (MRNAS) EM CÉLULAS MTEC 3.10 (WT)	82
8.14. REDE DE INTERAÇÃO ENTRE LNCRNAS E MRNAS ALVOS EM CÉLULAS MTEC 3.10E6 (AIRE KO)	85
9. DISCUSSÃO	88
10. CONCLUSÕES.....	95
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
12. APÊNDICE	104
13. ANEXO.....	119

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Estrutura e função do timo

O timo é um órgão linfóide primário bilobado essencial para a manutenção da tolerância central por meio da seleção e eliminação de células T autoreativas. Com a forma anatômica piramidal e achatado, localiza-se no mediastino do tórax, em posição dorsal à parte superior do esterno e ventral aos grandes vasos do coração e à traqueia. Iniciando na periferia dos lóbulos com invasão de tecido adiposo, o timo passa um processo conhecido como involução tímica (Figura 1). O timo se desenvolve altamente durante a vida fetal, mas ao longo da vida adulta, com o aumento da idade do indivíduo, sofre um constante processo de involução (TAUB; LONGO, 2005; REZZANI et al., 2014).

Com o envelhecimento, a expressão de Foxn1 no timo e os níveis de esteroides sexuais são essenciais e desempenham papéis críticos na condução ativa para senescência celular e a involução do timo. Como resultado, um declínio exponencial na produção de células T e uma diminuição de respostas imunológicas. (MILLER, 2002; CHINN et al., 2012; GUI et al., 2012; REZZANI et al., 2014).

Figura 1 Estrutura anatômica do timo e involução tímica. (Fonte: Adaptado de Musculoskeletal Key, 2018. site: <https://musculoskeletalkey.com/>). Acesso em 10 de julho de 2018.

O timo desempenha um papel crucial no estabelecimento do desenvolvimento de um sistema imunológico normal, por meio de uma população diversificada de linfócitos T funcionais em resposta a antígenos não próprios e tolerante a antígenos próprios. Em camundongos recém-nascidos que passam por cirurgia de retirada do timo, timectomia, apresentam uma maior suscetibilidade a infecções intercorrentes associado com respostas imunes debilitadas e tecidos linfoides pouco desenvolvidos (MILLER, 2002).

Advindos de uma origem embrionária de células epiteliais tímicas (TECs) em comum, uma especialização ocorre no último período de gestação que separa o timo em duas principais regiões, o córtex e a medula (TAUB; LONGO, 2005). As células tímicas epiteliais corticais (cTECs) e as células tímicas epiteliais medulares (mTECs) (TAUB; LONGO, 2005; ANDERSON; TAKAHAMA, 2012). O córtex e a medula são formados por um epitélio altamente especializado, caracterizado por uma diferenciação morfológica e funcional e que ao longo do desenvolvimento das células do timo atingem um estado estacionário (KOO; PEPPARD; HATZFELD, 1982; TAUB; LONGO, 2005; REZZANI et al., 2014).

O microambiente que compõem o timo, conhecido como estroma tímico, tem como característica uma rede de diferentes células como fibroblastos, células mesenquimais não fibroblásticas, células de tecido conjuntivo, endoteliais, células dendríticas (DCs), macrófagos, células hematopoiéticas CD45+ e células epiteliais formando a matriz na qual as células progenitoras linfoides T (timócitos) se desenvolvem. (REZZANI et al., 2014). Separado por duas regiões bem definidas, cada lóbulo do timo tem uma parte periférica, a região cortical, e uma parte central, mais clara, a região medular (Figura 2) (TAUB; LONGO, 2005; REZZANI et al., 2014). Essas estruturas básicas, tipos celulares e organização linfocitária na região cortical e medular, apresentam características evolutivas preservadas em diferentes espécies de vertebrados (Figura 2) (REZZANI et al., 2014).

Figura 2 Localização anatômica do timo. A) Visualização esquemática da posição anatômica do timo em humanos e camundongos. **B)** Corte histológico longitudinal evidenciando os lóbulos tímicos e a região da medula (tom mais claro) e região cortical (tom mais escuro) (Fonte: Adaptado de HSC Boards Wiki, 2018).

As cTECs contribuem na maturação dos timócitos e na seleção positiva de células T, processo que consiste na interação das cTECs com os timócitos e reconhecimento do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) próprio. Assim, as células que passam com sucesso por essa seleção amadurecem em células T duplo positivas (DP) $CD4^+ CD8^+$ e se acumulam no córtex (GOLDMAN et al., 2005; PASSOS et al., 2018). Enquanto, as mTECs são essenciais para o estabelecimento da auto tolerância com a expressão do gene regulador autoimune (Aire) e no desenvolvimento de células T por meio da expressão de apresentação de numerosos antígenos próprios, pela indução da deleção clonal, eliminando as células T auto reativas e induzindo a diferenciação e geração de células T reguladoras (Treg) (Figura 3) (HOGQUIST; BALDWIN; JAMESON, 2005; NISHIJIMA et al., 2018).

1.2.Tolerância Imunológica Central

Advindos da medula óssea, os precursores de timócitos não expressam TCR ou os correceptores CD4⁺ e CD8⁺, e migram para o córtex do timo, onde os

TCRs são gerados por rearranjo de DNA e selecionados positivamente por meio de sua capacidade de interação com Moléculas do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) (KLEIN et al., 2014; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017). Inicialmente serão expressos TCRs $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ para posteriormente as células T $\alpha\beta$ desenvolverem em células T CD4⁺ restritas MHC de classe II, ou CD8⁺ restritas ao MHC de classe I. Moléculas de quimiocinas (CCL, CCL25, CXCL), moléculas de adesão como a P-selectina e citocinas como interleucina (IL)-7, são essenciais no processo maturação dos timócitos (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

A seleção positiva ocorre no córtex do timo promovendo a diferenciação dos timócitos em células T CD4⁺ ou CD8⁺ (STARR; JAMESON; HOGQUIST, 2003; ANDERSON; TAKAHAMA, 2012). Essa diferenciação ocorre quando as células T CD4 e CD8 reconhecem, por meio da apresentação de cTECs, o complexo formado pelo peptídeo e pela molécula de MHC (ANDERSON; TAKAHAMA, 2012; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017). De acordo com a afinidade com as moléculas de MHC (classe II ou I) se diferenciam em células T CD4⁺ e CD8⁺ respectivamente e induzem a expressão do receptor de quimiocina CCR7 e de várias citocinas da família do TNF, incluindo RANKL (receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ /ligante) que se liga ao receptor RANK. Esse receptor para RANKL, o RANK, é expresso em mTECs, bem como, os ligantes do CCR7, CCL19 e CCL21, também são altamente expressos induzindo, além do crescimento e maturação da medula tímica (RANKL / RANK / CD40L), a migração dessas células em direção a medula do timo (KUROBE et al., 2006; FÖRSTER; DAVALOS-MISLITZ; ROT, 2008; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

O processo de seleção negativa ocorre na medula do timo, as células T selecionadas positivamente no córtex migram para a medula e são expostos a um conjunto diversificado de auto antígenos apresentados por mTECs e DCs. Uma interação que normalmente culmina na deleção clonal de células T autorreativas (STARR; JAMESON; HOGQUIST, 2003).

Dada a expressão de proteínas (antígenos) em tecidos específicos do corpo, torna-se fundamental que as mTECs expressem um grande número de antígenos restritos a tecidos (TRAs) para o controle da autoimunidade. Certos TRAs são transferidos de mTECs para células dendríticas na medula, enfatizando ainda mais a importância da produção TRAs por mTECs. Quase

todas as células T que reconhecem complexos auto-antígeno-MHC com certa avides são deletadas por mTECs e células dendríticas tímicas (STARR; JAMESON; HOGQUIST, 2003; KLEIN et al., 2014; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

Na medula tímica as células T em desenvolvimento circulam em torno de 4 a 5 dias e quando essas células expressam um TCR funcional sem reatividade significativa aos auto antígenos, migram para os órgãos linfoides secundários, como os linfonodos e o baço e são distribuídos para atuarem por todo o corpo (KLEIN et al., 2014).

1.3. Expressão gênica promíscua (PGE)

Para o bom funcionamento do sistema imunológico adaptativo, torna-se necessário reconhecer e distinguir moléculas que são próprias e não próprias do organismo. A expressão de antígenos que são predominantemente expressos em tecidos específicos (TRAs) no timo se intitula como expressão genica promíscua (PGE) (DERBINSKI et al., 2001, 2016; GOTTER et al., 2004).

Como característica peculiar do timo, sua população de células epiteliais medulares (mTECs) expressam na sua superfície mais de 19.000 genes que representam virtualmente uma gama diversificada de antígenos específicos dos próprios tecidos do corpo e pode induzir a tolerância a uma ampla gama de TRAs o que as difere de outras células epiteliais comuns (Figura 3). Essa expressão ectópica por mTEC, que representa aproximadamente 60% do genoma total do camundongo, tem um relevante papel na tolerância e autoimunidade das células T, dando luz a PGE (DERBINSKI et al., 2001, 2005, 2016; SANSOM et al., 2014).

A indução da PGE tem sido associada essencialmente com o gene regulador autoimune (Aire), um fator de transcrição não clássico que induz a expressão de TRAs dependentes de Aire em mTECs. No entanto, existem uma grande parcela de genes de TRAs que são induzidos na ausência de Aire (DERBINSKI et al., 2005), mostrando que existem outros reguladores transcricionais sejam funcionais na indução de auto-antígenos em mTECs (Figura 4) (KYEWSKI; DERBINSKI, 2004; DERBINSKI et al., 2005).

Um estudo recente, baseado na ampla gama de TRAs que são expressos em mTECs *Knockout* (KO) para Aire, sugeriu a possibilidade de que outros fatores de transcrição ou moléculas regulatórias, poderiam estar envolvidas na regulação e expressão de TRAs em mTECs. A significativa expressão do gene *Fezf2* no timo de camundongos e humanos e na ampla gama de TRAs que continuavam a ser expressos em mTECs *Knockout* para Aire, sugeriu que esse fator de transcrição também poderia regular a expressão de TRAs em mTECs.

Figura 4 Diversidade de antígenos próprios expressos em células mTECs. Potencial de expressão de milhares de TRAs, representando virtualmente todos os tecidos do corpo na superfície das mTECs. (Fonte: Kyewski & Derbinski, 2004)

Embora o gene *Aire* e *Fezf2* sejam expressos em mTECs, ambos são regulados por vias de sinalização distintas e promovem a expressão de diferentes classes de proteínas. Assim, demonstrado em estudo que dois fatores independentes, *Fezf2* e *Aire*, permitem a expressão de TRAs no timo para garantir a tolerância imunológica (KLEIN, 2015; TAKABA et al., 2015) (Figura 5).

A expressão de *Aire* se limita principalmente no timo, e atua como um fator de transcrição não clássico, pois não se liga diretamente a regiões específicas do DNA para a transcrição de TRAs e regula a expressão ectópica de mais de 3200 genes em mTECs que correspondem aproximadamente 28,9% do total de TRAs. A interação da proteína AIRE se dá por meio de um complexo transcricional de fatores nucleares, como histona H3 e o recrutamento

preferencial de Aire para sítios de repressão seletiva por meio do complexo de proteínas ATF7ip-MBD1, para liberar, “empurrando” as moléculas de RNA Pol II que se encontram em repouso funcional nas regiões promotoras dos genes (GIRAUD et al., 2012; WATERFIELD et al., 2014).

Figura 5 Aire e Fezf2 na expressão de TRAs. Expressão promíscua de antígenos restritos ao tecido (TRAs) em mTECs via Aire e via fator de transcrição Fezf2. Uma regulação por sinalizações distintas e expressão de diferentes genes de TRAs em mTECs, garantindo a tolerância central imunológica (Fonte: Takaba et al., 2015).

Em contraste o gene Fezf2, tem sua expressão funcional que vai além das mTECs no timo, desempenhando um papel, por exemplo, no sistema nervoso central. Um estudo publicado por Takaba e colaboradores (2015), mostrou que Fezf2 regula aproximadamente 21,1% de TRAs não dependentes de Aire, por meio de um domínio de ligação direta ao DNA. Juntos, Aire e Fezf2 compartilham em torno de 12% da indução da expressão dos mesmos TRAs e um total de 62,3% de TRAs dependentes (TAKABA et al., 2015) (Figura 6).

Figura 6 Gráfico representando a proporção de TRAs em mTECs regulados pelos genes Aire e Fezf2. (Fonte: Takaba et. al., 2015).

O estágio de maturação das mTECs influencia diretamente na diversidade de TRAs apresentados na superfície da célula. As mTECs em um estado de maturação mais avançado e que apresentam alta expressão de MHCII, CD80 e AIRE ($CD80^{high}MHCII^{high}AIRE^{+}$) são mais aptas a PGE (DERBINSKI et al., 2005). Contudo, embora toda a população de mTECs maduras estejam aptas a expressar quase todos TRAs, cada TRA só é expresso por uma pequena fração (1 -3%) das mTECs em determinados momentos (KLEIN et al., 2014).

A falha em estabelecer ou manter a auto tolerância pode levar a autoimunidade e gerar quadros de doenças autoimunes clássicas, como artrite reumatoide, diabetes tipo 1 e esclerose múltipla. Os mecanismos de regulação molecular da PGE ainda permanecem parcialmente incompreendidos.

1.4. Gene regulador autoimune (Aire)

O gene regulador autoimune (Aire), tem 11.9 kb de comprimento, localiza-se no cromossomo 21q22.3 em humanos, contém 14 exons que codifica para um mRNA de 1635 nucleotídeos, que por sua vez codifica uma proteína de 545 aminoácidos. No camundongo (*Mus musculos*) localiza-se no cromossomo 10 na posição de citobanda 39.72 cM, tem 13kb de comprimento e codifica para um mRNA de 14 exons que codifica para uma proteína de 545 resíduos de aminoácidos com aproximadamente 77% de identidade com o genoma humano (Figura 7) (BLECHSCHMIDT et al., 1999; MATHIS; BENOIST, 2007).

Figura 7 Regiões codificantes do gene Aire em humanos e camundongos e seus respectivos domínios (Fonte: Passos et al, 2018)

Embora seja preferencialmente expresso no timo e em células mTEC, a expressão de Aire já foi observada em vários tecidos e células, como pâncreas, córtex supra renal e na periferia em monócitos e células dendríticas (FAN et al., 2009; PALMA et al., 2013). Os TRAs induzidos por Aire são encontrados exclusivamente em mTEC^{high} (mTECs maduras Aire⁺ MHCII^{high} CD80^{high}), enquanto os TRAs independentes do AIRE são detectados não apenas em mTEC^{high}, mas também em cTEC e mTEC^{low} (Aire⁻ MHCII^{-/lo}CD80^{-/lo}), classificação baseada de acordo na expressão baixa ou alta de moléculas de CD80 e MHC de classe II (DERBINSKI et al., 2001; ROSSI et al., 2007; ULYANCHENKO et al., 2016). Essa expressão de TRAs pode ser considerada não aleatória e simultaneamente “estocástica” e “ordenada”. Aire induz a expressão estocástica de TRAs individualmente em mTECs, uma pequena quantidade (1-3%) do número total de mTECs em um determinado momento

expressa um conjunto de TRAs específicos e a expressão ordenada refere-se a uma maior probabilidade de que um conjunto de genes de TRAs frequentemente será co-expresso individualmente em uma determinada mTEC (DERBINSKI et al., 2008; PINTO et al., 2013; BRENNECKE et al., 2015; MEREDITH et al., 2015; ANDERSON; SU, 2016; SU et al., 2017).

A expressão de TRAs se dá por meio da interação da proteína AIRE em parceria com outras proteínas, funcionalmente para: processos transcricionais de ligação à cromatina e liberação da RNA polimerase II (RNA pol II) ancorada, alongamento na fita de RNA, processamento do pré-mRNA, busca e reconhecimento de genes de TRAs, bem como na auto regulação de AIRE e no transporte nuclear da proteína. Essa associação do complexo proteico, leva a ativação da PGE quando recrutadas para os locais gênicos de início de transcrição (TSS), local onde a RNA pol II está ancorada (ABRAMSON et al., 2010; ABRAMSON; GOLDFARB, 2016).

Para que ocorra a transcrição, modificações de histonas e desacetilação mediada por SIRT-1 permitem que TOP2a induza a mudanças epigenéticas e relaxamento da cromatina nas regiões de início de transcrição permitindo o recrutamento do complexo pTEFb / BRD4, liberando o RNA Pol II e o subsequente alongamento da transcrição (ANDERSON; SU, 2016; SU et al., 2017).

Como dito anteriormente, a proteína AIRE impulsiona a RNA Pol II que já deu início a uma pequena região de transcrição e permanece ancorada na cromatina dando início ao alongamento da transcrição promíscua de espécies de RNAs codificantes e RNAs não codificantes (Figura 8). Como demonstrado por nosso grupo, a redução parcial do gene Aire levou a mudança na expressão de pequenas moléculas de microRNAs em mTECs e existem miRNAs que atuam no controle pós-transcricional de Aire (Figura 8) (MACEDO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 8 Indução da PGE via Aire em associação com outras proteínas. Associação de AIRE com outras proteínas funcionais e sua ligação na cromatina para a transcrição promíscua de TRAs/PTAs. Além da expressão de TRAs, a indução promovida para ação da RNA POL II leva a expressão de moléculas de RNAs não codificantes (Fonte: Passos et al, 2018).

Mutações ao longo do gene Aire e variações genéticas que afetam diretamente sua atividade levam a distúrbios na homeostase imunológica ou doenças autoimunes em humanos, como à síndrome poliglandular autoimune tipo 1 (APS-1, também conhecida como APECED), uma doença autossômica recessiva rara e clinicamente definida pela presença dos achados patognomônicos como, hipoparatiroidismo candidíase mucocutânea crônica e insuficiência adrenal primária (Figura 9) (BRUSERUD et al., 2016).

Figura 9 Descrição dos principais sinais clínicos apresentados no estabelecimento da doença em pacientes com APECED. Quadro clínico altamente variável, com característica de inflamação generalizada das mucosas. Principais componentes se destacam com a presença de candidíase mucocutânea crônica, insuficiência adrenal primária e hipoparatiroidismo (Fonte: Bruserud, Oftedal Wolff, & Husebye, 2016)

Em humanos, mutações em Aire tem levado a uma maior compreensão dos domínios que o formam. A mutação mais comum no mundo, encontrada na Finlândia e países do Leste Europeu, denominada como mutação principal finlandesa p.R257*, se localiza em um dos quatros principais domínios de Aire conhecido como domínio SAND (Figura 10) (BRUSERUD et al., 2016).

Figura 10 Mutações descritas nos domínios funcionais da proteína AIRE. Distribuição das mais de 100 mutações que já foram descritas ao longo dos subdomínios funcionais de AIRE (Fonte: Bruserud, Oftedal Wolff, & Husebye, 2016).

A saber, Aire se estrutura em 4 domínios funcionais conhecidos como CARD, SAND, NLS e PHD. O domínio CARD (domínio de recrutamento de caspases) é essencial para a oligomultimerização de AIRE, portanto alterações nesse domínio podem levar ao comprometimento da multimerização do complexo AIRE. O domínio SAND (nomes anteriores SP100, AIRE1, NucP41 / P75 e DEAF1) está envolvido na regulação transcricional associado à cromatina por meio da ligação proteína-proteína e a ligação ao DNA. O domínio NLS (Sinal de Localização Nuclear) medeia a migração da proteína AIRE do citoplasma para o núcleo. E os domínios PhD1-2 (homeodomínio de plantas 1-2) envolvidos na leitura dos códigos de histonas e no remodelamento da cromatina (ABRAMSON et al., 2010; BRUSERUD et al., 2016; ABBOTT et al., 2018)

A função de Aire vai além da expressão de TRAs em mTECs, dos mais de 3000 genes que induzidos por Aire em mTECs apenas 25% são classificados como TRAs. Adicionalmente Aire está envolvido, por exemplo, no desenvolvimento de células Treg, modulação de quimiocinas, diferenciação de mTECs. A deficiência de Aire impede a expressão de marcadores de superfície

como queratina 6 (K6), K10, involucrina e SPINK5 para maturação final das mTECs e interação entre mTECs e timócitos no processo de adesão celular. Uma rede celular, para a maturação dos timócitos, composta por proteínas de matriz extracelular (ECM) como lamininas, integrinas, colágenos e fibronectinas, bem como moléculas solúveis como hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (MENDES-DA-CRUZ et al., 2012; SAVINO et al., 2015).

Em um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a inibição parcial do gene Aire nas mTECs 3.10 induzida por siRNA, resultou em um decréscimo da capacidade de adesão entre mTEC-timócito (PEZZI et al., 2016), reafirmando a influência do gene Aire no ambiente da matriz celular tímica, onde há a interação entre as células T imaturas em desenvolvimento com o microambiente tímico.

1.5. RNAs longos não codificantes (lncRNAs)

As moléculas de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) representam uma classe de RNAs classificados convencionalmente em tamanho >200 nucleotídeos. Estima-se que, em humanos, o número de transcritos de lncRNAs podem variar de 5.000 a 15.000, entretanto considera-se um valor subestimado tendo em vista a pouca sobreposição entre os diferentes bancos de dados de lncRNAs (ZHENG et al., 2007; PAYRE; DESPLAN, 2016; CHOI; KIM; NAM, 2018).

A expressão dos lncRNAs é considerada tecido específica, uma especificidade que pode ter sido evolutivamente conservada ao longo do tempo, e o seu local de expressão poderá indicar sua função específica naquele tecido. Como principais características definidas dos lncRNAs, se destacam a ausência de matriz de leitura aberta (do inglês *Open Read Frame* - ORFs), capacidade de regulação cis ou trans e presença ou não de cauda poli A (PONTING; OLIVER; REIK, 2009; RINN; CHANG, 2012; MERCER; MATTICK, 2013).

Contudo, os componentes de RNA codificante e de RNA não codificante, presentes nessas moléculas, levam a um paradoxo de uma possível bifuncionalidade o que dificulta uma classificação definida nos bancos de dados (ZHENG et al., 2007; MERCER; MATTICK, 2013).

Os lncRNAs podem regular em múltiplos níveis na via de controle da expressão gênica, como por exemplo na regulação pós-transcricional por meio do controle de processos da síntese proteica, maturação e transporte de RNAs, no silenciamento gênico transcricional e via de regulação da estrutura da cromatina (KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013; MERCER; MATTICK, 2013).

As diversas estruturas desses RNAs envolvem mecanismos que levam a diferentes resultados regulatórios, cujas funções ainda estão caminhando para serem mais bem elucidadas. Algumas funções dos lncRNAs tem sido associadas a regulação da modificação da cromatina silenciando vários genes por meio da interação com DNA e/ou proteínas modificadoras da cromatina (RINN; CHANG, 2012; MERCER; MATTICK, 2013).

Quanto a forma estrutural, os lncRNAs não têm um arquétipo molecular único. Podem funcionar por meio de domínios estruturais, que possibilitam a interação com o DNA ou RNA por meio do emparelhamento de bases de ácidos nucleicos ou com proteínas por meio de estruturas de RNA de ordem superior. Com a possibilidade de transcrever o próprio lncRNA e exercer efeitos reguladores de genes por meio de mudanças na acessibilidade da cromatina ou até mesmo levar o fator de transcrição aos promotores do gene-alvo (Figura 11) (LIANG; BLOOM; SMOLKE, 2011; ZHANG; TAO; LIAO, 2017).

Uma grande parte dos lncRNAs que já foram encontrados, modulam a transcrição por ligação no DNA alvo em regiões específicas da cromatina. Outras classes de lncRNAs atuam por meio da interação RNA-RNA, como por exemplo, servem de 'esponjas' de miRNAs, mecanismo pelo qual o lncRNA serve de ligação com os miRNAs o que impede a ligação desse último com seu mRNA alvo funcional (Figura 12). Outra interação funcional dos lncRNAs é a ligação com proteínas, recrutando aquelas com função de modificar a estrutura da cromatina e responsáveis por regular a expressão genica via modificação química de histonas para locais de transcrição (ZHANG; TAO; LIAO, 2017).

Figura 11 Estrutura e interação dos lncRNAs. **a)** Os lncRNAs podem apresentar diferentes sítios de ligação, denominados domínios estruturais que os possibilitam detectar ou se ligar a RNAs, proteínas e ao DNA. **b)** Por meio de splicing alternativo, os domínios estruturais podem combinar-se modulando essa estrutura. Em **b**, cada linha representa um lncRNA e as cores estão associadas aos domínios estruturais mostrados em **a**. Como mostrado em **c**, a ligação de uma fita de RNA (em cinza) impede que seja feita uma ligação com a proteína, isso possibilita que os lncRNAs possam atuar como dispositivos de controle, por meio de domínios sensoriais ou acopladores, regulando a interação com outras moléculas. **d)** Os lncRNAs podem estruturar um complexo molecular com outras proteínas. **e)** Recrutamento de proteínas e direcionamento de seus sítios catalíticos para locais alvos na cromatina (Fonte: Mercer, 2013)

Figura 12 Diferentes interações entre lncRNAs e miRNAs. A) lncRNAs podem atuar como “gene hospedeiro” e dar origem a miRNAs. **B)** Os miRNAs podem promover a degradação dos lncRNAs. **C)** Competição entre lncRNAs e miRNAs para ligar-se ao mRNA alvo. **D)** lncRNAs podem atuar como esponja e atrair os miRNAs dos mRNAs alvos (Fonte: Zang, 2017)

A posição genômica dos lncRNAs em relação ao locus dos mRNAs codificadores de proteínas dá origem a sua classificação, podendo ser: Antisense, que representam transcritos com interseção com algum exon ou intron de genes codificantes de proteínas e se localizam na fita oposta; RNAs não codificantes intergênicos longos (lincRNAs), no qual sua origem está entre dois genes codificantes de proteínas; *Sense overlapping*, são os lncRNAs cujos os íntrons abrigam sequências com potencial codificação para proteínas e localiza-se na mesma fita sem sobreposição de exons; *Sense intronic*, lncRNAs que estão localizados dentro de introns de genes codificantes de proteínas, sem interseção com exons (Figura 13) (RINN; CHANG, 2012; KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013; MERCER; MATTICK, 2013; IMAMURA et al., 2014).

Figura 13 Classificação de acordo com a localização genômica dos lncRNAs. A localização pode ser classificada em bidirecional (divergente) e antisense, relativo a genes codificadores de proteínas ou em íntrons de genes codificadores de proteínas. Os lncRNAs classificados como intrônicos são lncRNAs que sua localização inicia dentro de um íntron de um gene codificador de proteína em qualquer direção e termina sem sobreposição de exons. E os lncRNAs podem ser encontrados em regiões intergênicas e agrupados com genes codificadores de proteínas em complexos locus de transcrição (Fonte: Rinn, 2012).

No sistema imunológico, o primeiro lncRNA identificado foi o intergênico lincRNA-Cox2, responsável por ativar e inibir diferentes classes de genes com função inflamatória, por meio da interação física com vários complexos reguladores, sendo almejado como um futuro potencial para alvos farmacológicos (CARPENTER et al., 2013). Neste mesmo período, foram identificados regiões que codificam para lincRNAs responsáveis por promover o desenvolvimento e diferenciação de células T (HU et al., 2013).

Outros estudos indicam que os lncRNAs podem atuar, por exemplo, em processos como a diferenciação de células TH17 e CD4⁺ e ativação de mecanismos da inflamação e ativação de células T (HUANG et al., 2015; WALLAERT et al., 2017). Neste último caso, o papel do lncRNA-CD244 foi associado com uma restrição da ativação excessiva de células T CD8⁺ (WANG et al., 2015).

Hipótese

2. Hipóteses

- 1) O gene Aire regula simultaneamente a expressão de mRNAs e de lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) (Figura 8).
- 2) A interação com timócitos modula a expressão de lncRNAs em células mTECs.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão de mRNAs e de lncRNAs em células mTEC e a modulação dessas espécies de RNAs sob a influência da adesão com timócitos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de mRNAs em células mTECs linhagem 3.10 Aire^{+/+} após a adesão com timócitos.
- Avaliar a expressão de mRNAs em células mTECs linhagem 3.10 Aire^{-/-} editadas por CRISPR-Cas9 após a adesão com timócitos.
- Avaliar a expressão de lncRNAs em células mTECs linhagem 3.10 Aire^{+/+} editadas por CRISPR-Cas9 após a adesão com timócitos.
- Avaliar a expressão de lncRNAs em células mTECs linhagem 3.10 Aire^{-/-} editadas por CRISPR-Cas9 após a adesão com timócitos.
- Avaliar os processos biológicos nos quais estão envolvidos os RNAs diferencialmente expressos.
- Caracterizar os lncRNAs diferencialmente expressos.
- Localização cromossômica dos lncRNAs diferencialmente expressos.
- Avaliar o potencial codificador dos lncRNAs diferencialmente expressos.
- Identificar os genes codificadores de proteínas mais próximos no genoma dos lncRNAs diferencialmente expressos.
- Avaliar a interação entre os lncRNAs e os seus mRNAs alvos (interação RNA-RNA).

Delineamento experimental

4. Delineamento experimental

Material e Métodos

5. Material e Métodos

5.1. Linhagem celular

Utilizamos a linhagem de células tímicas epiteliais medulares (*Mus musculus*, linhagem mTEC 3.10, MHC II⁺ CD80⁺) gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Wilson Savino, do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

As mTECs 3.10 foram estabelecidas a partir do timo de camundongos recém-nascidos da linhagem C57BL/6 e fenotipadas como células Epcam⁺ Ly51⁻ UEA1⁺ CD80⁺ MHC-II⁺ e que expressam o gene Autoimmune regulator (Aire) (Macedo et al., 2009, Pezzi et al., 2016). As células mTEC 3.10 são aderentes e foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo 15 mL de meio RPMI 1640 (Gibco – El Paso. TX, USA) suplementado com 10% e soro fetal bovino (SFB) (Cultilab – Campinas, SP, Brasil), e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

5.1.1. Clones de mTEC 3.10 Aire nocaute obtidas por CRISPR-Cas9

Neste trabalho foram utilizados clones de células mTECs nocaute (KO) no gene Aire (mTEC Aire^{-/-}) obtidas por meio da ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas9 num estudo prévio realizado em nosso laboratório (Speck-Hernandez et al 2018). O clone denominado mTEC3.10E6 teve como alvo o exon 3 do gene Aire (sequência CCCCTTGCTGGTCCCAAGGCCG cuja localização genômica é GRCm38:10:78030995-78031017) e especificamente no domínio NLS (Sinal de Localização Nuclear). O clone mTEC3.10E6 foi caracterizado como portador de mutações do tipo *indel* afetando ambos os alelos de Aire (nocaute heterozigoto composto). No alelo 1 de Aire, há dois tipos de mutação: substituição T > G (na posição 351 do mRNA) seguida por uma deleção de nove pb (GCTGGTCCC, posições 352-360 do mRNA) transcrevendo um RNAm de 1.647 nt. Já no alelo 2, houve uma única deleção de G na posição 352 do mRNA que transcrevendo um mRNA de Aire com 1.655 nt.

Análises *in silico* da tradução da proteína Aire no clone mTEC 3.10E6 e alinhamento das sequências polipeptídicas por meio do programa Clustal

Omega mostraram que a substituição T > G no alelo 1 resultou numa mutação silenciosa L118L, enquanto que a deleção de nove pb provocou um erro de leitura do tipo *frameshift* provocando uma deleção de três resíduos de aminoácidos (A119_P121 del) e consequentemente uma proteína Aire menor, com 548 resíduos de aminoácidos.

Análises usando o programa Provean, o qual caracteriza os efeitos funcionais das variações na sequência de aminoácidos mostrou que a deleção dos 9 nt no alelo 1 foi deletéria para o domínio NLS da proteína Aire. Já para o alelo 2, a deleção de um G resultou num códon de parada TGA na posição 352 do mRNA e, consequentemente, uma proteína Aire truncada de 158 resíduos de aminoácidos. De acordo com essas análises, o clone mTEC 3.10E6 é considerado um Aire nocaute heterozigoto composto que expressa uma proteína Aire deletéria proveniente do alelo 1 (Speck-Hernandez et al 2018).

5.1.2. Timectomia e obtenção dos timócitos

Para a obtenção de timócitos, os camundongos foram mortos por inalação de CO₂. Os timos de animais com cinco a seis semanas de idade foram removidos por cirurgia e pinçados para a liberação dos timócitos em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI 1640. Uma malha de nylon com porosidade de 10 µm (Sefar Inc. Depew, NY, USA) foi utilizada para separação dos timócitos. A suspensão de timócitos foi centrifugada por 5 minutos a 1000xg e lavada em PBS. Os timócitos foram então utilizados no ensaio de adesão com as células mTEC 3.10 wt ou o clone mTEC 3.10E6. O projeto científico foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, protocolo número 006/2016-1.

5.2. Ensaio de adesão celular (mTEC-timócito)

Os timócitos foram co-cultivados com células mTECs 3.10 em cultura (mTEC 3.10 wt ou o clone mTEC 3.10E6) na proporção de 50 timócitos para cada célula mTEC. Os timócitos e as mTECs (co-cultivo) foram incubados durante 0, 12 ou 36 horas em atmosfera a 37°C e 5% CO₂. Após o período de adesão, os timócitos não aderidos foram retirados com cuidado e as garrafas de

cultivo lavadas com PBS (1x) pré-aquecido a 37°C para a retirada dos timócitos fracamente aderidos. Em seguida, as garrafas foram lavadas novamente, agora com PBS (1X) gelado para a retirada dos timócitos aderidos e posterior contagem.

As células mTEC 3.10 foram destacadas das garrafas de cultura de 25 cm² utilizando-se 5 ml de solução de tripsina 1x (2.5g de tripsina suína por litro em HBSS) + 0.5ml de EDTA pH 8.0 por 5 minutos, seguido de inativação da tripsina com meio de cultura + SBF e colhidas por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos. Tanto os timócitos quanto as mTECs 3.10 foram quantificados no contador automatizado Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA). De cada garrafa foi calculada a razão entre o número de timócitos aderidos e o número de mTECs. A partir desses valores foi calculado o índice de adesão (IA) cujo cálculo é explicado abaixo. O ensaio foi realizado em triplicada.

$$\text{Índice de adesão (IA)} = \frac{N}{M}$$

*onde N é referente ao número de timócitos aderidos
e M ao número de células mTECs*

5.3. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit mirVana miRNA Isolation Kit da Ambion (Grand Island, NY, USA). Foram selecionados para extração de RNA a linhagem de mTEC 3.10 wt e o clone mTEC 3.10E6 Aire^{-/-} (KO).

As células foram destacadas das garrafas de cultura de 25 cm² por meio da adição de 5ml de solução de tripsina/EDTA por 5 minutos. A tripsina foi inativada com meio de cultura contendo 10% de SFB e as células foram colhidas por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos. O botão de células resultantes

foi lavado duas vezes com PBS estéril e então adicionamos 1ml de solução de lise do kit de extração de RNA.

A mistura foi agitada vigorosamente (pipetagens sucessivas seguidas de 10 segundos no vórtex) para lisar completamente as células. Adicionou-se 100µl de miRNA Homogenate Additive e misturou-se bem (vórtex por 15 segundos). A mistura foi deixada em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de fenol ácido-clorofórmio, e a mistura foi agitada vigorosamente no vórtex por mais 60 segundos.

O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, e então foi adicionado etanol 100% (pelo menos 1,5 vezes do volume recuperado após a centrifugação) à temperatura ambiente.

Para cada amostra foi montada uma coluna com tubo coletor, adicionou-se 700µl da mistura (fase aquosa da extração + etanol) em cada coluna e as mesmas foram centrifugadas por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda a mistura fosse filtrada. Por último, 700µl de miRNA Wash Solution 1 foram adicionados a cada uma das colunas, as quais foram centrifugadas por 10 segundos a 10.000 x g.

O líquido foi descartado, e então 500µl de miRNA Wash Solution 2/3 foi aplicado na coluna e centrifugado por 10 segundos a 10.000 x g. O último passo foi repetido e, após descartar o líquido, o tubo foi centrifugado por 1 minuto para remover resíduos líquidos do filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e a ela foram adicionados 100µl de água MilliQ/DEPC pré-aquecida a 95°C. O tubo foi centrifugado por 30 segundos para a recuperação do RNA total.

5.4. Quantificação e avaliação do grau de pureza das preparações de RNA total

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria UV no aparelho NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*). Neste trabalho consideramos que uma unidade (1U) de absorbância A_{260} corresponde a 40µg de RNA/ml.

Além disso, avaliamos pureza das preparações por meio de cálculo das razões absorbância em diferentes comprimentos de onda de UV. Só utilizamos

amostras livres de fenol que apresentaram razão A_{260}/A_{230} entre 1.8 a 2.0 e livres de contaminação com proteínas razão A_{260}/A_{280} entre 1.8 e 2.0.

5.5. Avaliação da integridade das preparações de RNA total

A integridade das preparações de RNA total foi avaliada por eletroforese microfluídica utilizando RNA 6000 Nano chips e um aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer® Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que anteriormente estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente.

Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando 550µl do RNA 6000 Nano gel em uma coluna com filtro e centrifugou-se a 1.500 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente. Uma alíquota de 65µl foi colocada em um tubo de 0,5 ml livre de nucleases e em seguida, foi adicionado 1 µl de RNA 6000 Nano Dye.

A amostra foi submetida a agitação em vórtex por 10 segundos, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano chip que foi colocado na priming station com os ajustes corretos para a leitura de RNAs. Primeiramente foram pipetados 9µl da mistura gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada à priming station o gel foi distribuído por todo o chip. Em seguida, outros 9µl da mistura foram pipetados nos demais pontos indicados com a letra G.

Foram pipetados 5µl do RNA 6000 Nano Marker em cada uma das amostras, bem como na posição do marcador e 1µl do marcador na posição indicada. Por último, pipetou-se µl de cada amostra de RNA nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, CHN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto e em seguida, colocou-se o chip no bioanalisador para proceder-se a corrida eletroforética.

O resultado (eletroferograma e densitometria dos géis) foi obtido pelo Agilent 2100 Expert Software após 30 minutos de corrida. Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes aos padrões das espécies de RNAr

28S, 18S, 5S e RNAt 4S e com RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9.0 foram utilizadas nos experimentos.

5.6. Preparação do extrato proteico

Com a finalidade de avaliar possíveis variações na expressão da proteína Aire comparando as células mTEC 3.10 wt vs clone KO mTEC 3.10E6, foi aplicado o método western-blot. Para isso, foi necessário preparar o extrato proteico total dessas células. Aproximadamente 5×10^5 células foram semeadas em garrafas de cultura de 25cm^2 contendo 5ml de meio RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram destacadas das garrafas de cultura de 25cm^3 utilizando-se 5ml de solução de tripsina 1x (2.5g de tripsina suína por litro em HBSS) + 0.5ml de EDTA pH 8.0 por 5 minutos, seguido da inativação da tripsina com meio de cultura + SBF e colhidas por centrifugação a $1000 \times g$ durante 5 minutos. As células foram lavadas três vezes com PBS 1x, e centrifugadas a $1000 \times g$ durante 5 minutos. Foram adicionados 400 μ l do tampão RIPA com inibidores de protease e com o auxílio de um sonicador as células foram lisadas. O homogeneizado foi então centrifugado a $10000 \times g$ por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante rico em proteínas (extrato proteico total) foi utilizado na detecção da proteína Aire pelo método de western-blot.

6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel denaturante (SDS-PAGE) foi realizada utilizando-se um sistema de tampão descontínuo. Foram utilizados mini-géis de poliacrilamida (10 x 8 x 0,075 cm), com gel de empilhamento de 4% e géis de separação de 10% ou 12%. As amostras para eletroforese foram preparadas obedecendo-se a proporção em volume 3:1, respectivamente, de amostra e tampão de amostra concentrado 4x (240 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% SDS; 40% glicerol contendo azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95°C a seco. O tampão dos eletrodos conteve 25mM Tris-HCl, pH 8,3; 190mM glicina; 0,1% SDS.

7. Western Blot

Após a corrida de SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas a 70 V para uma membrana de polyvinylidene difluoride (PVEF), utilizando-se 25 mM TrisHCl, 190 mM glicina, 20% metanol e 0,1% SDS como tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S 0,2% em 3% ácido tricloracético por 5 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada com água deionizada e bloqueada por uma hora em leite desnatado Molico a 5% preparado em TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário *Monoclonal Anti-Aire C- 2 Santa Cruz Biotechnology®*, inc (Dallas, Texas, USA), devidamente diluído em TBS-T, por uma hora, seguida de lavagens com TBS-T por cinco vezes de 5 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluído 1:25000 em TBS-T) por 50 minutos. Após incubação fez-se a lavagem da membrana em TBS-T por 5 vezes de 5 minutos e a revelação foi feita através do aparelho ImageQuant™ LAS 500 Ge Life Sciences (Piscataway, NJ, USA), utilizando-se o substrato apropriado para a peroxidase (Luminata™ Forte Merck Millipore). A reação foi conduzida protegida da luz em diferentes intervalos de exposição.

7.1. Oligomicroarrays

A análise do transcriptoma das células mTEC 3.10 wt ou Aire KO mTEC 3.10 E6 foi realizado por meio da tecnologia de hibridações com oligomicroarrays da Agilent *SurePrint G3 Mouse GE 8 x 60K Microarray Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (AMADID: 748091). Os microarrays continham o genoma funcional murinho (*Mus musculus*) completo. Os microarrays continham 60.000 oligos-sondas de 60 mer preparados pelo processo SurePrint (sistema de impressão) em lâminas de vidro (2,5 x 7,5 cm) incluindo sondas de mRNA e de lncRNAs (genoma do camundongo anotado em julho de 2007 = NCBI37/mm9). Utilizamos a metodologia monocolor cianina 3, verde (Cy3) e os procedimentos de amplificação e marcação dos RNAs foram feitos com o Quick Amp Labeling Kit One-Color (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a partir de 100 ng

de RNA total. Foram misturadas as amostras de RNA controle (spike-in) com 100 ng de RNA total para realização da etapa de transcrição reversa com a enzima transcriptase reversa *Monoley Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase (MMLV-RT)*. Além disso, foram utilizados primers adaptados com timinas (T) consecutivas acopladas a um promotor T7 para síntese de cDNAs de dupla fita. Após essa reação, a enzima T7 RNA polimerase foi adicionada juntamente com nucleotídeos marcados com Cy3 (síntese de RNA complementar, cRNAs) e sua posterior amplificação. As amostras de cRNAs foram purificadas e hibridadas em lâminas de microarrays em câmaras de hibridação *Agilent Microarray Hybridization Chambers (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)* a 65°C por 17 horas em um forno rotativo (*Agilent Technologies*). As lâminas foram lavadas com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2*.

7.2. Análise dos dados de microarrays

As lâminas de microarrays foram então escaneadas num aparelho DNA Microarray Scanner (Agilent) e as imagens de hibridação foram salvas e convertidas em valores numéricos com auxílio do programa Feature Extraction Agilent. Os dados numéricos foram então analisados no ambiente R (versão 3.3.2 - R Development Core Team, 2011 disponível em R Project for Statistical Computing (<https://www.r-project.org/>), que consiste em um ambiente estatístico-matemático que permite a execução de múltiplas funções, sendo amplamente empregado em análise de dados de microarray, permitindo ainda execução de cálculos e visualização gráfica dos resultados.

Foram eliminados os dados cujos valores sobrepuseram os valores de background (correção do *background* ou *signal-background*). A fim de remover as variações não biológicas capazes de afetar as medições dos níveis de expressão gênica para tornar os dados comparáveis realizamos a normalização dos mesmos. A normalização foi realizada pela metodologia *quantile*, método considerado robusto que corrige as diferenças nas densidades de probabilidade de todas as amostras (GALLÓN; LOUBES; MAZA, 2013).

7.3. Análise estatística dos dados para obtenção dos transcritos diferencialmente expressos

Para análise dos transcritos diferencialmente expressos utilizamos as funções do pacote Limma (*Linear Models for Microarray Data*) (RITCHIE et al., 2007, 2015), o qual aplica um modelo linear na análise estatística e reajusta os erros padrão segundo um modelo Bayesiano (*Empirical Bayes* e outros métodos), usado para pedir informações através de genes que fazem as análises estáveis mesmo para experimentos com pequeno número de matrizes. O método de *Benjamini Hochberg* foi aplicado para a correção para múltiplos testes (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

7.4. Análise funcional *in silico*

Os mRNAs diferencialmente expressos foram anotados e agrupados segundo suas categorias funcionais (Gene Ontology ou GO) fazendo uso da ferramenta DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Uma das categorias analisadas foi relacionada aos processos biológicos, sendo considerada mais significativa quando exibida pelo menos três genes e um score < 0.05 com correção de *Benjamini-Hochberg*.

7.5. Identificação das sequências dos RNAs longos não codificantes

A identificação das sequências dos lncRNAs foi feita através do University of California, Santa Cruz Genome Browser (UCSC Genome Browser), (disponível em <https://genome.ucsc.edu/>) de acordo com a montagem do genoma murino de dezembro de 2011 (GRCm38/mm10 - NCBI37 - Ensembl release 67), de acordo com as posições cromossômicas e o ID das sondas, cujas sequências foram fornecidas pela *Agilent*.

7.6. Classificação dos RNAs longos não codificadores

A classificação dos lncRNAs foi realizada de acordo com a anotação de cada um deles no *UCSC Genome Browser* e anotação fornecida pela Agilent referente às lâminas de microarray.

7.7. Identificação e posicionamento dos genes codificadores mais próximos dos lncRNAs

Por meio da plataforma R, foi realizada a busca e posicionamento ao longo do genoma dos genes codificadores mais próximos aos lncRNAs. Também utilizamos a plataforma R e a interface de banco de dados do pacote *biomaRt* (<https://www.ensembl.org/biomart/martview/>) (biblioteca baixada pelo Bioconductor). O pacote *biomaRt* oferece acesso aos principais bancos de dados, inclusive Ensembl, onde a busca foi restrita aos genes codificantes de proteínas mais próximos dos lncRNAs.

7.8. Análise do potencial codificador dos RNA longos não codificantes utilizando o CPC 2

A análise do potencial codificador dos lncRNAs diferencialmente expressos foi realizada através do software CPC2 (<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/>). Uma calculadora que avalia o potencial codificador de um determinado lncRNA por meio de uma técnica livre de alinhamentos. Este software utiliza um modelo de regressão logística baseado em quatro características: 1) O tamanho da *Open Reading Frame* (ORF, ou matriz de leitura aberta), uma vez que ORFs longas dificilmente são observadas em sequências não codificadoras; 2) A cobertura da ORF, isto é, a razão entre os comprimentos da ORF e do transcrito; 3) O Fickett TESTCODE score, que reflete o efeito combinatório possível da composição de nucleotídeos e a tendência do uso de determinado códon; e por fim o 4) hexâmero score, que determina o grau relativo de viés no uso de um hexâmero em determinada sequência (KONG et al., 2007; KANG et al., 2017). Os valores

desse score variam de 0 a 1. Valores próximos a 0 indicam menor potencial codificador, sendo que à medida que se aproximam de 1 indicam maior potencial codificador, com base no *cutoff* de 0.5 (KANG et al., 2017).

7.9. Análise dos alvos (RNAs codificadores) de lncRNAs

Para prever os RNAs codificadores alvos dos lncRNAs foi utilizado a ferramenta LncTar (<http://www.cuilab.cn/lncstar>) (LI et al., 2014). Uma ferramenta de predição *in silico* que integra algoritmos precisos para previsão da temperatura de melting e de dímeros de primer para a predição de interação lncRNA-mRNA criando uma matriz de interação bidimensional. O LncTar avalia a energia livre de ligação percorrendo nas sequências todas as regiões de ligação entre as duas moléculas de RNA. Com os dados de energia livre de ligação normalizados (ndG) foi possível criar uma rede de interação utilizando o programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003).

Resultados

8. Resultados

8.1. Análise por Western-Blot dos efeitos das mutações de Aire

Para observarmos o efeito das mutações do gene Aire (clone mTEC 3.10E6) na expressão da proteína, utilizamos a técnica de western-blot. Os resultados evidenciaram que o clone mTEC 3.10E6 apresenta redução significativa da quantidade de proteína AIRE total em relação as células mTECs 3.10 selvagens (WT) (Figura 14). Esses resultados corroboram aqueles publicados por Speck-Hernandez, 2018.

Figura 14 Expressão da proteína AIRE em células mTEC WT ou KO. Proteína AIRE (~ 56 kDa) das amostras WT ou KO e marcação da proteína GAPDH (~ 37 kDa). B) O gráfico representa a quantificação da intensidade das imagens das bandas em pixels/área. Há redução de ~ 35% nos níveis da proteína AIRE nas células KO m relação às células WT. Teste t-Student *p = 0,02354.

8.2. Análise da adesão entre mTECs-timócitos

Os resultados obtidos por meio do ensaio de adesão, evidenciaram uma redução na adesão entre mTECs-timócitos em células Aire KO. O co-cultivo de mTECs-timócitos por 36 horas quando comparado com 12 horas, realçou a redução do número de timócitos aderidos (Figuras 15 e 16).

Figura 15 Ensaio de adesão mTECs-timócitos. (visualização em microscópio óptico - aumento de 20x).

Figura 16 Análise do índice de adesão entre mTECs – timócitos. Índice de adesão foi calculado por meio da razão entre o número de timócitos aderidos pelo número de mTECs (p:0.029).

8.3. Análise dos genes diferencialmente expressos em mTECs wild-type co-cultivadas com timócitos.

As primeiras análises de expressão gênica utilizando o pacote de modelo linear para microarray (limma), foram para moléculas de mRNA. Foram identificados um total de 705 mRNAs diferencialmente expressos, dentre os quais 316 sub-regulados e 389 super-regulados (Figura 17 A). Para isto, foi utilizado como *cutoff* um valor de p ajustado ≤ 0.05 (Benjamini-Hochberg FDR) e *fold change* ≥ 1.5 como mostrado no heatmap na figura 18. A análise das mTECs 3.10 co-cultivadas com timócitos no tempo de 12h mostrou uma modulação de 175 mRNAs diferencialmente expressos, sendo destes, 84 super-regulados e 91 sub-regulados. Enquanto no tempo de 36h houve uma modulação de 530 mRNAs, destes 305 super-regulados e 225 sub-regulados (Figura 17 B). Com o diagrama de Venn foi possível observar uma interseção de 33 genes modulados em ambos os tempos (Figura 19) (HEBERLE et al., 2015). Os genes com uma modulação expressiva foram destacados na figura 20.

Figura 17 Análise quantitativa dos genes diferencialmente expressos. (A) Perfil de expressão de mRNAs em células mTEC 3.10 WT para o gene Aire co-cultivadas com timócitos (B) nos tempos de 12 e 36 horas (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 18 Heatmap evidenciando o perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos. Heatmap do agrupamento hierárquico dos mRNAs modulados nas células mTECs WT em co-cultivo com timócitos nos tempos de 12 e 36h (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 19 Diagrama de Venn. Representação por diagrama de Venn sendo observados 33 genes em comum nos tempos de 12h e 36h de adesão entre mTECs e timócitos.

Figura 20 Top genes codificadores de proteína diferencialmente expressos em mTEC 3.10 WT co-cultivadas com timócitos nos tempos de 12 e 36h.

8.5. Análise de enriquecimento funcional (mTEC 3.10 WT)

Com o intuito de identificar o efeito da adesão entre mTECs e timócitos (células mTEC 3.10 WT) foi realizado a análise funcional dos genes diferencialmente expressos através da ferramenta DAVID. Uma categoria para a predição *in silico* do processo biológico foi considerada significativa quando tinha no mínimo três genes envolvidos e um score < 0,05 com correção de Benjamini-Hochberg (Figura 21)

Figura 21 Análise in silico. (A-D) Processos biológicos dos mRNAs modulados nas células mTECs WT em co-cultivo com timócitos nos tempos de 12 e 36h (Plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Database, score <0,05).

8.6. Análise de mRNA em células mTEC 3.10E6 Aire KO

Foram identificados um total de 732 mRNAs diferencialmente expressos, dentre os quais 390 sub-regulados e 342 super-regulados (Figura 22 A). A análise das mTECs 3.10 co-cultivadas com timócitos no tempo de 12h mostrou 263 mRNAs diferencialmente expressos, dentre eles 111 super-regulados e 152 sub-regulados. Enquanto no tempo de 36h houve uma modulação de 469 mRNAs, destes 230 foram super-regulados e 239 sub-regulados (Figura 22 B). Para a análise do padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos um heatmap de agrupamento hierárquico não supervisionado foi elaborado (Figura 23). Com o diagrama de Venn foi possível observar uma interseção de 66 genes modulados em ambos os tempos (Figura 24) (HEBERLE et al., 2015). Os genes com uma modulação expressiva foram destacados na figura 25.

Figura 22 Análise quantitativa dos valores de expressão em células mTEC 3.10E6 Aire KO. (A) Perfil de expressão de mRNAs em células mTEC 3.10E6 Aire KO co-cultivadas com timócitos (B) nos tempos de 12 e 36 horas (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 23 Heatmap do agrupamento hierárquico dos mRNAs modulados nas células mTECs Aire KO (3.10E6) co-cultivadas com timócitos nos tempos de 12 e 36h (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 24 Diagrama de Venn. Representação por diagrama de Venn mostrando 66 genes em comum nos tempos de 12h e 36h de adesão entre mTECs e timócitos.

Figura 25 Top genes diferencialmente expressos em mTEC Aire KO (mTEC 3.10E6) co-cultivadas com timócitos.

Up-regulated genes**A****12h adhesion** **36h adhesion****B**

Figura 26 Análise in silico dos processos biológicos envolvidos nas células mTECs KO para o gene Aire em co-cultivo com timócitos nos tempos de 12 e 36h. (A-D) dos processos biológicos dos genes diferencialmente expressos na condição Aire KO $-/-$, modulados em co-cultivo com timócitos nos tempos de 12 e 36h (Plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Database, score $<0,05$).

8.7. Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos em células mTEC 3.10 WT co-cultivadas com timócitos

Na análise de transcritos de lncRNA em das células mTEC 3.10 WT foram identificados um total de 109 lncRNAs diferencialmente expressos, dentre os quais 84 sub-regulados e 25 super-regulados (Figura 27 A). A análise das mTECs 3.10 co-cultivadas com timócitos no tempo de 12h mostrou uma modulação de 34 lncRNAs diferencialmente expressos, sendo destes, 9 super-regulados e 25 sub-regulados. Enquanto no tempo de 36h houve uma modulação de 73 lncRNA, destes 16 super-regulados e 59 sub-regulados (Figura 27 B).

Figura 27 A) Heatmap do agrupamento hierárquico não supervisionado dos lncRNAs modulados nas células mTEC 3.10 (WT) co-cultivadas com timócitos (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05) B) Perfil de expressão de mRNAs em células mTEC 3.10E6 Aire KO co-cultivadas com timócitos nos tempos de 12 e 36 horas (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 28 Top RNAs longos não codificantes (lncRNAs) diferencialmente expressos em mTEC 3.10 WT co-cultivadas com timócitos.

8.8. Análise dos lncRNAs em células mTEC 3.10E6 Aire KO co-cultivadas com timócitos

Foram identificados um total de 116 lncRNAs diferencialmente expressos nas células mTEC 3.10E6 (Aire KO), dentre os quais 86 sub-regulados e 30 super-regulados (Figura 25 A). A análise das células mTEC 3.10E6 co-cultivadas com timócitos no tempo de 12h mostrou uma modulação de 43 lncRNAs, dentre os quais 11 super-regulados e 32 sub-regulados. Enquanto que no tempo de 36h houve modulação de 73 lncRNAs, dentre esses 19 super-regulados e 54 sub-regulados (Figura 24 B).

Figura 29 A) Heatmap do agrupamento hierárquico não supervisionado dos lncRNAs modulados nas células mTEC 3.10E6 (Aire KO) co-cultivadas com timócitos (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05) B) Perfil de expressão de lncRNAs em células mTEC 3.10 KO para o gene Aire co-cultivadas com timócitos nos tempos de 12 e 36 horas (fold change ≥ 1.5 , p value ≤ 0.05).

Figura 30 Top RNAs longo não codificantes (lncRNAs) diferencialmente expressos em células mTEC 3.10E6 (Aire KO) co-cultivadas com timócitos.

8.9. Classificação dos lncRNAs modulados em células mTEC 3.10 WT e mTEC 3.10E6 (Aire KO) co-cultivadas com timócitos

Figura 31 Classificação e distribuição e dos lncRNAs modulados nas células mTEC 3.10 WT (A) e mTEC 3.10E6 (Aire KO) (B) co-cultivadas com timócitos..

8.10. Distribuição genômica dos lncRNAs diferencialmente expressos

Figura 32 Pannel geral da localização cromossômica dos lncRNAs. Distribuição dos lncRNAs diferencialmente expressos ao longo do genoma do camundongo (GRCm38.p6 Genome Reference Consortium Mouse Build 38 patch release 6 - Organism: Mus musculus) - (Apêndice 1)

8.11. Identificação e posicionamento dos genes codificadores mais próximos

Tabela 1 Genes codificantes mais próximo do lncRNA. Análise dos lncRNAs e seus vizinhos codificadores mais próximos. Cálculo realizado pela ferramenta Biomart na plataforma R. Distância em pares de base (pb).

LncRNA	Genes codificantes mais próximos			
	Upstream	Distância (pb)	Downstream	Distância (pb)
Airn	Igf2r	28353	Mas1	126832
BC051226	Platr17	4074	Daxx	205
Cep83os	Tmcc3	376627	Cep83	78
Fam219aos	1110017D15Rik	9683	Fam219a	52072
Gm10069	Fkbp4	80	Pzp	87963

Gm10451	Ppp1r36	26959	Plekhg3	86394
Gm11033	Large1	1480380	Isx	39253
Gm11110	Tubb4a	18140	Tnfsf9	597
Gm11496	Coil	26292	Trim25	2832
Gm12440	Hao2	156583	Wars2	91246
Gm12576	Heatr6	95797	Hnf1b	570
Gm13021	Igsf21	175740	Arhgef10l	243488
Gm14005	Bcl2l11	303327	Spdye4c	161843
Gm14636	4930578C19Rik	705861	Tex13c3	314087
Gm15226	Egfl6	35822	Tmsb4x	587773
Gm15850	Cacna1s	78433	Kif21b	206
Gm16062	Flcn	369	Cops3	8607
Gm16159	Fgfr1	42429	Letm2	41430
Gm19557	Stn1	24137	Slk	66696
Gm19589	Glrp1	41451	Arl4c	150359
Gm19705	Zfp281	45868	Nr5a2	289679
Gm20324	Tcf20	13054	Nfam1	134226
Gm20753	Zcchc2	181118	Phlpp1	228
Gm26708	Abhd17c	247	Arnt2	257979
Gm28331	Gm20824	417985	Gm20815	159277
Gm37640	Gnb4	5724	Actl6a	95437
Gm4262	Litaf	15777	Snn	52047
Gm4316	Sult5a1	6985	Dpep1	20987
Gm43391	Gm17019	431173	Gm21149	12352
Gm43672	Agtr1b	1708965	Tbl1xr1	510
Gm4425	Ywhaq	739009	Gm10330	1623619
Gm45326	Lsm6	132774	Zfp827	74523
Gm567	Ppp3ca	619515	Emcn	51428
Gm6507	Tpra1	283774	Plxna1	176595
Igf1os	Pah	306567	Igf1	29903
Kcnq1ot1	Kcnq1	190187	Cdkn1c	164447
Map2k3os	Natd1	18055	Map2k3	166
Mir22hg	Wdr81	7101	Tlcd2	176
Mirg	Rtl1	129434	Dio3	549304
Mirt1	Smndc1	63521	Dusp5	75015
Neat1	Scyl1	74077	Frmd8	29796
Peg13	Trappc9	245486	Chrac1	280068
Platr28	Rbmxl2	33577	Syt9	127706
Snhg14	Ube3a	95399	Gm38393	680915
Snord65	Trpv2	30029	Lrrc75a	44008
Tnk2os	Tnk2	24323	Muc4	67689
0610009L18Rik	Actg1	136	Fscn2	12856
0610038B21Rik	Arhgap10	897	Prmt9	32351
1110002L01Rik	Kif3c	61879	Asxl2	154
1700030M09Rik	1700018B08Rik	2428	Fbxo31	34424
1700047G07Rik	Got2	623793	Cdh8	2904087

1700080N15Rik	Frmd4a	123424	Prpf18	510945
1700092C10Rik	Stc1	142619	Nkx2-6	55
1700112J16Rik	Adamts17	382723	Lysmd4	86
1700120G07Rik	Fam196a	257697	Nps	62701
1700120K04Rik	Rnf40	15678	Zfp629	9988
1810019D21Rik	Esrp2	1574	Pla2g15	14999
2500002B13Rik	Sap30	194	Hmgb2	23853
2610016A17Rik	Dmrt3	61702	Dmrt2	181
2610035D17Rik	Sox9	390853	Slc39a11	392679
2810402E24Rik	Usp54	54	Myoz1	15531
3300005D01Rik	Zdhhc14	306100	Snx9	42672
4930447F24Rik	Bsn	56666	Dag1	130240
4930447K03Rik	Tubb2a	35265	Tubb2b	17082
4933405E24Rik	P4ha2	113190	Csf2	36382
4933438K21Rik	Rex2	46586	Zfp991	63602
5031425E22Rik	Lhfpl3	687265	Kmt2e	1117
5430416N02Rik	Sec31a	50622	Lin54	71104
5730405O15Rik	Med14	279942	Usp9x	29483
5730419F03Rik	Mogat1	98339	Acs13	48317
6720427I07Rik	A830005F24Rik	24252	Ptpdc1	87842
9230102O04Rik	4930412O13Rik	2741	Taf3	69664
9330151L19Rik	Gm49384	7056	Pole2	7246
9430078K24Rik	Rad51b	627451	Zfp36l1	188280
9530014B07Rik	Msx2	166119	Drd1	416512
9930014A18Rik	Fam84b	2809	A1bg	96992
A130077B15Rik	Avpr1a	121392	Ppm1h	241556
A530017D24Rik	Ulk2	12985	Akap10	62194
A730017L22Rik	4930402H24Rik	66222	Atrn	139
B130024G19Rik	Nr2f2	4317	Gm10295	986575
B230206L02Rik	Spag9	137394	Tob1	77969
D930048N14Rik	N4bp3	112	0610009B22Rik	37699
Xist	Gm26992	61244	Zcchc13	147332
Neat1	Scyl1	74077	Frmd8	29796

8.12. Avaliação do potencial codificador dos lncRNAs diferencialmente expressos

Tabela 2 lncRNAs e seu potencial codificador. Potencial codificador de cada lncRNA calculado pela ferramenta Coding Potential Calculator 2-CPC2. (PC- Potencial Codificador). Tabela completa no Apêndice 2.

LncRNA	Coding Potential Calculator 2 (CPC2)	
	Score	PC
chr1:135830093-135840837_F	0.0154964	NC
chr1:135956616-135957485_R	0.00676454	NC
chr1:162965309-162970704_F	0.00516844	NC
chr1:183811267-183816309_F	0.0597192	NC
chr8:59966759-59989065_R	0.0061802	NC
chr9:102891041-102907200_F	0.00515525	NC
chrX:11693432-11693908_R	0.00379968	NC
chrX:123306246-123307974_F	0.0766146	NC
Gm11033	0.0224776	NC
Gm16159	0.0252371	NC
Mir22hg	0.0323014	NC
Airn	0.097855	NC
Gm14005	0.0159236	NC
Platr28	0.0305438	NC
Mirg	0.029091	NC
Neat1	0.0812413	NC
BC051226	0.0939098	NC
Gm6507	0.232186	NC
Gm12576	0.427106	NC
BC051226	0.115421	NC
Gm11110	0.301507	NC
Gm13021	0.0224875	NC
Mirt1	0.0207367	NC
Tnk2os	0.54231	C
Gm19705	0.0362795	NC
Snord65	0.0338885	NC
Xist	0.752728	C
Gm15850	0.0541872	NC

8.13. Rede de interação entre os lncRNAs e seus alvos (mRNAs) em células mTEC 3.10 (WT)

Figura 33 Rede de interação entre lncRNAs e mRNAs alvos em células mTEC 3.10 WT. lncRNAs e seus mRNAs codificares alvos, preditos por meio da análise da energia livre de interação normalizada (ndG) utilizando a ferramenta LncTar (LI et al., 2014). Foram selecionados os top lncRNAs e os mRNAs diferencialmente expressos para a montagem da rede. Os lncRNAs estão representados em verde ciano e os mRNAs em azul (a tonalidade mais forte representa ndG alta).

Tabela 3 mRNAs alvos dos lncRNAs preditos pela ferramenta LncTar. Lista dos lncRNAs e seus mRNAs alvos de interação de acordo com a energia livre ligação normalizada (ndG).

LncRNA	Genes alvos	ndG
chr5:14943275-14944205_F	Car9	-0.8167
	Krt6a	-0.2551
	Grb14	-0.2493
	Ppbp	-0.2379
	Fos	-0.6047
	C3	-0.1965
	Aldoc	-0.1598
	Ccl2	-0.176
	Krt5	-0.2621
	Gli1	-0.4413
chr5:15146475-15170100_F	Car9	-0.1918
	Krt6a	-0.2469
	Grb14	-0.2022
	Ppbp	-0.202
	Fos	-0.1924
	C3	-0.2326
	Aldoc	-0.1788
	Ccl2	-0.1242
	Krt5	-0.3459
	Gli1	-0.2521
chr6:47700758-47717846_F	Car9	-0.4936
	Krt6a	-0.2804
	Grb14	-0.3411
	Ppbp	-0.2079
	Fos	-0.1679
	C3	-0.5128
	Aldoc	-0.2367
	Ccl2	-0.3735
	Krt5	-0.2938
	Gli1	-0.273
chrX:92139043-92140820_R	Car9	-0.1817
	Krt6a	-0.1968
	Grb14	-0.143
	Ppbp	-0.84
	Fos	-0.3954
	C3	-0.1598
	Aldoc	-0.2228
	Ccl2	-0.1224
	Krt5	-0.2276
	Gli1	-0.1963
Fam219ao	Ppbp	-0.1104
Igf1o	Ppbp	-0.1008
Mirt1	Ppbp	-0.1052
Gm10069	Ppbp	-0.1057
Gm12576	Ppbp	-0.1299
Airn	Ppbp	-0.1189

Neat1	Ppbp	-0.106
Gm11033	Ppbp	-0.1209
Mir22hg	Fos	-0.1204
Fam219ao	Ppbp	-0.1104
Igf1o	Ppbp	-0.1008
Mirt1	Ppbp	-0.1052
Gm10069	Ppbp	-0.1057
Gm12576	Ppbp	-0.1299
Airn	Ppbp	-0.1189
Neat1	Ppbp	-0.106
Gm11033	Ppbp	-0.1209
Mir22hg	Fos	-0.1204
Snord65	Car9	-0.1843
	Krt6a	-0.2912
	Grb14	-0.1598
	Ppbp	-0.1658
	Fos	-0.2683
	C3	-0.1895
	Aldoc	-0.1991
	Ccl2	-0.1742
	Krt5	-0.2491
Gm43672	Gli1	-0.2986
Gm20324	Ppbp	-0.1058
Gm19557	Ppbp	-0.1134
Gm10069	Ccl2	-0.101
3300005D01Rik	Ppbp	-0.1013
2610035D17Rik	Ppbp	-0.1057
2210408F21Rik	Ppbp	-0.1035
B230206L02Rik	Ppbp	-0.1146
1700030M09Rik	Ccl2	-0.1046
9230102O04Rik	Ppbp	-0.1018
0610038B21Rik	Ppbp	-0.1142
A130077B15Rik	Ppbp	-0.1047
1700120G07Rik	Ppbp	-0.1047
1700120K04Rik	Ppbp	-0.1164
2810402E24Rik	Ccl2	-0.1033
1700030M09Rik	Ppbp	-0.103
9330151L19Rik	Ppbp	-0.1046
	Krt6a	-0.1132
	Fos	-0.1011
	Gli1	-0.1032
	Ppbp	-0.104
	Ppbp	-0.1047
	Ppbp	-0.1083

Tabela 4 mRNAs alvos dos lncRNAs preditos pela ferramenta LncTar. Lista dos lncRNA e seus mRNAs alvos de interação de acordo com a energia livre ligação normalizada (ndG).

LncRNA	Genes alvos	ndG
Gm4425	Hsd3b2	-0.1897
Tnk2os	Tnk2	-0.1937
	Ppbp	-0.195
Gm11033	Hsd3b2	-0.1956
Platr28	Aqp8	-0.2248
	Hsd3b2	-0.2498
	Prl2c3	-0.2224
	Isg15	-0.2855
	Dusp1	-0.1788
	Ppbp	-0.1658
	Traf1	-0.2589
	Csf2	-0.195
	Card14	-0.2112
	Ifi44	-0.218
	Lyz2	-0.1188
	Clu	-0.2
	Prl2c1	-0.1899
	Tmlhe	-0.4152
	Prl2c5	-0.1325
	Tgfbi	-0.1859
	Fos	-0.2683
	Hspa1b	-0.2673
Gm13021	Prl2c3	-0.1228
Gm19557	Ppbp	-0.1214
Airn	Igf2r	-0.2548
	Lyz2	-0.189
	Igsf21	-0.1985

Discussão

9. Discussão

Os linfócitos T desempenham um papel fundamental na tolerância central. Em um sistema imunológico funcional, as células T imaturas não reagem contra os auto-antígenos do corpo (KYEWSKI; DERBINSKI, 2004). Ao longo do seu desenvolvimento no timo, passam por etapas essenciais de maturação e reconhecimento de MHC e TRAs próprios, podendo ser eliminados por apoptose ou convertidos em células dendríticas (GOLDRATH; BEVAN, 1999).

Essencial para a maturação das células T, o microambiente que compõem o timo, conhecido como estroma tímico, favorece o desenvolvimento de células T e como característica é composto por uma rede de diferentes células como fibroblastos, células mesenquimais não fibroblásticas, células de tecido conjuntivo, endoteliais, células dendríticas, macrófagos, células hematopoiéticas CD45⁺ e células epiteliais formando a matriz na qual as células progenitoras linfoides T (timócitos) se desenvolvem (GOLDRATH; BEVAN, 1999; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017).

Compartimentalizado em duas principais regiões, inicialmente o órgão linfóide timo recebe os timócitos, advindos da medula óssea, em sua região cortical para serem selecionados positivamente por meio de sua capacidade de interação com Moléculas do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) (REZZANI et al., 2014).

Após o processo de maturação no córtex do timo, onde há a diferenciação dos timócitos em células T CD4⁺ ou CD8⁺, o processo migratório dos timócitos segue para a região medular onde ocorrerá a seleção negativa. Para isso, há um *crosstalk*, células mTEC apresentam as células T um conjunto diversificado de auto antígenos. Uma expressão diversificada de TRAs induzida de forma promíscua pelo gene Aire (SANSOM et al., 2014; ABRAMSON; GOLDFARB, 2016; ANDERSON; SU, 2016).

Neste estudo, usamos a linhagem celular mTEC 3.10 (CD45⁻, EpCam⁺, Lyn51⁻, UEA1⁺) tipo selvagem, usada em estudos anteriores do nosso laboratório. Além dessas, também utilizamos células mTEC 3.10E6 Aire^{-/-} KO, editadas por meio do uso da ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas9. O nocaute dessas células teve como alvo o exon 3 do gene Aire, devido a sua codificação do domínio NLS da proteína AIRE, um domínio envolvido no

transporte da proteína Aire do citoplasma para o núcleo das células mTEC, e a possibilidade de mutações nessa região interromperem seu comportamento transcricional (SPECK-HERNANDEZ et al., 2018).

A análise da proteína AIRE por Western Blot, utilizando anticorpo primário anti-AIRE, confirmou os resultados prévios do estudo publicado por Speck-Hernandez et al. 2018, mostrando que as células mTEC 3.10E6 nocauteadas no exon 3 na região NLS do gene Aire (mTEC 3.10E6 Aire^{-/-}) apresentaram redução da expressão da proteína AIRE e a proteína expressa é deletéria. Nosso estudo revelou que houve uma redução de ~40% em relação as células mTEC 3.10 selvagens. Resultado que reafirma que um dos dois alelos mutantes de Aire^{-/-} codifica uma proteína truncada, enquanto o outro alelo não apresenta alterações nos domínios SAND e PHD1-2, sendo reconhecidos de igual forma pelo anticorpo (SPECK-HERNANDEZ et al., 2018). Como proteína de referência nessas análises, utilizamos a expressão de GAPDH.

O nocaute do gene Aire, implica em alterações na regulação da expressão de um grande conjunto de genes associados a tolerância central imunológica. Além disso, genes que codificam moléculas de adesão também são perturbados pela redução da expressão de Aire (MACEDO et al., 2015; PEZZI et al., 2016).

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, foi observado que tanto o silenciamento e o nocaute do gene Aire em células mTEC 3.10 resultaram num decréscimo da capacidade destas células aderirem com timócitos (PEZZI et al., 2016; SPECK-HERNANDEZ et al., 2018). Genes envolvidos na adesão célula-célula, como Cd80, Vcam, Icam4, Itgad, Lrrc4b e Lama1 tiveram sua expressão reduzida quando Aire é perturbado.

Considerando que o processo físico de interação entre timócitos e mTECs se faz crucial nos processos de apresentação de antígenos TRAs e amadurecimento das próprias mTECs e células T, a ausência de Aire altera toda a estrutura de conexão, comprometendo o funcionamento da tolerância central imunológica (DERBINSKI et al., 2005).

O ponto chave, que orientou o questionamento deste trabalho, envolveu uma das hipóteses de que o *crosstalk* mTEC-timócito poderia influenciar no perfil de transcritos (RNAs). Por meio do ensaio de adesão, foi possível observar que a cultura de células mTEC 3.10E6 Aire KO com timócitos variando o tempo de co-cultura entre 12 e 36h, houve um decréscimo da adesão quando comparado

com células mTEC 3.10 WT. Em uma observação visual e ao microscópio óptico, não foi encontrarmos alterações na morfologia celular comparando células mTEC 3.10 WT com células mTEC 3.10E6 Aire KO.

De acordo com a análise de enriquecimento funcional *in silico*, utilizando a ferramenta DAVID, observamos baixa na expressão de classes de genes envolvidos com o processo biológico de adesão celular e ativação da transcrição do promotor da RNA Pol II, processo que ativa ou aumenta a frequência, taxa ou extensão da transcrição de um promotor de RNA Pol II.

As mTECs expressam em sua superfície milhares de genes que representam antígenos do próprio corpo (autoantígenos ou TRAs) e podem induzir tolerância a uma ampla gama desses TRAs. O gene Aire é essencial no controle da transcrição dos TRAs.

Analizamos o perfil de transcritos em células mTEC 3.10 WT co-cultivadas com timócitos durante 12-36h. Foram modulados um total de 705 mRNAs. As células mTEC 3.10 co-cultivadas com timócitos durante 36h apresentaram 530 mRNAs diferencialmente expressos, um aumento na modulação quando comparado com os 175 mRNAs modulados durante de 12 horas de adesão com timócitos. Foi possível concluir que o tempo de co-cultivo das células mTEC com os timócitos influencia a modulação da expressão de mRNAs. Durante 36 horas de co-cultivo houve um aumento expressivo do número de transcritos em relação a 12h de adesão.

Em análise as moléculas de lncRNA em células mTEC 3.10 WT, também foi possível observar a influência da adesão de acordo com o tempo de co-cultivo com timócitos, seguindo o perfil de mRNAs apresentado anteriormente. Foram identificados um total de 107 lncRNAs diferencialmente expressos. A análise das mTECs 3.10 WT co-cultivadas com timócitos durante 12h mostrou uma modulação de 34 lncRNAs, enquanto que durante 36h houve uma modulação de 73 lncRNAs.

Nas análises das células mTEC 3.10E6 Aire KO co-cultivadas com timócitos, foram identificados um total de 732 mRNAs. A análise das mTEC 3.10 co-cultivadas com timócitos durante 12h mostrou modulação de 263 mRNAs, enquanto que durante 36h houve modulação de 469 mRNAs (230 super-regulados e 239 sub-regulados).

Ainda nas células mTEC 3.10E6 Aire KO e analisando os lncRNAs modulados, foram identificados um total de 116 lncRNAs diferencialmente expressos. A análise das mTECs 3.10 co-cultivadas com timócitos durante 12h mostrou uma modulação de 43 lncRNAs, enquanto durante 36h houve modulação de 73 lncRNAs (19 super-regulados e 54 sub-regulados).

Dentre os lncRNAs já descritos e que exibiram expressão diferencial neste estudo, observamos o Transcrito Abundante Nuclear (NEAT1), que tem como função o controle da formação de estruturas de heterocromatinas, como os *Paraspeckles*, que são corpos de ribonucleoproteína encontrados no espaço da intercromatina no núcleo e desempenham um papel na regulação da expressão de certos genes em células diferenciadas por meio da retenção de RNA no núcleo (CLEMSON et al., 2009; ZHANG et al., 2013).

Analisando a rede de interação dos mRNAs alvos dos lncRNAs é possível observar que um dos genes *Pbbp* é alvejado por vários lncRNAs. O gene *Pbbp*, também conhecido como *CXCL7*, é um fator de crescimento, poderoso quimioatrativo, ativador de neutrófilos e promove a migração de leucócitos através de trombos plaquetários. No contexto celular do timo, o aumento da expressão do lncRNA NEAT1 pode estar associado a formação de estruturas que retêm RNAs para o estímulo e regulação do *Pbbp/CXCL7*, que por sua vez pode ser um fator essencial de estímulo de migração dos timócitos (KOSIR; YU; BERK, 2010; AGARWALA et al., 2017).

Os genes diferencialmente expressos foram submetidos à análise de enriquecimento funcional com o uso da ferramenta de anotação DAVID, possibilitando a identificação dos processos biológicos envolvidos. O cutoff utilizado foi de < 0.05 associado com a correção de *Benjamini-Hochberg*.

A análise dos processos biológicos nas células mTEC 3.10 WT co-cultivadas com timócitos não apresentou um perfil diferenciado. Contudo, ao analisar os processos biológicos envolvendo os mRNAs diferencialmente expressos das mTECs 3.10E6 Aire KO, evidenciou-se subregulação de 6 mRNAs associados a adesão durante 12h de adesão mTEC-timócito (*NCAM1*, *ATP1B1*, *PSTPIP1*, *ASTN1*, *CSF3R*, *ITGB5*) e durante de 36h uma subregulação de 12 mRNAs também envolvidos com a adesão (*COL4A3*, *LAMA3*, *CD44*, *CTGF*, *LSAMP*, *TNC*, *TCAM1*, *HAS2*, *ACKR3*, *ZYX*, *FARP2*, *CYR61*). O que chamou nossa atenção foi a desregulação na expressão

transcricional apenas em células mTEC 3.10E6 Aire KO sugerindo o envolvimento do gene Aire com a expressão de moléculas ligadas a interação célula a célula e matriz celular. mRNAs subregulados e envolvidos com processos de crescimento celular, regulação positiva da expressão gênica e genes de proliferação também foram alterados.

Para o desenvolvimento das células T imaturas é necessário uma interação com a matriz celular do timo composta principalmente de colágeno tipo I e IV, integrinas, laminina e fibronectina (SAVINO et al., 2004).

Genes que codificam as integrinas estão envolvidas na interação com a matriz extracelular, contato físico célula-célula e atuam como receptores de adesão. São essenciais nos processos que modulam a proliferação e diferenciação de células T (SAVINO et al., 2003, 2004, 2015; BERTONI et al., 2018).

Como uma das características funcionais dos lncRNAs, o seu sítio de atuação pode variar em *cis*, quando atuam regulando o próprio local onde foram transcritos ou em *trans* indo para outras regiões do genoma para exercerem sua função. Diante dessa informação mapeamos a localização cromossômica de cada lncRNA diferencialmente expresso, o que possibilitou a identificação dos genes codificadores de proteínas *upstream* e *downstream* dos lncRNAs.

A conexão entre essas duas informações possibilitou encontrar lncRNAs que possivelmente poderiam ter como alvo algum mRNAs cuja localização de seus genes estariam *upstream* ou *downstream* e ao mesmo tempo diferencialmente expresso nas duas condições deste estudo (células mTEC Aire WT e células mTEC Aire KO).

Foi possível destacar o lncRNA Tnk2os e gene Tnk2 localizado *upstream*. Esse lncRNA e o mRNA Tnk2 possuem uma interação forte de -0.1937 ndG (cutoff -0.1). O algoritmo do LncTar utilizado determina que para considerar que há interação entre duas moléculas de RNA, a energia de interação livre normalizada (ndG) calculada deverá ser igual ou menor que o valor do cutoff utilizado.

O gene Tnk2 está envolvido na regulação da função das células dendríticas nos gânglios linfáticos e na vigilância de processos tumorais no timo. Um estudo mostrou que mutações no gene Tnk2 induzem ao quadro de epilepsia infantil, podendo ser imunoneurológica (HITOMI et al., 2013). Já o lncRNA

Tnk2os é muito expresso no timo, porém ainda não anotações sobre sua função e atuação.

Este trabalho procurou trazer uma inovação científica ao estudo do controle transcricional e pós-transcricional das células mTEC. A base que orientou a formulação das hipóteses está no mecanismo de atuação da proteína Aire, a qual libera a RNA Pol II ancorada na cromatina (Giraud et al 2012). Como a RNA Pol II além de transcrever moléculas de mRNA, também transcreve moléculas de miRNA (Macedo et al 2013). Como os lncRNAs também são transcritos pela RNA Pol II nos pareceu lógico considerar que Aire pudesse regular essa espécie de RNA em células mTEC.

Esse achado é original e inédito na pesquisa sobre as células mTEC e representa, portanto, uma contribuição importante.

Conclusões

10. Conclusões

- Este estudo mostrou que as células mTEC 3.10E6 Aire KO apresentaram *in vitro* redução em sua capacidade de adesão com os timócitos (*crosstalk*). Isso evidenciou o envolvimento do gene Aire na regulação de genes ligados ao processo de adesão célula-célula.
- Foi possível evidenciar o papel de Aire na regulação de lncRNAs em células mTEC, confirmando uma das hipóteses adotadas nesse trabalho (Figura 8).
- Foi possível evidenciar que o *crosstalk*, entre mTEC 3.10 Aire WT com timócitos, induziu aumento no número de mRNAs e de lncRNAs diferencialmente expressos segundo o tempo de co-cultura, confirmando uma das hipóteses adotadas nesse trabalho. A grande maioria dos lncRNAs diferencialmente expressos e regulados por Aire são da classe dos intergênicos.
- Existe a possibilidade predita de interação entre os lncRNAs e mRNAs diferencialmente expressos, sinalizando a existência de um novo mecanismo de controle da expressão gênica pós-transcricional em células tímicas epiteliais medulares (mTECs).

Referências Bibliográficas

11. Referências Bibliográficas

ABBOTT, J. K. et al. Dominant-negative loss of function arises from a second, more frequent variant within the SAND domain of autoimmune regulator (AIRE). **Journal of Autoimmunity**, v. 88, p. 114–120, 2018.

ABRAMSON, J. et al. Aire's Partners in the Molecular Control of Immunological Tolerance. **Cell**, v. 140, n. 1, p. 123–135, 2010.

ABRAMSON, J.; GOLDFARB, Y. AIRE: From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 1, p. 22–33, jan. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201545792>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

AGARWALA, R. et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information, **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. Database issue, p. D12, 2017.

ANDERSON, G.; TAKAHAMA, Y. Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 6, p. 256-263, 2012.

ANDERSON, M. S.; SU, M. A. AIRE expands: New roles in immune tolerance and beyond. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 4, p. 247, 2016.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 289-300, 1995.

BERTONI, A. et al. Integrins in T cell physiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 485, 2018.

BLECHSCHMIDT, K. et al. The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression. **Genome research**, v. 9, n. 2, p. 158-166, 1999.

BRENNECKE, P. et al. Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. **Nature Immunology**, v. 16, n. 9, p. 933, 2015.

BRUSERUD, Ø. et al. AIRE-mutations and autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 43, p. 8–15, 2016.

CARPENTER, S. et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. **Science (New York, NY)**, v. 341, n. 6147, p. 789-792, 2013.

CHINN, I. K. et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. **Seminars in Immunology**, Vol. 24, No. 5, pp. 309-320, 2012.

CHOI, S.-W.; KIM, H.-W.; NAM, J.-W. The small peptide world in long noncoding

RNAs. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 13, p. 1494-1504, 2018.

CLEMONSON, C. M. et al. An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. **Molecular Cell**, v. 33, n. 6, p. 717-726, 2009.

DERBINSKI, J. et al. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nature Immunology**, v. 2, p. 1032, 15 out. 2001.

DERBINSKI, J. et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 1, p. 33–45, 2005.

DERBINSKI, J. et al. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 657-662, 2008.

DERBINSKI, J. et al. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Journal of Immunology**, v. 196, n. 7, p. 2915–2922, 2016.

FAN, Y. et al. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. **EMBO Journal**, v. 28, n. 18, p. 2812-2824, 2009.

FÖRSTER, R.; DAVALOS-MISLITZ, A. C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v. 28, n. 18, p. 2812-2824, 2008. .

GALLÓN, S.; LOUBES, J. M.; MAZA, E. Statistical properties of the quantile normalization method for density curve alignment. **Mathematical Biosciences**, v. 242, n. 2, p. 129-142, 2013.

GIRAUD, M. et al. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 535-540, 2012.

GOLDMAN, K. P. et al. Thymic cortical epithelium induces self tolerance. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 3, p. 709-717, 2005.

GOLDRATH, A. W.; BEVAN, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**, v. 402, n. 6759, p. 255, 1999. .

GOTTER, J. et al. Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 2, p. 155–166, 2004.

GUI, J. et al. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. **Aging and disease**, v. 3, n. 3, p. 280, 2012.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets

through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 2015.

HITOMI, Y. et al. Mutations in *TNK2* in severe autosomal recessive infantile onset epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 74, n. 3, p. 496-501, 2013.

HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A.; JAMESON, S. C. Central tolerance: Learning self-control in the thymus. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 772, 2005. .

HU, G. et al. Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. **Nature Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1190 2013.

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

IMAMURA, K. et al. Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. **Molecular Cell**, v. 53, n. 3, p. 393–406, 2014.

KANG, Y. J. et al. CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W12-W16 2017.

KLEIN, L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 377, 2014.

KLEIN, L. Aire Gets Company for Immune Tolerance. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 794–795, 2015.

KONG, L. et al. CPC: Assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W345-W349, 2007.

KOO, G. C.; PEPPARD, J. R.; HATZFELD, a. Ontogeny of Nk-1+ natural killer cells. I. Promotion of Nk-1+ cells in fetal, baby, and old mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 129, n. 2, p. 867-871, 1982.

KOSIR, M. A.; YU, M.; BERK, R. CXCL7-mediated stimulation of lymphangiogenic factors VEGF-C, VEGF-D in human breast cancer cells. **Journal of Oncology**, v. 2010, 2010.

KUNG, J. T. Y.; COLOGNORI, D.; LEE, J. T. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 651-669, 2013.

KUROBE, H. et al. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 165-177, 2006.

KYIEWSKI, B.; DERBINSKI, J. Self-representation in the thymus: An extended view. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 9, p. 688, 2004. .

LAU, C. I. et al. Foxa1 and Foxa2 in thymic epithelial cells (TEC) regulate medullary TEC and regulatory T-cell maturation. **Journal of Autoimmunity**, v. 93, p. 131-138, 2018.

LI, J. et al. LncTar: A tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 5, p. 806-812, 2014.

LIANG, J. C.; BLOOM, R. J.; SMOLKE, C. D. Engineering Biological Systems with Synthetic RNA Molecules Molecular. **Cell**, v. 43, n. 6, p. 915-926, 2011.

MACEDO, C. et al. Autoimmune regulator (Aire) controls the expression of microRNAs in medullary thymic epithelial cells. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 554–560, 2013.

MACEDO, C. et al. Aire-dependent peripheral tissue antigen mRNAs in mTEC cells feature networking refractoriness to microRNA interaction. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 93–102, 2015.

MATHIS, D.; BENOIST, C. A decade of AIRE. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 8, p. 645, 2007.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Developing T-cell migration: Role of semaphorins and ephrins. **FASEB Journal**, v. 26, n. 11, p. 4390-4399, 2012.

MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. **Nature Structural & Molecular Biology**, 2013.

MEREDITH, M. et al. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. **Nature Immunology**, v. 16, n. 9, p. 942–949, 2015.

MILLER, J. F. A. P. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. **Immunological Reviews**, v. 185, n. 1, p. 7-14, 2002.

NISHIJIMA, H. et al. Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of autoimmune regulator (AIRE). **Journal of Autoimmunity**, v. 86, p. 75-92, 2018.

OLIVEIRA, E. H. et al. Aire Downregulation Is Associated with Changes in the Posttranscriptional Control of Peripheral Tissue Antigens in Medullary Thymic Epithelial Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 526, 23 nov. 2016.

PALMA, A. et al. Analysis of the autoimmune regulator gene in patients with autoimmune non-APECED polyendocrinopathies. **Genomics**, v. 102, n. 3, p. 163-168, 2013.

PASSOS, G. A. et al. Update on Aire and thymic negative selection. **Immunology**, v. 153, n. 1, p. 10-20, 2018.

PAYRE, F.; DESPLAN, C. RNA. Small peptides control heart activity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 351, n. 6270, p. 226-227, 2016.

PEZZI, N. et al. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire

protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction. **Molecular Immunology**, v. 77, p. 157–173, set. 2016.

PINTO, S. et al. Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 37, p. E3497-E3505, 2013.

PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629-641, 2009.

REZZANI, R. et al. Thymus and aging: Morphological, radiological, and functional overview. **Age**, v. 36, n. 1, p. 313-351, 2014. .

RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 145-166, 2012.

RITCHIE, M. E. et al. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. **Bioinformatics**, v. 23, n. 20, p. 2700-2707, 2007.

RITCHIE, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47-e47, 2015.

ROSSI, S. W. et al. RANK signals from CD4⁺CD3⁻ inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1267-1272, 2007.

SANSOM, S. N. et al. Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. **Genome Research**, v. 24, n. 12, p. 1918–1931, 2014.

SAVINO, W. et al. Thymocyte migration: An affair of multiple cellular interactions? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 8, p. 1015-1025, 2003.

SAVINO, W. et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 951-961, 2004.

SAVINO, W. et al. Laminin-mediated interactions in thymocyte migration and development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 579, 2015.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SPECK-HERNANDEZ, C. A. et al. Aire disruption influences the medullary thymic epithelial cell transcriptome and interaction with thymocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

STARR, T. K.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Positive and negative

selection of T cells. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 139-176, 2003.

ANDERSON, M. S. et al. Aire expands : new roles in immune tolerance and beyond. **Nature Reviews Immunology**. v. 16, n. 4, p. 247–258, 2017.

TAKABA, H. et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 975–987, 2015.

TAKABA, H.; TAKAYANAGI, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 11, p. 805-816, 2017.

TAUB, D. D.; LONGO, D. L. Insights into thymic aging and regeneration. **Immunological Reviews**, v. 205, n. 1, p. 72-93, 2005.

ULYANCHENKO, S. et al. Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult Thymus. **Cell Reports**, v. 14, n. 12, p. 2819-2832, 2016.

WALLAERT, A. et al. T-ALL and thymocytes: A message of noncoding RNAs. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, p. 66, 2017.

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, 2015.

WATERFIELD, M. et al. The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance. **Nature Immunology**, v. 15, n. 3, p. 258, 2014.

ZHANG, Q. et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. **mBio**, v. 4, n. 1, p. e00596-12, 2013.

ZHANG, Y.; TAO, Y.; LIAO, Q. Long noncoding RNA: a crosslink in biological regulatory network. **Briefings in Bioinformatics**, 2017.

ZHENG, D. et al. Pseudogenes in the ENCODE regions: Consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. **Genome Research**, v. 17, n. 6, p. 839-851, 2007.

Apêndice

12. Apêndice

Apêndice 1 Posicionamento cromossômico dos lncRNAs diferencialmente expressos. Posição cromossômica onde cada lncRNA se encontra no genoma GRCm38.p6

LncRNA	Localização cromossômica
1700030M09Rik	8qE1
1700080N15Rik	2qA1
2610016A17Rik	19qC
3010001F23Rik-201	Xq
4632427E13Rik	7qE1
4930557B15Rik	XqA2
4933405E24Rik-201	11qB1.3
4933438K21Rik-201	4qE1
5430431A17Rik-201	7qB3
9430078K24Rik	12qC3
9530014B07Rik	13qB1
A130077B15Rik	10qD2
AC159290.2-201	13qB3
Airn	17qA1
chr1:183951156-183986156_F	1q
chr1:69531191-69570566_R	1q
chr10:96098058-96098623_F	10q
chr11:119254413-119296960_F	11q
chr11:18479852-18485704_F	11q
chr11:50994911-51050704_F	11q
chr11:60728207-60745369_R	11q
chr13:113205145-113207570_F	13q
chr16:23992037-24001037_F	16q
chr18:63355660-63369610_R	18q
chr18:63525907-63526504_R	18q
chr19:5771425-5848475_F	19q
chr2:128211990-128215223_R	2q
chr2:151992806-152025456_R	2q
chr2:172343878-172344212_R	2q
chr2:176610409-176612864_F	2q
chr3:113296823-113298691_R	3q
chr3:85783094-85783408_F	3q
chr4:135138014-135174889_F	4q
chr4:33375464-33377138_R	4q

chr4:98943050-98959998_R	4q
chr5:113594167-113645342_R	5q
chr5:14943275-14944205_F	5q
chr5:15146475-15170100_F	5q
chr6:121035524-121061074_R	6q
chr6:31078802-31079644_R	6q
chr6:83368261-83407280_R	6q
chr8:124355710-124401160_R	8q
chr8:126396600-126407275_R	8q
chr8:85952719-85958369_R	8q
chrX:11693432-11693908_R	Xq
chrX:91000651-91005855_R	Xq
D930048N14Rik	11qB1.3
Foxo3-202	10qB2
Gm10416	5qF
Gm10536	18qD3
Gm11033-203	8qC1
Gm14230	2qH1
Gm15614	5qB1
Gm15738	16qA1
Gm17821	12qC2
Gm19327	12qD1
Gm19557	19qD1
Gm19639	19qC3
Gm34589	14qE2.3
Gm35147	7qF3
Gm35358	8qC3
Gm36582	6qG1
Gm4262	16qA1
Gm4316	8qE1
Gm43391	5qA3
Gm4425	12qA1.3
Gm4610-201	3qG1
Gm6507-201	6qD1
LOC105243194	8qB2
Map2k3os-201	11qB2
Mir22hg	11qB5
Mirg-205	12qF1
Neat1-201	19qA
Platr28-201	7qE3
Slc2a4rg-ps	2qH4
Snhg7os-202	2qA3
Tnk2os-201	16qB3
XIST	XqD
Xist-202	XqD

1700047G07Rik-201	8qD1
2500002B13Rik	8qB2
2810402E24Rik-201	14qA3
3010003L21Rik	6qG3
4930447F24Rik	9qF1
4930542C21Rik	16qB3
4932431P20Rik-202	7qB1
4933429K18Rik	19C3
5031425E22Rik-205	5qA3
5430416N02Rik-202	5qE5
6720427I07Rik	13qA5
9230102O04Rik-201	2qA1
AC160966.2-201	9qA5.1
B130024G19Rik-202	7qC
C78283-201	5qC3.3
Cdk3-ps	11qE2
chr1:74084292-74138492_F	1q
chr10:93975406-93977476_R	10q
chr10:96103732-96103867_F	10q
chr12:112220578-112220962_F	12q
chr12:73789535-73799787_F	12q
chr12:88172043-88172731_R	12q
chr14:21621875-21638625_R	14q
chr14:78957377-78962977_R	14q
chr14:99729955-99730583_F	14q
chr15:5446560-5549135_R	15q
chr15:79764481-79809909_F	15q
chr15:83281223-83284791_R	15q
chr15:85502461-85524051_R	15q
chr15:98842850-98853100_F	15q
chr17:3198868-3394643_F	17q
chr17:84477999-84489215_F	17q
chr18:75513062-75523889_R	18q
chr19:4209657-4210475_R	19q
chr19:5001448-5001810_R	19q
chr19:57426515-57435165_R	19q
chr2:116796887-116797441_F	2q
chr2:143988645-143993945_F	2q
chr2:156654675-156665430_F	2q
chr2:25774411-25783757_F	2q
chr3:151746091-151753763_F	3q
chr3:34793853-34800591_F	3q
chr3:65729664-65731697_R	3q
chr3:90425270-90435820_F	3q

chr3:96074625-96086375_R	3q
chr4:141527564-141547339_F	4q
chr4:146017200-146029700_F	4q
chr4:3009566-3009932_R	4q
chr5:74487385-74497428_R	5q
chr6:108556270-108573161_F	6q
chr6:140639450-140662200_R	6q
chr6:31007184-31007725_R	6q
chr6:47700758-47717846_F	6q
chr7:129293609-129294172_R	7q
chr7:134649844-134651551_F	7q
chr7:31709550-31723025_F	7q
chr8:110197171-110206546_R	8q
chr8:124397412-124398022_R	8q
chr8:124569775-124639500_F	8q
chr8:126268510-126290810_R	8q
chr8:18587198-18592948_R	8q
chr8:20014569-20016673_R	8q
chr8:26212577-26218527_F	8q
chr8:35650475-35664200_F	8q
chr8:48476637-48492537_F	8q
chr8:87504644-87513694_R	8q
chr9:31839533-31840971_R	9q
chr9:68349343-68411643_F	9q
chrX:123306246-123307974_F	Xq
chrX:20570399-20571162_F	Xq
chrX:75813213-75829323_F	Xq
CT033783.2-201	13qB3
Fam219aos-201	4qA5
Gm11423-202	11qC
Gm12440	3qF.2
Gm12576-201	11qC
Gm13021-201	4qD3
Gm14230-201	2qH1
Gm14636-201	XqA2
Gm15850	1qE4
Gm16124	9qA5.3
Gm16159	8qA2
Gm19589	1qD
Gm26853-201	8qA1.3
Gm28331-201	YqA1
Gm32575	19qD2
Gm33302	9qE3.3
Gm35677	8qE1
Gm37640-201	3qA3

Gm43058-201	5qA3
Gm43391-201	5qA1
Gm4827	16qB5
Gm567-201	3qG3
Gm5914	8qD3
LOC73899	19qD2
Lockd-201	6qG1
Mirt1-202	19qD2
NEAT1	19qA
Snora74a	18qB2
Snord78	1qH1
Zbtb38-206	9qE3.3

Apêndice 2 LncRNAs e seu potencial codificador. Potencial codificador de cada lncRNA calculado pela ferramenta Coding Potential Calculator 2-CPC2. (PC- Potencial Codificador).

LncRNA	Coding Potential Calculator 2 (CPC2)	
	Score	PC
chr1:135830093-135840837_F	0.0154964	NC
chr1:135956616-135957485_R	0.00676454	NC
chr1:162965309-162970704_F	0.00516844	NC
chr1:183811267-183816309_F	0.0597192	NC
chr1:183951156-183986156_F	0.0188792	NC
chr1:69531191-69570566_R	0.00856357	NC
chr1:74084292-74138492_F	0.0143317	NC
chr10:116814196-116920696_R	0.00285516	NC
chr10:121498271-121512171_R	0.200652	NC
chr10:8606683-8665783_R	1.60076e-05	NC
chr10:93975406-93977476_R	0.00263757	NC
chr10:96098058-96098623_F	0.00346511	NC
chr10:96103732-96103867_F	0.0141289	NC
chr11:119254413-119296960_F	1.31358e-06	NC
chr11:18479852-18485704_F	0.0347571	NC
chr11:50994911-51050704_F	1.26344e-05	NC
chr11:53574182-53574644_R	0.0536091	NC
chr11:60728207-60745369_R	0.0308508	NC
chr11:6421951-6429173_R	0.0395833	NC
chr11:70196232-70203307_R	0.155216	NC
chr11:82588507-82594501_R	0.186986	NC
chr12:112220578-112220962_F	0.0047507	NC

chr12:16003706-16022581_F	0.0126949	NC
chr12:21548850-21568550_R	0.0503324	NC
chr12:73789535-73799787_F	3.11582e-06	NC
chr12:76744947-76778372_R	1.66007e-05	NC
chr12:88172043-88172731_R	0.0258632	NC
chr13:113205145-113207570_F	6.80076e-06	NC
chr13:41337973-41379821_F	0.00838164	NC
chr13:62734450-62785325_R	2.19521e-06	NC
chr13:73472571-73483846_F	1.09402e-06	NC
chr14:115443612-115445950_F	1.69872e-05	NC
chr14:21461716-21462270_F	0.00895532	NC
chr14:21621875-21638625_R	0.0324885	NC
chr14:62263564-62307496_R	5.96505e-06	NC
chr14:78957377-78962977_R	0.192874	NC
chr14:99729955-99730583_F	0.11962	NC
chr15:41288197-41522572_R	1.35175e-05	NC
chr15:5446560-5549135_R	0.0114658	NC
chr15:79764481-79809909_F	0.0453376	NC
chr15:83281223-83284791_R	0.0110769	NC
chr15:84737071-84753513_F	0.0110163	NC
chr15:85502461-85524051_R	0.00962752	NC
chr15:98842850-98853100_F	0.00480843	NC
chr16:23992037-24001037_F	5.64316e-07	NC
chr16:32388843-32395264_R	0.00907785	NC
chr16:4585697-4594022_R	0.00706251	NC
chr17:3198868-3394643_F	0.00957166	NC
chr17:32213027-32228368_R	0.0657028	NC
chr17:46972160-46997919_R	0.0098946	NC
chr17:47016870-47017498_F	0.0400672	NC
chr17:56687541-56694616_R	0.0255612	NC
chr17:84477999-84489215_F	0.030205	NC
chr18:36481237-36481819_F	0.00872039	NC
chr18:63355660-63369610_R	0.00698245	NC
chr18:63525907-63526504_R	4.2705e-06	NC
chr18:69923410-69965360_F	3.9075e-06	NC
chr18:75513062-75523889_R	0.090413	NC
chr18:90750100-90772025_F	1.68037e-06	NC
chr19:4209657-4210475_R	0.103387	NC
chr19:57426515-57435165_R	0.0106604	NC
chr19:5771425-5848475_F	0.0172192	NC
chr19:5834117-5835940_R	0.00943656	NC

chr2:116796887-116797441_F	0.0113075	NC
chr2:128211990-128215223_R	0.00524351	NC
chr2:143988645-143993945_F	0.014967	NC
chr2:151992806-152025456_R	1.45029e-05	NC
chr2:156654675-156665430_F	0.0123822	NC
chr2:156654675-156665430_R	6.35676e-07	NC
chr2:172343878-172344212_R	0.0104291	NC
chr2:173421598-173485043_R	0.00293408	NC
chr2:176610409-176612864_F	1.3969e-05	NC
chr2:22782700-22801900_F	0.00441765	NC
chr2:25774411-25783757_F	0.0194916	NC
chr3:113296823-113298691_R	0.103809	NC
chr3:151746091-151753763_F	0.00491668	NC
chr3:34793853-34800591_F	0.0231231	NC
chr3:36280098-36347798_F	1.2607e-06	NC
chr3:65729664-65731697_R	0.0114683	NC
chr3:85783094-85783408_F	8.04223e-06	NC
chr3:90425270-90435820_F	0.00413759	NC
chr3:96074625-96086375_R	0.00409835	NC
chr4:135138014-135174889_F	0.0319769	NC
chr4:138653689-138688814_R	0.005607	NC
chr4:141527564-141547339_F	6.95991e-07	NC
chr4:146017200-146029700_F	0.00357202	NC
chr4:16144314-16144967_F	0.0213098	NC
chr4:3009566-3009932_R	0.00919976	NC
chr4:33375464-33377138_R	0.0668067	NC
chr4:35106125-35127700_R	0.00619834	NC
chr4:3746945-3747603_F	0.0204787	NC
chr4:44240894-44241570_R	0.0143625	NC
chr4:56480568-56658018_R	0.0140891	NC
chr4:89088538-89130181_F	0.0201183	NC
chr4:98943050-98959998_R	0.0168807	NC
chr5:107503800-107515575_R	0.062443	NC
chr5:113594167-113645342_R	0.00319634	NC
chr5:125205454-125209470_F	0.0083657	NC
chr5:14943275-14944205_F	0.00985262	NC
chr5:15033568-15033987_F	1.36974e-06	NC
chr5:15146475-15170100_F	0.0044512	NC
chr5:152006587-152008784_R	9.41193e-06	NC
chr5:22887983-22939658_R	0.00289087	NC
chr5:74340084-74346709_F	0.039262	NC

chr5:74487385-74497428_R	9.40765e-07	NC
chr5:92556322-92558910_F	0.12272	NC
chr6:108556270-108573161_F	0.0100175	NC
chr6:121035524-121061074_R	2.26434e-06	NC
chr6:127111250-127142925_F	1.64088e-05	NC
chr6:136440100-136450050_F	2.68846e-06	NC
chr6:140639450-140662200_R	0.196008	NC
chr6:31007184-31007725_R	1.67769e-05	NC
chr6:31078802-31079644_R	0.0104188	NC
chr6:47595238-47601893_F	8.17804e-07	NC
chr6:47700758-47717846_F	1.2705e-06	NC
chr6:47967403-47968278_R	0.101319	NC
chr6:83368261-83407280_R	7.15038e-06	NC
chr7:129293609-129294172_R	0.0676957	NC
chr7:134649844-134651551_F	1.77109e-06	NC
chr7:13533925-13544525_F	0.0146406	NC
chr7:31709550-31723025_F	0.0127134	NC
chr7:71231097-71233680_R	0.0169095	NC
chr8:110197171-110206546_R	7.97985e-07	NC
chr8:124355710-124401160_R	0.185143	NC
chr8:124397412-124398022_R	9.38758e-06	NC
chr8:124569775-124639500_F	0.00955363	NC
chr8:126268510-126290810_R	0.00556109	NC
chr8:126396600-126407275_R	0.00345701	NC
chr8:18587198-18592948_R	1.26635e-05	NC
chr8:19792940-19798868_F	8.57724e-06	NC
chr8:26212577-26218527_F	1.04244e-05	NC
chr8:26212577-26218527_R	1.8224e-05	NC
chr8:35650475-35664200_F	0.144477	NC
chr8:48476637-48492537_F	0.00929962	NC
chr8:59966759-59989065_R	0.0061802	NC
chr8:73645975-73696275_F	0.0501734	NC
chr8:85952719-85958369_R	0.00460826	NC
chr8:87504644-87513694_R	0.00279074	NC
chr9:102891041-102907200_F	0.00515525	NC
chr9:20313342-20323517_R	0.00377583	NC
chr9:31839533-31840971_R	0.00280048	NC
chr9:68349343-68411643_F	0.054369	NC
chr9:78104935-78116974_F	0.0102779	NC
chr9:78107225-78118850_F	0.0118854	NC
chr9:96635508-96654148_R	0.00338684	NC

chrX:11693432-11693908_R	0.00379968	NC
chrX:123306246-123307974_F	0.0766146	NC
chrX:148803114-148851243_F	0.192502	NC
chrX:18734106-18744367_R	0.0105494	NC
chrX:20570399-20571162_F	0.019669	NC
chrX:75813213-75829323_F	0.0299943	NC
chrX:91000651-91005855_R	0.00410192	NC
chrX:92139043-92140820_R	0.157551	NC
Gm11033	0.0224776	NC
Gm19705	0.0566135	NC
Gm16159	0.0252371	NC
Mir22hg	0.0323014	NC
Airn	0.097855	NC
Gm14005	0.0159236	NC
Airn	0.506548	C
Platr28	0.0305438	NC
Mirt1	0.764632	C
Mirg	0.029091	NC
Neat1	0.0812413	NC
Gm11496	0.0157754	NC
Gm14005	0.0192137	NC
Gm15850	0.0558108	NC
BC051226	0.0939098	NC
Gm6507	0.232186	NC
Gm11033	0.00509673	NC
Gm12576	0.427106	NC
BC051226	0.115421	NC
Gm11110	0.301507	NC
Neat1	0.048226	NC
Gm13021	0.0224875	NC
Airn	0.0138501	NC
Mirt1	0.0207367	NC
Tnk2os	0.54231	C
Gm19705	0.0362795	NC
Snord65	0.0338885	NC
Gm14005	0.0188855	NC
Xist	0.752728	C
Gm14005	0.00414661	NC
Neat1	0.362236	NC
Gm14005	0.123153	NC
Gm14005	0.0208339	NC

Mir22hg	0.0258004	NC
Gm15850	0.0541872	NC
Airn	0.0273031	NC
Gm12440	0.0262182	NC
Gm14636	0.0432032	NC
Airn	0.0355869	NC
Map2k3os	0.420003	NC
Gm26708	0.0205108	NC
BC051226	0.126101	NC
Gm11033	0.794888	C
Gm4425	0.613325	C
Airn	0.17635	NC
Fam219aos	0.484752	NC
Gm15850	0.143708	NC
Mirt1	0.414868	NC
Gm10451	0.221146	NC
Gm16062	0.352821	NC
Gm19705	0.0298838	NC
Gm10069	0.537054	C
Igf1os	0.0735646	NC
Gm14636	0.0536528	NC
Gm15226	0.179559	NC
Gm15850	0.486098	NC
Gm14005	0.0235375	NC
Gm16159	0.0254402	NC
Xist	0.764991	C
Gm4262	0.0298636	NC
Igf1os	0.111006	NC
Gm19705	0.0426617	NC
Snhg14	0.00704251	NC
Mirg	0.0103937	NC
Snhg14	0.0764384	NC
Gm43391	0.0199342	NC
Snhg14	0.345452	NC
Gm19557	0.355901	NC
Snhg14	0.0863497	NC
Kcnq1ot1	0.843263	C
Cep83os	0.162767	NC
Snhg14	0.0386423	NC
Gm567	0.342973	NC
Gm28331	0.0644561	NC

Snhg14	0.880674	C
Gm20753	0.593091	C
Snhg14	0.426937	NC
Mirg	0.131098	NC
Gm43391	0.0219136	NC
Mirg	0.505637	C
Mirg	0.1437	NC
Snhg14	0.0124447	NC
Gm19589	0.132223	NC
Gm20324	0.654366	C
Snhg14	0.0120282	NC
Gm43391	0.26049	NC
Mirg	0.0507224	NC
Gm43672	0.0153564	NC
Gm37640	0.0652525	NC
Mirg	0.0203239	NC
Mirg	0.137655	NC
Gm43391	0.0199342	NC
Mirg	0.0884225	NC
Snhg14	0.390361	NC
Gm43391	0.26049	NC
Snhg14	0.98518	C
Mirg	0.0463172	NC
Peg13	0.213168	NC
Snhg14	0.187702	NC
Snhg14	0.355111	NC
Mirg	0.141441	NC
Snhg14	0.439997	NC
Mirg	0.0271403	NC
Snhg14	0.0618034	NC
Gm10451	0.0540103	NC
Gm14005	0.0212908	NC
Gm14005	0.0543881	NC
Gm4316	0.0332533	NC
Neat1	0.0403669	NC
Gm45326	0.231246	NC
Gm26708	0.0284299	NC
Gm10069	0.0847931	NC
Gm4316	0.0340033	NC
Gm11110	0.185417	NC
Gm10069	0.180332	NC

Gm43391	0.0219136	NC
Gm26708	0.0149551	NC
Gm11110	0.0692036	NC
Gm10451	0.0210679	NC
Gm11110	0.0810488	NC
Gm14005	0.0999517	NC
Gm11110	0.182985	NC
1700080N15Rik	0.0511962	NC
2610035D17Rik	0.0555672	NC
B130024G19Rik	0.00285324	NC
5031425E22Rik	0.538575	C
2610035D17Rik	0.0561977	NC
2210408F21Rik	0.032159	NC
2210408F21Rik	0.0159093	NC
D930048N14Rik	0.947823	C
2610035D17Rik	0.0807057	NC
4933438K21Rik	0.0306206	NC
3300005D01Rik	0.267874	NC
3300005D01Rik	0.0369027	NC
1110002L01Rik	0.108155	NC
B230206L02Rik	0.0226174	NC
0610009L18Rik	0.0178113	NC
A530017D24Rik	0.136893	NC
1810019D21Rik	0.0222635	NC
2210408F21Rik	0.010651	NC
2610035D17Rik	0.129329	NC
9230102O04Rik	0.0630823	NC
1700030M09Rik	0.0569571	NC
2210408F21Rik	0.0671794	NC
2210408F21Rik	0.65975	C
B230206L02Rik	0.0101435	NC
2210408F21Rik	0.0268647	NC
5430416N02Rik	0.154559	NC
1700092C10Rik	0.0487848	NC
2210408F21Rik	0.0280357	NC
3300005D01Rik	0.0212908	NC
2210408F21Rik	0.0229185	NC
A730017L22Rik	0.998392	C
5730405O15Rik	0.0317178	NC
3300005D01Rik	0.372969	NC
1700080N15Rik	0.0330213	NC

1700080N15Rik	0.0499707	NC
2210408F21Rik	0.0460025	NC
1810019D21Rik	0.018936	NC
A530017D24Rik	0.0813244	NC
1110002L01Rik	0.776609	C
2210408F21Rik	0.018628	NC
D930048N14Rik	0.451603	NC
2210408F21Rik	0.0451752	NC
1810019D21Rik	0.048949	NC
9230102O04Rik	0.111126	NC
2500002B13Rik	0.101008	NC
2210408F21Rik	0.0990481	NC
1110002L01Rik	0.097498	NC
5730405O15Rik	0.0204456	NC
9930014A18Rik	0.528769	C
A730017L22Rik	0.0809146	NC
2210408F21Rik	0.0228372	NC
1110002L01Rik	0.118036	NC
B230206L02Rik	0.0275924	NC
A730017L22Rik	0.0278332	NC
2210408F21Rik	0.281572	NC
0610038B21Rik	0.0935767	NC
4933405E24Rik	0.0232256	NC
2210408F21Rik	0.0572411	NC
A130077B15Rik	0.601691	C
2500002B13Rik	0.0169935	NC
6720427I07Rik	0.00965181	NC
2810402E24Rik	0.0883867	NC
9930014A18Rik	0.328611	NC
1700047G07Rik	0.0070667	NC
5031425E22Rik	0.53656	C
1700112J16Rik	0.0307175	NC
B130024G19Rik	0.111799	NC
1700120K04Rik	0.661745	C
1700120G07Rik	0.114527	NC
B130024G19Rik	0.0371643	NC
1700120G07Rik	0.00404264	NC
B130024G19Rik	0.108166	NC
4930447F24Rik	0.0835785	NC
2610016A17Rik	0.0211952	NC
9330151L19Rik	0.243519	NC

5730419F03Rik	0.030601	NC
9430078K24Rik	0.0824685	NC
4930447F24Rik	0.120431	NC
9430078K24Rik	0.0133792	NC
1700030M09Rik	0.0290032	NC
5031425E22Rik	0.0306652	NC
B130024G19Rik	0.21339	NC
B130024G19Rik	0.0698227	NC
9430078K24Rik	0.155534	NC
9930014A18Rik	0.677781	C
5031425E22Rik	0.241578	NC
1700047G07Rik	0.0156654	NC
2610016A17Rik	0.0145949	NC
2610016A17Rik	0.0485305	NC
5031425E22Rik	0.0369786	NC
5430416N02Rik	0.0140412	NC
9930014A18Rik	0.187613	NC
9530014B07Rik	0.0115646	NC
5430416N02Rik	0.0162011	NC
4930447F24Rik	0.171856	NC
1700112J16Rik	0.00978442	NC
5430416N02Rik	0.0394886	NC
0610038B21Rik	0.278732	NC
4930447K03Rik	0.195024	NC

13. Anexo

Anexo 1 - Certificação da comissão de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 006/2016-1, sobre o projeto intitulado "*Geração de células tímicas epiteliais medulares (mTECs) knockout no gene regulador autoimune (Aire)*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de abril de 2016.

We certify that the protocol nº 006/2016-1 entitled "*Generation of medullary thymic epithelial cells (mTEC) clones knock-out in the autoimmune regulator gen (AIRE)*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/25/2016.

Ribeirão Preto, 25 de abril de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP