Amanda Cabral da Silva

MicroRNAs na tolerância operacional no transplante renal humano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2018**

Amanda Cabral da Silva

MicroRNAs na tolerância operacional no transplante renal humano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Amanda Cabral da
MicroRNAs na tolerância operacional no
transplante renal humano / Amanda Cabral da Silva. -
- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Tolerância ao
transplante 3.Rejeição de enxerto 4.MicroRNAs
5.Morte celular 6.Epigenômica

USP/FM/DBD-156/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico este trabalho aos pacientes transplantados e seus familiares. Também dedico aos 32 mil indivíduos (RBT., 2017) que, esperançosos, aguardam “na fila” por um doador.

RBT- Registro Brasileiro de Transplantes da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Verônica Coelho. Obrigada por todas as correções, discussões e pelo companheirismo desde o dia em que coloquei os pés em São Paulo. Obrigada por sentar comigo debaixo de um “pé de castanhola” para me ouvir ensaiar uma apresentação em inglês (tomara que um dia eu melhore, rsrs...). Quantas coisas incríveis pude viver debaixo do seu crucial apoio. Obrigada, mil vezes obrigada! Sem você nada disso seria possível.

Aos professores Edécio Cunha e Ludmila Ferreira pela valiosa colaboração (Muito obrigada, Lud!). Aos professores da banca de qualificação: Murilo Geraldo, Samirah Abreu e Ricardo Weinlich. À CAPES pela bolsa de mestrado. Aos queridos funcionários do laboratório de Imunologia, especialmente ao “trio citometria de fluxo”. Madá, obrigada por tudo! (Foi tanta ajuda que você merecia um capítulo). À “Santa” Sandra Maria “do perpétuo socorro” (Sandra, você é demais! Muito obrigada!). À Janaína por todo carinho e preocupação. Ainda agradeço aos demais funcionários do InCor: Soninha, Simoninha, Carlos Sérgio, Dr. Hécio, Dr. Nicolás, Samar e Karen, Déia, Selma, Marici, Malu, Washington, Renata, Karina, Gislaine, Clodô, Lilian, Camilinha, Geraldo, Maristela. Obrigada por tanta hospitalidade!!

Também agradeço aos meus queridos companheiros de laboratório: Priscila Carmona (Pri, que saudade!), Fernanda Magalhães (Perdi as contas de quantas vezes dormi na sua casa), Dani Vieira (minha companheira de bandeijão), Jamile (Obrigada pelos lanchinhos, rsrs...) e é claro, ao meu amigo Darlan (Chama a minha mãe, rsrs! Ainda bem que te conheci! Amo sua vida!). Ainda gostaria de agradecer publicamente à Rosemeire (Não dá para escrever um agradecimento sem falar o seu nome. Obrigada, Rose!), à Fernanda Alegria (Que é pura alegria!) e também à Laninha e a Ray (Quanta alma linda!).

Ainda agradeço às minhas tias, Socorro e Conceição, pois me receberam em suas casas (em períodos diferentes) nesse tempo que vivi aqui em SP. Meu eterno agradecimento à elas! Agradeço aos meus queridos pais (Arnaldo e Amparo) e aos meus irmãos (Aline, Diel e Pri). Obrigada pela paciência e apoio, eu nem sei mensurar o amor que tenho por vocês, eu não amo muito vocês, eu amo tudo! Também agradeço às minhas amigas: Vanessa Karla, Vanessa Ferraz, Naty, Sabrina, Tânia e Ivonete. Obrigada por todas as palavras de encorajamento!

Também agradeço a Deus! Pois sei que “seus olhos viram o meu corpo ainda informe e no seu livro toda essa história foi escrita (Salmos 139:16)”. Minha gratidão àquele que tem nas mãos o meu destino. *“És a minha realidade. 🎵❤”*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 Imunobiologia do transplante	14
1.2 Tolerância Imunológica	18
1.3 Tolerância Operacional no Transplante	21
1.4 microRNAs no contexto Imunológico.....	29
1.5 microRNAs no contexto Regula e Inflama.....	33
1.6 microRNAs na tolerância	37
2. OBJETIVOS	40
3.MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Desenho experimental	41
3.2 Sujeitos de Pesquisa	42
3.3 Extração e determinação da concentração de RNA total	43
3.4 Reação de transcrição Reversa e Pré-Amplificação	45
3.5 Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR)	47
3.6 Estratégia de normalização de dados.....	50
3.7 Estratégias para interpretação de dados.....	51
3.8 Identificação de alvos e vias pelo IPA.....	52
3.9 Análise da frequência dos efeitos de vida/morte	55
3.10 Análise estatística	57
4. RESULTADOS	59
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES.....	125
7. REFERÊNCIAS	126
8. APÊNDICE	137
APÊNDICE A - Dados clínicos.....	137

APÊNDICE B - Exemplo de análise no *software cloud*- curvas de PCR 138

APÊNDICE C-Critérios de seleção das Amostras..... 139

APÊNDICE D- Lista de microRNAs amplificados 141

9. ANEXOS 144

ANEXO 1 Classificação de Banff..... 144

ANEXO 2 Aprovação do comitê de ética..... 146

ANEXO 3 TCLE..... 150

ANEXO 4 Lista de microRNAs Card A e B..... 151

Lista de figuras

Figura1: Biogênese de miRNAs e formas de liberação extracelular.....31

Figura 2: Desenho experimental.....41

Figura 3: Exemplo do desenho das placas tecnologia TaqMan®.....48

Figura 4: Estratégia de análise utilizada no projeto.....52

Figura 5: Exemplo de filtros utilizados para selecionar alvos específicos.....53

Figura 6: Esquema gráfico da estratégia de análise no IPA.....54

Figura 7: Região “seed” 55

Figura 8: Agrupamento hierárquico baseado na correlação de Pearson.....60

Figura 9: microRNAs diferencialmente detectados entre TO x RC.....61

Figura10:microRNAs diferencialmente detectados entre TO x SAU.....64

Figura 11:microRNAs diferencialmente detectados entre TO x EST.....66

Figura12: Agrupamento funcional dos potenciais alvos dos miRNAs do perfil diferencial...68

Figura 13: Agrupamento Funcional dos Potenciais Alvos dos miRNAs do perfil
diferencial, nas diferentes células do sistema imune.....69

Figura 14:Número de alvos por microRNAs do perfil diferencial TO x RC.....70

Figura 15: As 12 primeiras vias canônicas alvo dos miRNAs do perfil diferencial.....73

Figura 16: Representação gráfica da via Flavina.....74

Figura 17: Representação gráfica da via de Granzimas B.....77

Figura 18: Representação dos potenciais efeitos na TO e RC, da via Granzima B, com
base nos níveis de microRNAs do perfil diferencial.....80

Figura 19: Representação gráfica da via de Receptor de morte.....82

Figura 20: Representação dos potenciais efeitos na TO e RC, na via de receptor de morte,
com base nos níveis de microRNAs do perfil diferencial encontrado

.....	88
Figura 21: Representação dos potenciais efeitos na TO e RC, na via de receptor de morte, com base nos níveis de microRNAs do perfil diferencial encontrado	89
Figura 22: Quantificação global dos efeitos de vida e morte na TO e RC.....	91
Figura 23: Representação gráfica da rede de interação molecular da rejeição do enxerto.....	93
Figura 24: Representação dos potenciais efeitos na TO e RC, da rede de interação molecular da rejeição do enxerto com base nos níveis dos microRNAs do perfil diferencial.....	100
Figura 25: Representação dos potenciais efeitos na TO e RC, da rede de interação molecular da rejeição do enxerto com base nos níveis dos microRNAs do perfil diferencial encontrado.....	101
Figura 26: Expressão relativa do miR-885-5p	102
Figura 27: Potenciais mecanismos de ação na tolerância operacional.....	104

Lista de tabelas

Tabela 1: Exemplo de microRNAs com funções relacionadas com o sistema imune 23

Tabela 2: Critérios de pontuação dos efeitos dos microRNAs 57

Tabela 3:miRNAs com detecção diferencial de níveis entre TO x RC comparados com o estado fisiológico.....55

Tabela 4:Número de alvos dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC.....67

Tabela 5: Potenciais efeitos do miR-27a-5p nos diferentes alvos da via Flavina, no contexto TO x RC.....75

Tabela 6: Potenciais efeitos do miR-27a-5p e miR-331 nos diferentes alvos da via Granzima B, no contexto TO x RC.....78

Tabela 7: Potenciais efeitos do miR-885, miR-1233 e do miR-1260a nos diferentes alvos da via Granzima B, no contexto TO x RC.....79

Tabela 8: Potenciais efeitos do miR-27a-5p nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC 83

Tabela 9: Potenciais efeitos do miR-331 e o miR-885 nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC 84

Tabela 10: Potenciais efeitos do miR-1260a nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC.....85

Tabela 11: Potenciais efeitos do miR-638 e miR-1233 nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC.....86

Tabela 12: Potenciais efeitos do miR-27a-5p nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto.....94

Tabela 13: Potenciais efeitos do miR-885 e miR-331 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto.....95

Tabela 14: Potenciais efeitos do miR-1260a e miR-1233 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto 97

Tabela 15: Potenciais efeitos do miR-638 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto.....98

Tabela 16: Dados demográficos e clínicos.....137

Tabela 17: Dados demográficos e clínicos TO (Individual).....138

Tabela 18: Dados demográficos e clínicos RC (Individual).....139

Tabela 19: Dados demográficos e clínicos EST(Individual).....140

RESUMO

A tolerância operacional (TO) é um estado de estabilidade funcional do órgão transplantado, após a parada de drogas imunossupressoras, por um período maior ou igual a um ano. Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam, negativamente, a expressão gênica de seus alvos, incluindo de moléculas relacionadas ao sistema imune, desempenhando um papel crítico na manutenção da homeostase. Nosso objetivo foi determinar se há um perfil diferencial de microRNAs na TO no transplante renal humano, indicando sua potencial participação nos mecanismos de tolerância. Analisamos o perfil sérico dos níveis de microRNAs na tolerância operacional (TO) (n= 8), comparando com rejeição crônica (RC) (n= 5), estáveis em uso de imunossupressão convencional (EST) (n= 5) e indivíduos saudáveis (SAU) (n= 5), utilizando, inicialmente, um painel de *primers* para 768 miRNAs, pela tecnologia TLDA (*TaqMan Low Density Array*). Detectamos um perfil diferencial nos níveis de microRNAs entre TO e o seu desfecho clínico oposto - RC- sugerindo que microRNAs podem integrar a rede de mecanismos envolvidos na tolerância ao transplante. Nesse *perfil diferencial*, alguns tiveram níveis maiores na TO: miR-885-5p (p=0,031), miR-331 (p=0,009), miR-27a (p=0,033), em comparação com RC, enquanto outros, o miR-1233-3p (p=0,029), miR-572 (p=0,028), miR-1260a (p=0,017) e o miR-638 (p=0,047) apresentaram menores níveis na TO. Na comparação de TO com o estado fisiológico (SAU), 2 dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC apresentaram níveis diminuídos na TO: miR-27a-5p, (p=0,033) miR-1260a (p=0,017) e, para os demais, não encontramos diferenças de níveis, indicando predomínio de preservação do perfil na TO, em relação ao estado fisiológico. Por bioinformática, foram preditas vias de sinalização e observamos que os genes alvos desses microRNAs tiveram, predominantemente, relação com morte celular, integrando as vias de granzima e receptor de morte. Considerando os diversos alvos dos microRNAs do perfil diferencial e seus potenciais efeitos de favorecer vida e morte, nessas duas vias, encontramos uma razão de vida/morte de 1,95 na TO e de 0,39 na RC, indicando o maior potencial de promoção de morte na RC e, de vida, na TO, pela ação desses microRNAs. Esses dados indicam que a regulação de vias relacionadas à morte celular pode integrar os mecanismos de tolerância imunológica no transplante renal humano. Selecionamos o miR-885-5p para validar os achados, em um número maior de amostras, e confirmamos maiores níveis na TO (n=8), em relação à RC (n=12; p=0,0063) e também em relação ao SAU (n=12; p=0,0035). Considerando que CASP3 é um dos alvos do miR-885, interpretamos que a sua ação, na TO, pode promover a menor expressão de CASP3 e, conseqüentemente, favorecer a sobrevivência celular. Concluímos que mecanismos epigenéticos podem integrar a

rede de mecanismos da tolerância ao transplante, como por meio da ação de microRNAs regulando a expressão de genes envolvidos com sobrevida/morte celular.

Descritores: Transplante de rim; Tolerância ao transplante; Rejeição de enxerto; microRNAs; morte celular; epigenética.

ABSTRACT

Operational tolerance (OT) is a state of functional stability of the transplanted organ, after stopping immunosuppressive drugs for a period of at least one year. MicroRNAs are small non-coding RNA that downregulate gene expression of their targets, including genes related to the immune system, playing a critical role in keeping homeostasis. Our objective was to determine whether there is a differential profile of microRNAs in OT in human renal transplantation, indicating their potential participation in the mechanisms of tolerance. We analyzed the serum profile of microRNAs levels in operational tolerance (OT) (n = 8), compared with chronic rejection (CR) (n=5), stable subjects using conventional immunosuppression (STA) (n = 5) and healthy individuals (HI) (n = 5), initially using a panel of primers for 768 miRNAs, by TaqMan Low Density Array (TLDA) technology. We detected a differential profile in the levels of microRNAs between OT and its opposing clinical outcome - CR - suggesting that the microRNAs can integrate the network of mechanisms involved in human transplantation tolerance. Within this differential profile, some microRNAs showed higher levels in OT: miR-885-5p (p = 0.031), miR-331 (p = 0.009), miR-27a (p = 0.033) compared to CR, while others, miR-1233-3p (p = 0.029), miR-572 (p = 0.028), miR-1260a (p=0.017) and miR-638 (p = 0.047) had lower levels in OT. Comparing OT with the physiological state (HI), 2 microRNAs of the *differential profile* presented decreased levels in OT: miR-27a-5p, (p = 0.033) miR-1260a (p = 0.017) but no differences for the others, indicating the predominance of preservation of the profile in OT, in relation to the physiological state. Using bioinformatics, we predicted signaling pathways and we found that the target genes of these microRNAs were, predominantly, related to cell death, integrating the granzyme and death receptor pathways. Considering the various targets of the microRNAs comprised in the *differential profile* and their potential life-and-death effects, in these two pathways, we found a life-to-death ratio of 1.95 in OT and 0.39 in CR, indicating the greater potential to promote death in CR, and life in OT, by the action of these microRNAs. These data indicate that the regulation of pathways related to cell death may integrate the mechanisms of immune tolerance in human renal transplantation. We selected miR-885-5p to validate the findings in a larger number of subjects, and confirmed higher levels in OT (n = 8), in relation to CR (n = 12, p = 0.0063) and in relation to HI (n = 12, p = 0.0035). Considering that CASP3 is a relevant target of miR-885, we interpret that its action in OT can promote a decrease in CASP3 expression and, consequently, favor the preservation of cell survival. We conclude that epigenetic mechanisms can integrate the network of mechanisms of transplantation tolerance, such as by the action of microRNAs, regulating the expression of genes involved in cell survival and death.

Keywords: Kidney transplantation, Transplantation tolerance, Rejection graft, microRNAs, cell death; epigenetics.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Imunobiologia do Transplante

O transplante alogeneico é uma modalidade terapêutica capaz de substituir tecidos ou órgãos com falência irreversível. Na clínica, dentre os transplantes de órgãos sólidos, o mais prevalente é o renal. Só no ano de 2017, mais de 5 mil transplantes renais foram realizados segundo dados atualizados do Registro Brasileiro de Transplantes- RBT, da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO (ABTO, 2018). Não há dúvidas que esse tipo de terapia melhore a sobrevida dos pacientes, a longo prazo, quando comparada àquela de pacientes com diálise de manutenção. No entanto, o desafio é ainda lidar com as complicações do pós-transplante, como as rejeições, principalmente aquela mediada por anticorpos e a rejeição crônica. Outro importante problema são os efeitos colaterais causados pelo uso prolongado das drogas imunossupressoras, que pode resultar em infecções (Fishman & Rubin, 1998; Le et al., 2017) câncer (Hojo et al., 1999; Caillard et al., 2012), nefro e cardiotoxicidade e distúrbios metabólicos (Jiménez-Pérez et al., 2016).

A rejeição do órgão é uma resposta inflamatória desencadeada pelo alorreconhecimento, onde o receptor de células T (TCR, do inglês, *T cell receptor*) reconhece os peptídeos e as Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC- do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) do doador, contra as quais a resposta alogeneica é predominantemente dirigida, culminando em uma deterioração funcional e estrutural do aloenxerto (Louis et al., 1987; Daniel et al., 1998; Moreau *et al.*, 2013). Em humanos, as moléculas HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) são algumas das moléculas localizadas na região MHC, cujos genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6. As moléculas do sistema HLA são classificadas em antígenos HLA classe I e antígenos HLA classe II e têm papel na apresentação de antígenos na superfície celular. Os antígenos HLA classe I estão localizados nos loci A, B e C e são expressos em todas as células nucleadas. Os

antígenos HLA classe II estão localizados nos loci DR, DQ e DP e são expressos nas superfícies das APCs (do inglês, *Antigen Presenting Cells*) e em algumas células, como nos linfócitos T pela indução de citocinas, como IFN-gama (Harton et al., 2000).

É importante ressaltar que dentro de cada subgrupo HLA (A, B, C, DR, DQ e DP), existem diversas variações na estrutura proteica, pois há diferentes alelos que codificam as proteínas HLA, indicando haver um alto grau de polimorfismo que gera diversidade entre os indivíduos. Essa diversidade, embora benéfica fisiologicamente, é um grande desafio no contexto do transplante, dificultando a busca de compatibilidade dos antígenos HLA entre potenciais doadores de órgãos e receptores, para que a resposta alorreativa inflamatória seja minimizada.

O alorreconhecimento das moléculas HLA pelos linfócitos T ocorre por diferentes vias. Na via direta, os linfócitos T do indivíduo receptor do órgão transplantado reconhecem moléculas HLA intactas, presentes nas células apresentadoras de antígenos ou diretamente no enxerto (Lechler et al., 1990). Na via indireta de alorreconhecimento, os linfócitos T do indivíduo receptor reconhecem peptídeos derivados de moléculas HLA alogeneicas do doador, processadas e apresentadas dentro de moléculas HLA próprias, nas APCs do indivíduo transplantado (Lechler and Batchelor, 1982; Shoskes et al. 1994). Na via semi-direta de alorreconhecimento, as moléculas HLA do doador são transferidas para a superfície das APCs ou de linfócitos T do receptor, por um mecanismo chamado de trogocitose (Herrera et al., 2004), estimulando a resposta alogeneica de outros linfócitos T do receptor (Herrera et al., 2004). O estímulo alogênico culmina na ativação de várias células do sistema imune, além dos linfócitos T alorreativos que, em conjunto, promovem a perpetuação da resposta inflamatória e agressão do enxerto.

Os antígenos HLA de classe I ativam os linfócitos T citotóxicos CD8⁺, dando início à expansão clonal de células alorreativas, que induzem citotoxicidade por meio da liberação de

grânulos citotóxicos, de perforinas e granzimas, culminando em morte celular (Ingulli et al., 2010). Os antígenos HLA de classe II ativam os linfócitos T auxiliares CD4⁺, dando início à diferenciação de células com perfil Th1 e Th2. A terminologia de Th1 e Th2 (do inglês, *T helper cell*) é utilizada para identificar dois subtipos de células T auxiliares (CD4⁺), de acordo com as citocinas produzidas, e com o perfil funcional. As células T auxiliares CD4⁺ Th1 produzem interleucina-2 (IL-2), que potencializa o estímulo para expansão clonal de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, bem como a produção de IFN-gama e TNF-alfa que são citocinas envolvidas em respostas inflamatórias (Ingulli et al., 2010). Essas células também levam à ativação de monócitos, macrófagos e células NK (do inglês, *Natural Killer*) e ainda auxiliam linfócitos B na produção de anticorpos. Esse conjunto de células efetoras pode migrar para o enxerto e participar da agressão ao tecido (Ingulli et al., 2010).

As células T auxiliares CD4⁺ Th2, que produzem principalmente as interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10) e 13 (IL-13) estão envolvidas na resposta imune humoral, mas também tem atividade imunorreguladora no transplante (Nickerson et al., 1994). As interleucinas do perfil Th2, principalmente a IL-4, por serem importantes fatores de crescimento de linfócitos B, levam à expansão clonal de plasmócitos e à produção de anticorpos, cuja interação com aloantígenos específicos ativa a resposta inflamatória podendo desencadear a ativação do sistema complemento e lise celular. Outro mecanismo de ação efetora dos aloanticorpos pode ser a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody- Dependent Cellular Cytotoxicity- ADCC*) com ativação de células NK ou de macrófagos, promovendo lise das células-alvo (Rocha et al., 2003).

Neste contexto, vale destacar o importante papel co-estimulador desempenhado pelas moléculas B7 (CD80 [B7-1] ou CD86 [B7-2]) na APC, uma vez que elas se ligam a moléculas CD28 nas células T levando à sua ativação (Sansom et al., 2000). Em contraste, a ligação de moléculas B7 à molécula CTLA-4, em células T, fornece sinais inibitórios. Embora na fase inicial, as células dendríticas derivadas do doador atuem como APC, estimulando

linfócitos T alorreativos, principalmente pró-inflamatórios, em uma fase posterior, a estimulação da célula T CD4⁺ ocorre, principalmente, pela via apresentação indireta de antígenos pelas células APC do receptor.

Vários critérios morfológicos foram propostos para a classificação das rejeições aguda e crônica do enxerto. Essa categorização, conhecida como “classificação de Banff” tem sido importante para a interpretação da biópsia renal após o transplante e o diagnóstico de diferentes tipos de rejeição (Racusen et al., 1999; Solez et al., 2008; Haas et al., 2013; Loupy et al., 2017) (ANEXO 1). As rejeições no transplante renal são, atualmente, classificadas como mediadas por células T ou mediadas por anticorpos, ambas podendo ser aguda ou crônica. É importante destacar, no entanto, que muitas vezes os mecanismos são sobrepostos e há constante debate sobre as classificações das rejeições, principalmente da rejeição crônica. Atualmente, o termo rejeição crônica, tem sido substituído progressivamente por: Rejeição crônica mediada por linfócitos T; Rejeição crônica ativa, mediada por linfócitos B e Fibrose intersticial e atrofia tubular de causa desconhecida (IFTA).

Como vimos, distintos mecanismos imunológicos estão envolvidos em uma resposta inflamatória que induzem alterações morfológicas e funcionais no enxerto. Entretanto, é importante ressaltar que o sistema imunológico dispõe de componentes e mecanismos imunorreguladores diante de intensas respostas inflamatórias experimentadas ao longo da vida, fundamentais na manutenção da homeostase do organismo (Bartolucci and Piccirillo 2017). Dentre os componentes imunorreguladores, podemos destacar as células Tregs (do inglês, *regulatory T cells*) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ que podem ser classificadas em dois grupos, conforme sua origem e sítio de desenvolvimento: Treg tímicas (naturais), de origem tímica, e as células Tregs induzidas, provenientes de linfócitos maduros na periferia (Sakaguchi et al., 2008). As Tregs têm habilidade de suprimir inflamação tecido específica, em resposta a antígenos expressos diretamente em tecidos inflamados (Cohen, 2000), e sua resposta pode ser desencadeada no início da resposta imune celular (O’ Gorman et al., 2009). Dentre os

mecanismos de ação das Tregs está a atividade de citocinas imunorreguladoras, como a IL-10 e TGF-beta, que atuam inibindo a proliferação de células T efetoras (Chen et al., 2003; Sakaguchi et al., 2004). Além das Tregs, podemos citar outras células e moléculas envolvidas na imunorregulação, como os macrófagos M2, as células Th2 (ambos, também produtores de IL-10) (Sica et al., 2000; Moore et al. 2001), células dendríticas tolerogênicas (Steinman et al., 2003), proteínas do choque térmico, entre outros. Estas e outras células e moléculas compõe uma rede de mecanismos imunorreguladores que atua no estabelecimento e manutenção da homeostase. No entanto, vale destacar que, apesar da ativação de mecanismos imunorreguladores, no microambiente do enxerto ocorre um predomínio de respostas inflamatórias que se sobrepõem às que são reguladoras.

Uma vez que a resposta inflamatória no transplante não é completamente controlada por mecanismos fisiológicos de imunorregulação, a agressão ao enxerto pode ser controlada com o uso de drogas imunossupressoras (IS). No entanto, como mencionado anteriormente, essas drogas possuem diversos efeitos colaterais, entres eles, o maior risco para infecções e câncer. Diante disto, um grande desafio de interesse clínico é induzir um estado de tolerância no transplante, onde o sistema imune se mantenha competente frente aos desafios patogênicos, ao mesmo tempo em que a função do enxerto mantenha-se preservada. A indução de tolerância imunológica, tão almejada para o indivíduo transplantado, é um estado de equilíbrio entre as respostas imunológicas **Regula** (respostas imunorreguladoras) e **Inflama** (respostas pró-inflamatórias), que culmina na não agressão significativa do órgão transplantado.

1.2 Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica é um estado ativo de equilíbrio biológico, construído, continuamente, ao longo da vida do indivíduo, no qual o sistema imune mantém um controle fino de respostas imunológicas dirigidas a múltiplos antígenos, não havendo agressão

significativa e prolongada a tecidos, órgãos, microbiota, entre outros (Germain et al. 2012; Elber et al., 2016). A tolerância imunológica é um termo que engloba um estado de homeostase imunológica envolvendo diferentes contextos e antígenos (Devlin *et al.*, 1998; Erlebach et al., 2013; Faria., *et al.*, 2005).

A tolerância ao próprio (autoantígenos) é um estado fisiológico adquirido ao longo da vida, envolvendo múltiplos mecanismos interligados, importantes na preservação dos tecidos próprios do indivíduo. A quebra da tolerância ao próprio resulta em doenças autoimunes (Rose et al., 1993; Cotsapas et al., 2013). A tolerância ao próprio pode ser classificada em tolerância central (mecanismos ocorrem nos órgãos linfóides primários) e tolerância periférica (mecanismos ocorrem em órgãos linfóides secundários e nos próprios tecidos), compreendendo múltiplos mecanismos que, em conjunto, são determinantes na homeostase imunológica. Na seleção tímica, a reatividade aos antígenos próprios é regulada durante a maturação, e esse processo tem grande impacto na tolerância ao próprio. Diversas moléculas estão envolvidas neste fenômeno, regulando genes que participam do processo de seleção positiva e negativa no timo (Klein et al., 2014).

Na tolerância imunológica a antígenos não próprios, destacam-se mecanismos imunorreguladores presentes na mucosa intestinal, que podem atuar na tolerância à própria microbiota e aos antígenos que ingerimos, cotidianamente, na alimentação (Elber et al., 2016). A perda desta tolerância resulta em doenças inflamatórias intestinais, tais como alergias alimentares ou a doença de Crohn (Faria., *et al.*, 2005; Gong et al., 2016).

A tolerância ao não próprio inclui também a tolerância a aloantígenos. É importante destacar que, diferentemente do que ocorre no transplante, na gravidez bem sucedida há tolerância aos aloantígenos, e esta acontece fisiologicamente (Erlebach et al., 2013). O interessante deste fenômeno é que, embora exista uma resposta inflamatória dirigida aos aloantígenos presentes no feto, uma vez que metade dos genes de histocompatibilidade do

feto e da placenta são alogeneicos em relação à mãe, há geralmente, manutenção da gravidez, com predomínio de respostas imunorreguladoras (Erlebache et al., 2013).

No transplante, diversas estratégias experimentais já foram desenvolvidas com o objetivo de induzir tolerância ao aloenxerto, entre as mais antigas estão, a irradiação linfóide total do indivíduo receptor do órgão, seguida de tratamento com anticorpos policlonais-ATG (Strober et al., 1989), indução de microquimerismo (Starzl et al., 1992) e, o tratamento com anticorpos monoclonais bloqueadores das moléculas coestimuladoras CD40 e CD28 em modelos experimentais (Larsen et al., 1996). Diversas foram as limitações e riscos associadas a estas formas de indução de tolerância, entre os riscos estava a alta toxicidade e, embora algumas dessas estratégias tenham induzido melhor sobrevida dos enxertos, seja nos indivíduos transplantados e/ou em modelos experimentais, nenhuma foi capaz de manter um estado prolongado de tolerância sem uso de imunossupressores.

Diante dos desafios clínicos e experimentais no transplante, a terapia celular surge como uma forte estratégia terapêutica para imunorregulação e mesmo indução de tolerância. Atualmente, há diversos ensaios clínicos de terapia celular em andamento (www.clinicaltrials.gov). Dentre eles, destacamos a infusão de células dendríticas reguladoras no transplante hepático (NCT031642285) e a infusão de células mesenquimais no enxerto renal (NCT02409940), ambos em fases iniciais. Há também ensaio de fase IV testando a expansão de células Tregs endógenas, por meio de aplicação de baixas doses de IL-2 em receptores de transplante de fígado (NCT02949492), e um ensaio de fase I/II que envolve a purificação de células Tregs de ocorrência natural (nTregs) que serão expandidas *in vitro* e re-infundidas no paciente cinco dias após o transplante de rim (NCT02129881).

Acredita-se que a terapia celular poderá ser, no futuro, uma estratégia terapêutica utilizada para a minimização do uso de imunossupressores e promoção de uma resposta mais eficiente de imunorregulação, controle da inflamação e mesmo indução de tolerância ao

enxerto. No entanto, acreditamos que ainda será necessário desenvolver ferramentas que ajudem na manipulação da célula para o controle de sua sobrevivência, fenótipo e função. Na terapia para regeneração cardíaca, por exemplo, há diversos estudos com células troncos inoculadas, nas quais investigam-se os problemas da não efetividade da terapia, como aqueles que influenciam a morte celular impedindo-as de atuar na regeneração do tecido (Abdelwahid et al., 2016). Neste sentido, “proteger” a célula inoculada da morte requer progresso em várias frentes, incluindo biologia celular, molecular, bioinformática e outras áreas. Controlar as principais causas de morte de células inoculadas, ou mesmo de células endógenas, pode ser um dos caminhos para o sucesso da terapia celular com diferentes tipos celulares. Sendo assim, os passos seguintes, para a melhoria da terapia celular, provavelmente envolverão o controle da morte celular, além da padronização clínica da quantidade de células, formas de administração, especificidade e eficácia, entre outros parâmetros. Diante disso, as limitações que, atualmente, impedem o uso da terapia celular, isoladamente ou em combinação com agentes farmacológicos, no transplante, tornam a tolerância ao aloenxerto, ainda um grande desafio clínico.

1.3 Tolerância Operacional no Transplante

No transplante clínico, há um grupo raro de pacientes que mantêm função estável do enxerto, após a suspensão de imunossupressores, por um período maior ou igual a um ano, ao mesmo tempo em que mantêm imunocompetência frente a microrganismos patogênicos. Este estado é chamado de tolerância operacional (TO) (Devlin *et al.*, 1998; Ashton-Chess *et al.*, 2006; Brouard *et al.*, 2012; Massart et al., 2016). A TO, apesar de ser mais frequente no transplante hepático (Alex et al., 2012), também tem sido descrita no transplante renal por diversos grupos (Brouard et al., 2005; Ashton-Chess et al., 2006; Moraes-Vieira et al. 2012; Massart et al., 2016).

Há relatos de cerca de 250 pacientes reconhecidos como tolerantes ao enxerto renal em todo o mundo (Massart et al., 2017). A baixa frequência de tolerância operacional, entre indivíduos transplantados renais torna o fenômeno um campo de estudo ainda mais desafiador. As estratégias de pesquisa nesse campo têm se concentrado em determinar potenciais mecanismos envolvidos na TO, além de buscar biomarcadores que podem diferenciar, dentre os indivíduos transplantados em uso de imunossupressor, aqueles que possam ter um perfil semelhante ao encontrado na TO e, assim, ter a oportunidade de se beneficiar com a diminuição ou até mesmo a retirada dos imunossupressores dentro de ensaios clínicos.

Na clínica, ainda não é possível a retirada total de imunossupressores no transplante renal. Os indivíduos tolerantes são pacientes que fizeram retirada do imunossupressor por decisão própria, por diversas razões de ordem pessoal. Apesar de saber que diversos fatores podem estar associados à maior sobrevida do enxerto, como, por exemplo, menor número de disparidades para antígenos HLA (Thorsby et al., 1970), enxerto proveniente de doador vivo (Marino et al., 1995), menor tempo de isquemia (Novick et al., 1999) e outros, ainda não foi possível estabelecer um perfil de características clínicas diferenciais entre os tolerantes operacionais. Sabemos que uma menor disparidade para antígenos HLA é importante para o bom prognóstico do transplante, mas sozinha não determina o estado de tolerância operacional. Temos visto em nosso Estudo Multicêntrico e em outros grupos que, mesmo com ausência de disparidades HLA, alguns pacientes evoluem para o estado de rejeição crônica. Por outro lado, mesmo com disparidades HLA e com presença de DSA (anticorpos específicos contra o doador), ocorre tolerância operacional (Roussey-Kesler *et al.*, 2006). O período médio de sobrevida do enxerto observado na TO, até o momento, em diferentes estudos é de $9,4 \pm 5,7$ anos (Roussey-Kesler et al., 2006). Em nosso grupo, o tempo de tolerância operacional também apresenta grande variedade. Até os dias de hoje (março 2018) o tempo de tolerância operacional dos sujeitos de pesquisa do nosso estudo, variou de 2 a 34

anos (Apêndice A). Isso indica que o estado de TO pode ser muito estável em alguns indivíduos.

É importante ponderar que o estado de tolerância operacional também pode ser temporário. Indivíduos tolerantes podem perder a capacidade de tolerar o aloenxerto. Entretanto, acreditamos que o fato desses indivíduos terem vivenciado, mesmo que por um breve período, um estado de tolerância ao enxerto, buscar os mecanismos que podem ter participado deste equilíbrio biológico é importante para desenvolver estratégias que ajudem no processo de indução e manutenção de tolerância ao transplante.

Acredita-se que a ação sinérgica de diversos mecanismos, que podem ser influenciadas pelas experiências imunológicas vivenciadas pelo indivíduo, ao longo da vida, atuem no estabelecimento da homeostase na tolerância operacional, por meio da ativação diferencial de diversos tipos celulares e vias moleculares. No entanto, é importante destacar que esses perfis celulares e moleculares não são, necessariamente, específicos do estado de TO, podendo haver um perfil para determinadas moléculas e vias moleculares, compartilhado com indivíduos saudáveis. No processo de restabelecimento da homeostase, a condição biológica da TO leva à ativação de determinados mecanismos e inibição de outros, ocorrendo um perfil diferencial da rejeição crônica para parâmetros imunológicos potencialmente críticos, mas este perfil pode ou não ser semelhante ao encontrado em indivíduos saudáveis.

O perfil imunológico da TO, no transplante renal, tem sido alvo de investigação há décadas. Foi visto que indivíduos tolerantes operacionais apresentam números similares de células T com o fenótipo imunorregulador $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, àqueles apresentados por indivíduos saudáveis, enquanto indivíduos com rejeição crônica apresentam números inferiores (Braudeau et al., 2007; Moraes-Vieira et al., 2012). Nos principais achados do nosso grupo, que resumiremos mais adiante, a tolerância operacional também apresenta diversas similaridades imunofenotípicas ao estado fisiológico. Além disso, foi visto que indivíduos com rejeição crônica têm menor expressão nos transcritos de FOXP3, fator de transcrição

importante na manutenção do fenótipo das Tregs, e apresentam uma maior quantidade de células T CD4⁺CD25⁻ com perfil associado com atividade citotóxica: NKG2⁺, CD94⁺ e CD57⁺ CD27⁻ CD28 (Louis et al., 2006).

Recentemente, foi descrito que a porcentagem de células CD4⁺CD25^{hi}CD45RA⁻CD45RO⁺Foxp3^{hi}CD127^{lo}, com um padrão específico de demetilação em FOXP3, era maior na TO do transplante renal quando comparado a indivíduos estáveis (em uso de imunossupressão - EST), voluntários saudáveis e indivíduos com rejeição crônica (RC) (Braza et al., 2015). Além da desmetilação de FOXP3, as Tregs chamadas de memória (mTregs) (Braza et al., 2015) expressam mais a ectonucleotidase CD39 e GITR (também conhecido como *TNF receptor superfamily member 18*), que é um receptor relacionado com propriedades supressoras. O estudo enfatiza que essas mTregs, potencialmente envolvidas na TO, têm maior atividade supressora do que aquelas de pacientes EST ou com RC (Braza et al., 2015). A demetilação da região Foxp3 é importante para a indução e estabilização deste fator de transcrição, favorecendo a diferenciação e a função supressora das Tregs, em modelos experimentais (Toker et al., 2013). Dentre as diversas funções de CD39⁺ em Tregs, como a geração de adenosina que tem atividade imunorreguladora (Antonioli et al., 2013), destacamos a sua ação de clivagem de ATP para AMP (Borsellino et al., 2007). O ATP extracelular tem múltiplos efeitos pró-inflamatórios, uma vez que ele é liberado como “alarmina” indicando morte celular (Borsellino et al., 2007). Como a molécula CD39⁺ nas Tregs pode clivar o ATP extracelular impedindo que essas “alarminas” favoreçam uma resposta pró-inflamatória, consideramos que esse mecanismo tem uma ação imunorreguladora no transplante, por controlar no microambiente onde ocorre intensa morte celular, uma resposta inflamatória exacerbada.

Além das Tregs, outros trabalhos também têm incluído características do compartimento de células B, como importantes nos mecanismos que contribuem para o estado

de TO (Chesneau et al., 2018). Alguns grupos afirmam haver maior percentagem e número absoluto de células B periféricas na TO (naive e de transição, Breg) (Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010). No entanto, nesses trabalhos não há a interpretação de que essas células na TO diferem em números da RC ou EST, mas são preservadas como no estado fisiológico. Alguns autores sugerem que as células Bregs (ou de transição) estão envolvidas na indução e/ou manutenção da tolerância na TO. São discutidos diferentes mecanismos associados à ação das células Bregs no TO, como por exemplo, a maior produção de IL-10 quando comparado a indivíduos EST (Newell et al., 2010; Nova-Lamperti et al., 2017).

Em relação às células B naives, acredita-se que estas podem ser funcionalmente diferentes na TO quando comparadas àquelas de indivíduos EST. Foi visto que as TfhCD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ (do inglês, *T follicular helper cell*), que desempenham um papel crítico na diferenciação de células B, exibem um perfil de expressão gênica modificado na TO, e discute-se que isto pode torná-las incapazes de induzir a produção de IgG a partir de células B naives (Chenouard et al., 2016). Este “defeito” nas Tfh sugere que, na TO, essas células promovem um ambiente mais tolerogênico pela redução do risco de desenvolvimento de DSA (do inglês, *Donor Specific Antibody*) (Chenouard et al., 2016). Os autores sugerem novas possibilidades sobre os mecanismos de resposta de anticorpos na tolerância operacional. No entanto, precisamos mencionar que a presença de DSA embora crítica, não é determinante no desenvolvimento de rejeição crônica. Há detecção de DSA em pacientes tolerantes, e não parece impedir o desenvolvimento e manutenção da TO (Brouard et al., 2012). Além disso, no trabalho acima citado, a diferença na expressão gênica veio da comparação de TO com indivíduos em uso de imunossupressor que mantém estável o órgão transplantado. Deste modo, este perfil diferencial pode não ser muito informativo para levantar hipóteses sobre potenciais mecanismos de ação envolvidos com a TO. Se o perfil diferencial encontrado na TO for semelhante àquele na rejeição crônica, não poderia ser sustentada a hipótese deste perfil ter papel nos mecanismos de TO. Neste trabalho também

não houve comparação TO com o SAU para identificar se essas “diferenças” na expressão dos genes da Tfh na TO são semelhantes ou diferentes do estado fisiológico. Este dado é importante pois pode ser que, se o perfil de genes expressos nas Tfh na TO for semelhante ao do estado fisiológico, as modificações na expressão gênica podem estar ocorrendo no grupo EST, o chamado “defeito” da Tfh pode ser do grupo EST, em relação ao estado fisiológico.

No compartimento B, também houve buscas por uma assinatura imunológica que discriminasse o estado de TO. Muitos grupos avaliaram a expressão diferencial de genes específicos (Saggo et al., 2010; Newell et al., 2010; Lozano et al., 2011). Um gene em especial aparece como diferencialmente expresso nos diferentes estudos, o MS4A1 (do inglês, *membrane spanning 4-domains A*), também conhecido como CD20 (Saggo et al., 2010; Newell et al., 2010; Lozano et al., 2011). Esta molécula, que também foi encontrada em maiores quantidades nas amostras de urina de indivíduos TO, tem papel no desenvolvimento e diferenciação de células B (Newell et al., 2010). No entanto, como esses trabalhos se dedicaram a determinar biomarcadores, nenhum destes estudos discute, com profundidade, quais os potenciais papéis do conjunto de genes da “assinatura imunológica” na TO. Devido a múltiplas funções das moléculas descritas, este perfil diferencial de transcritos gênicos poderia ser revisitado para auxiliar na elaboração de hipóteses de como estes atuariam nos mecanismos de tolerância operacional.

Ademais, outras críticas foram levantadas em relação aos até então publicados “biomarcadores” da TO. Foi discutido que esses estudos e, consequentemente seus resultados, carregam um viés crítico do efeito das drogas imunossupressoras. Desse modo, não são dados confiáveis como discriminadores do estado de TO. Por análises estatísticas sofisticadas, considerando-se os efeitos de diferentes drogas imunossupressoras, observou-se que as diferenças dos biomarcadores entre TO e RC, descritos na literatura, desapareceram (Rebollo et al., 2016). Isto levou à conclusão de que é necessário verificar esta questão crucial para

qualquer proposta de biomarcadores. O grupo que originou a crítica revisitou todos os seus resultados brutos e selecionou novos candidatos para biomarcadores, livres do efeito de drogas IS. Sendo assim, uma nova assinatura foi proposta, composta por 9 genes. Sendo 4 menos expressos na TO quando comparado ao EST: ATXN3; BCL2A1; EEF1A1; NFκBIA e TNFAIP3 e outros com maior expressão: GEMIN7; IGLC1; MS4A4A e RAB40C (Rebollo et al., 2016). Os genes incluídos nessa “nova assinatura de TO” participam de vias celulares envolvidas com a regulação do metabolismo, transcrição, apoptose, comunicação e ciclo celular. Todavia, gostaríamos de pontuar que, embora a escolha dos grupos comparativos ajude a distinguir a TO do estado onde a manutenção do órgão transplantado ocorre via uso de IS (grupo EST), parece-nos incorreto levantar hipótese de potenciais mecanismos com base nesta assinatura, pois o grupo comparativo escolhido não tem um desfecho oposto ao da tolerância, ou seja, não sabemos se este perfil diferencial também não está presente na RC.

Em muitos estudos, temos constatado equívocos desta natureza, na interpretação dos resultados, frente à comparação com diferentes grupos clínicos. A falta de comparação com um grupo de indivíduos saudáveis, por exemplo, impossibilita interpretações de aumento, diminuição ou mesmo da manutenção da expressão dos diversos componentes estudados. A comparação com o grupo em rejeição crônica, nos possibilita levantar hipótese sobre potenciais mecanismos imunorreguladores que podem ter sido perturbados na rejeição e preservados ou acionados de forma efetiva na tolerância. A comparação com o EST em uso de imunossupressores também fornece informações interessantes, uma vez que, nesse grupo pode haver indivíduos com potencial de evoluir para TO, outros para rejeição e outros de se manter estável, sob imunossupressão. Não considerar esses grupos nas comparações com os achados em TO, limita as interpretações biológicas e podem nos levar a interpretações equivocadas a respeito de potenciais mecanismos que podem estar atuantes e ser relevantes na tolerância ao enxerto.

Nosso grupo também tem estudado potenciais mecanismos na tolerância operacional no transplante renal. Nossos principais achados mostram que o grupo tolerante operacional apresenta diversas similaridades imunológicas aos indivíduos saudáveis, em relação aos números de células B reguladoras (Bregs) (Silva *et al.*, 2012) e Treg (Moraes-Vieira *et al.*, 2012), enquanto o grupo de rejeição crônica apresenta menores números dessas subpopulações imunorreguladoras. Esses dados sugerem que manter números dessas subpopulações imunorreguladoras seja importante nos mecanismos de TO. Com base nos dados do nosso grupo também sugerimos que, por estar aumentada na TO e diminuída na RC, a molécula GATA3, que é um fator de transcrição envolvido na diferenciação de células Th2, pode desempenhar um papel importante na indução/manutenção do estado de tolerância operacional, por favorecer a diferenciação de células do tipo Th2, sendo este um perfil, predominantemente, imunorregulador no contexto do transplante (Walsh *et al.*, 2004; Tay *et al.*, 2009).

Nosso grupo também estudou algumas vias de sinalização envolvidas em processos reguladores da resposta imune, tanto em linfócitos T e B, quanto em monócitos. Observamos que indivíduos tolerantes possuem uma menor capacidade de fosforilar o fator de transcrição STAT6 em monócitos, quando estimulados com IL-4 (Moraes-Vieira *et al.*, 2010), sugerindo um favorecimento de condições para desenvolvimento de células dendríticas com um potencial tolerogênico e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Moraes-Vieira *et al.*, 2010).

Testamos, recentemente, se a resposta celular específica do antígeno é modulada diferencialmente na tolerância operacional (OT) no transplante renal, em relação aos desafios antigênicos críticos no alotransplante: HLA do doador, patógeno e autoantígenos. Vimos que, em contraste com a rejeição crônica e o estado fisiológico, a tolerância operacional dá origem a um desvio imunorregulador na resposta celular aos peptídeos HLA-DR do doador,

preservando a resposta pró-inflamatória aos peptídeos do patógeno CMV- Citomegalovírus. O desvio imunorregulador da alorreatividade indireta a antígenos HLA-DR do doador, na tolerância operacional, com a inibição de IL-1B, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, IFN- γ e MCP-1, indica que estes podem ser mecanismos importantes na TO (Carmona et al., 2018 submetido).

Dada a dificuldade em se obter biópsias do enxerto de indivíduos em TO, por razões éticas, a confirmação de que células com perfil imunorregulador estariam atuando no microambiente do enxerto é limitada. Não obstante, nos poucos trabalhos publicados sobre o perfil imunológico *in situ*, foi observada a presença na TO de células Tregs no enxerto hepático (Koshiba et al., 2007) e alta expressão de FOXP3 no enxerto renal (Kawai et al., 2008). Embora uma compreensão global dos mecanismos potencialmente envolvidos na tolerância operacional continue a ser elaborada, sabemos que na TO há um perfil celular diferencial em relação às Tregs e Bregs, quando comparado ao estado de RC. Este perfil nos parece crítico na manutenção da homeostase ao aloenxerto. No entanto, não se sabe como este perfil celular e sobre quais estímulos ele pode ser regulado e mantido.

Na tolerância operacional, diversos são os componentes e mecanismos que atuam no reestabelecimento da homeostase frente ao desafio alogeneico. Considerando que o estado de equilíbrio biológico é uma rede complexa de interações celulares e moleculares, acreditamos que novos componentes e mecanismos que já têm papel descrito na homeostase precisam ser mais explorados. Questionamos se os microRNAs, que também modulam a expressão de diversos transcritos envolvidos com a resposta imunológica, podem contribuir, em conjunto com outros componentes da homeostase, na manutenção da tolerância imunológica ao aloenxerto renal.

1.4 miRNAs no contexto imunológico

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs curtos não-codificantes de 22 a 24 nucleotídeos, descritos, inicialmente, em *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Os microRNAs fazem

parte dos mecanismos epigenéticos, sendo assim, são capazes de promover alterações fenotípicas duradouras sem alterar o genótipo da célula. Este processo ocorre via regulação da expressão gênica (Chuang et al., 2007). A constatação de que muitas sequências de microRNAs foram evolutivamente conservadas entre organismos distintos, indica que os miRNAs, estando envolvidos em processos celulares básicos, incluindo a diferenciação celular e proliferação, integram os mecanismos de homeostase com vantagens evolutivas (Bartel., 2004; Kroesen et al., 2015). É importante destacar que um miRNA pode regular a expressão de vários genes, e cada gene pode ser regulado por diversos miRNAs. Em consequência dessa rede complexa de interações, estima-se que até 50% dos genes codificadores de proteínas podem estar sob a influência de miRNAs.

A transcrição dos miRNAs é realizada pela RNA polimerase II ou III, formando um longo transcrito denominado miR primário ou pri-miRNA (de “primary miRNA”), o qual sofre a adição de uma cauda poli-A na extremidade 3’, e de “cap 7-metil-guanosina” na extremidade 5’ (Kim et al., 2005). O pri-miRNA formado é, então, processado pelo complexo constituído pela RNase III Drosha e seu co-fator, DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical region gene 8*), que o cliva, formando o pré-miRNA. Este último, um miRNA de fita dupla em forma de grampo (hairpin), com cerca de 70 nucleotídeos é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-guanosina trifosfato (GTP). No citoplasma, o pré-miRNA é processado por outra RNase III, Dicer, gerando um duplex miR:miR (Kim, 2005). Em seguida, este duplex associa-se ao complexo multiproteico RISC (de “*RNA-induced silence complex*”). Uma das fitas da molécula constitui o miRNA maduro, capaz de impedir, quando pareado por complementaridade, a tradução do RNA mensageiro alvo (Kim, 2005). O pareamento do microRNA com um RNAm alvo pode alterar a estabilidade da molécula de RNA levando-a à degradação ou, alternativamente, pode bloquear a maquinaria de tradução proteica (Kim et al., 2005). Este silenciamento pós-transcricional leva à diminuição na expressão do gene alvo (Kim et al., 2005; Chuang et al., 2007).

Outra característica importante dos miRNAs é a sua estabilidade em fluidos e tecidos corporais, incluindo o soro (Chen., 2008). Eles podem ser empacotados em microvesículas e/ou exossomas, ou transportados por proteínas de ligação a RNA (complexos Argonaute2) e lipoproteínas, que os protegem contra a degradação (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011) (Figura 1). Secretados, ativamente, para o microambiente extracelular ou em fluidos corporais, os microRNAs podem ser capturados por outras células e, com isso, alterar o programa transcricional das células receptoras (Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2012). No câncer, já foi visto que as células tumorais podem suprimir *in vitro* e *in vivo*, a captação de glicose de células não tumorais no nicho pré-metastático, por secreção de vesículas que carregam altos níveis do miR-122 (Fong et al., 2015). Este efeito ocorre via regulação da PKM (do inglês, *pyruvate kinase*), uma importante enzima da via glicolítica (Fong et al., 2015). Os microRNAs circulantes também podem atuar de múltiplas maneiras, por diferentes estruturas de empacotamento. Já foi visto que corpos apoptóticos podem transferir o miR-126 para células endoteliais, e este miRNA silencia o inibidor de sinalização da proteína G RGS (do inglês, *G protein-coupled receptor*), levando a um aumento na secreção de CXCL12, induzindo o reparo endotelial (Zernecke et al., 2009).

Figura 1:Biogênese de miRNAs e formas de liberação extracelular. Após clivagem dos pri-miRNAs, os pré-miRNAs são gerados no núcleo pela enzima ribonuclease III - Drosha (1). Os pré-miRNAs são, então, transportados para o citoplasma por meio de um processo envolvendo Exportin-5 (2) e, ainda, clivado por Dicer para formar 21-23 duplexes de nucleotídeos (3). Uma fita do duplex miRNA pode associar-se ao complexo RISC que guiará o microRNA ao sítio de repressão do mRNA alvo (4) ou atuará na sua liberação extracelular. O miRNA maduro pode ser liberado de diferentes formas. Por proteínas de ligação ao RNA, como Argonaute-2 (5) ou a lipoproteínas (6). Podem ser carregados em microvesículas (7) ou em exossomos (8). Guay& Regazzi 2013.

Sabendo que, em contextos patológicos, há alterações nos níveis de determinados microRNAs, é coerente levantar a hipótese de que, os microRNAs circulantes podem ter papel na manutenção da homeostase ou podem ser indicativos de perturbação a mesma. Devido ao seu amplo acesso à circulação e à sua atividade epigenética, os microRNAs circulantes têm potencial de regular a atividade de células periféricas, como as células do sistema imune, bem como, células de órgãos sólidos. Entretanto, estima-se que 90-95% dos microRNAs circulantes podem estar acoplados à proteína AGO2, uma vez que são, frequentemente, ligados a ela no processo de biogênese (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011). Tem sido discutida se esta liberação, associada à AGO2, é um processo ativo e passível de absorção por células adjacentes. A determinação desta característica é importante para

identificar os mecanismos pelos quais células e órgãos podem ter seus transcritos regulados. O impacto de determinados microRNAs, no controle da expressão gênica de suas células de origem e de células adjacentes tem sido bem estabelecido, como veremos mais adiante, nas células do sistema imune. Entretanto, ainda não é conhecido se os microRNAs podem regular de maneira “endócrina”, ou seja, a longas distâncias, a função de diferentes células.

Diversos estudos em que utilizaram camundongos *knockouts* para *Dicer* ou *Drosha* (Enzimas envolvidas na maquinaria da geração de miRNAs), ou para miRNAs específicos, têm fornecido resultados sobre a interação dos miRNAs com células e moléculas da resposta imune. Esses estudos têm mostrado que miRNAs regulam, dinamicamente, a diferenciação de células T e B como resumido na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de miRNAs com funções relacionadas com o sistema imune

miRNA	Subpopulação Estudada	Alvo dos miRNAs nessas células	Função dos genes alvo	Efeito Observado	Referência
miR-20b	T helper	STAT3 e ROR γ t	A sinalização via STAT3 é um requisito para a regulação da expressão de ROR γ t e IL-23R na diferenciação de Th17	Alta expressão de miR-20b inibe a diferenciação em células de Th17	Zhu et al., 2014
cluster microRNA-212/132	Pró-B	SOX4	É um regulador do desenvolvimento de células B	Alta expressão de miR-132 inibe a transição da célula pré B para pró-B	Mehta et al., 2015
miR-29	CD4 ⁺ T helper	T-bet, EOMES	T-bet e Eomes têm papéis conhecidos na produção de IFN- γ e diferenciação de Th1	Alta expressão de miR-29 leva à inibição da diferenciação em Th1	Steiner et al.,2011
miR-146a	CD4 ⁺ T helper	STAT1	Ativação de STAT 1 leva um aumento na expressão de ISG- (<i>Interferon Stimulated Genes</i>)	Deficiência de miR-146a leva a um aumento de STAT1 favorendo uma maior diferenciação do perfil Th1 IFN γ	Lu et al., 2010
miR-155	CD8 ⁺	SOCS-1	SOCS-1 é um supressor da sinalização de citocinas	Deficiência de miR-155 resulta em acúmulo de SOCS-1 causando deficiência na sinalização de citocinas de células TCD8 ⁺	Dudda et al., 2013
miR-10a	Treg CD4 ⁺ V β ⁺ Foxp3 ⁺ PD-1 ⁻ CXCR5 ⁻	Bcl6	Bcl-6 é um fator de transcrição e um regulador de Tfh	Alta expressão de miR-10a inibe a capacidade das células Treg de se diferenciar em células Tfh por diminuir a expressão de Bcl-6	Takahashi et al.,2012

1.5 microRNAs no contexto REGULA e INFLAMA

O sistema imune é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, e tem papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo, combatendo as agressões, em geral, e reparando danos teciduais. Diante dos desafios patogênicos, o sistema imune lança mão de diversas estratégias que ora atuam no estabelecimento de uma resposta predominantemente inflamatória (Inflama), ora desenvolve respostas anti-inflamatórias, que atuam no estabelecimento da homeostase (Regula). Essas respostas Regula/Inflama fazem parte do cenário imunológico de qualquer tecido ou órgão, e são essenciais na manutenção da homeostase do organismo. Como um único miRNA pode ter diversos alvos e, com isso, estar envolvido em diferentes contextos de imunorregulação e indução de inflamação, podemos dizer que os miRNAs, assim como outras moléculas da resposta imune, têm uma dupla função Regula e Inflama.

No contexto imunológico, alguns dos miRNAs mais estudados incluem, o miR-155, o miR-146a e o miR-10a (Tabela 1), muitos dos quais regulam vias de sinalização importantes relacionadas à resposta imune. Dentre os poucos trabalhos que investigam o papel dos microRNAs circulantes, foi visto que o miR-155 e o miR-146a podem ser liberados e capturados entre as células dendríticas adjacentes, via exossomos e, após a captação, os microRNAs exógenos medeiam a repressão de genes que podem reprogramar a resposta celular a endotoxinas (Alexander et al., 2015). O miR-146, administrado pelo exossoma, reduz a expressão de genes pró-inflamatórios como o TRAF6, IRAK1, IL-6 e TNF-alfa (Efeito Regula), enquanto que, indiretamente, o miR-155 pode levar ao aumento da expressão de outros genes também envolvidos com a resposta inflamatória, como o BACH1 and SHIP1, bem como os genes das citocinas pró-inflamatórias (Efeito Inflama) (Alexander et al., 2015). Não há dados na literatura explorando, no contexto do transplante, a capacidade de células dendríticas, do doador ou do receptor, de liberar microRNAs, e qual seria o impacto funcional na tolerância do enxerto. De qualquer forma, esses achados mostram que microRNAs

endógenos podem, por meio de uma transferência funcional entre APCs, regular respostas imunológicas.

O miR-146a e o miR-155 foram estudados em outros contextos imunológicos e os resultados dos trabalhos apoiam a ideia de que, eles promovem efeitos Regula e Inflama, respectivamente. O miR-155 promove efeitos, predominantemente Inflama, pois favorece a diferenciação de células T em Th17 em modelos experimentais (Yao et al., 2012), e o miR-146a, pode promover efeitos predominantemente Regula, uma vez que atua em um *feedback* negativo da própria via inflamatória que induziu a sua expressão, via regulação de transdutores de sinalização, tais como TRAF6 e IRAK1 (Yans et al., 2012). Ainda tratando do efeito Regula, o microRNA let-7c desempenha um papel importante na regulação da polarização dos macrófagos, favorecendo um perfil mais tolerogênico, por regular negativamente o fator de transcrição C/EBP- δ (Banerjee et al., 2013). O C/EBP- δ é importante na regulação de genes envolvidos em respostas imunes inflamatórias associados com a ativação e/ou diferenciação de macrófagos (Banerjee et al., 2013).

Tratando de células B, já foi estudado que o miR-148a atua como um regulador da autoimunidade patológica. A expressão elevada de miR-148a torna as células B imaturas resistentes à apoptose, e os principais alvos descritos nesse processo são Gadd45a, PTEN e a proteína pro-apoptótica Bim (Gonzales-Martins et al., 2016). Esses genes têm sido descritos como envolvidos na regulação da tolerância central das células B na medula óssea (Gonzales-Martins et al., 2016). Como consequência da regulação negativa desses genes pelo miR-148a, ou seja, menor expressão desses genes envolvidos com a apoptose, células B fortemente autorreativas migram para a periferia aumentando o risco para doenças autoimunes (Efeito Inflama) (Gonzales-Martins et al., 2016).

Outro estudo, também envolvendo células B, mostrou que a ausência de *Dicer* (Enzima envolvida na maquinaria de geração dos microRNAs), prejudica a geração de células

B foliculares nos compartimentos de células B da zona marginal (Belver et al., 2010). As células B deficientes de *Dicer* têm um repertório de BCR defeituoso, favorecendo a autoreatividade patológica, devido a altos títulos de autoanticorpos séricos, em camundongos (Belver et al., 2010) (Efeito Inflama). Juntos, esses trabalhos mostram um papel crucial dos microRNAs na diferenciação de células B e no estabelecimento do estado tolerância ao próprio, pelo controle da produção de autoanticorpos com ação patogênica. No entanto, é necessário ponderar, que autorreatividade não é um sinônimo de condição patológica, uma vez que a autorreatividade faz parte do próprio funcionamento e desenvolvimento de linfócitos B e T no contexto fisiológico (Cohen 2000). Uma das teorias que discute esse fenômeno é o da rede idiotípica, na qual anticorpos podem reconhecer a porção variável de outro anticorpo, no contexto fisiológico (Jerne 1974; Civello, 2013).

Outra questão relevante a ser discutida é sobre fatores que regulam a expressão dos microRNAs. Em um microambiente com excessiva resposta inflamatória ou imunorreguladora, não faltam estímulos que favorecem a expressão dos miRNAs em diversos loci gênicos. Foi visto que o TGF-beta pode aumentar a expressão do miR-27a, por meio do fator de transcrição SP1 (Min et al., 2012). Neste trabalho, como consequência, o miR-27a altamente expresso por células dendríticas, impediu a diferenciação de células Th1 e Th17, *in vitro* e *in vivo*, ao mesmo tempo em que promoveu o acúmulo de células Tr1 (CD4⁺ IL-10⁺) e Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), no microambiente tumoral (Efeito Regula). Ademais, também foi observado que a infusão repetida de células dendríticas reguladas por miR-27a, em tecidos tumorais, acelera o crescimento tumoral, indicando o miR-27a como um potencial alvo para imunoterapia tumoral. Ainda não foi explorada a ação do miR-27a no contexto do transplante, mas é interessante pensar que se um microRNA pode atuar na promoção de um microambiente mais tolerogênico no sítio tumoral, via modificação da função de células dendríticas, a pesquisa no transplante pode ser beneficiada com esses miRNAs cujas características funcionais são mais tolerogênicas.

Devido à sua importância biológica, tem sido explorada a possibilidade do uso terapêutico de microRNAs. O mais bem sucedido dos ensaios clínicos, agora em fase 2, envolve o miR-122 no tratamento da hepatite C (Janssen et al., 2013). A aplicação por injeção intravenosa ou subcutânea do “miravirsen”, assim chamado o bloqueador do miR-122, chega ao fígado e se liga, por complementaridade, ao seu respectivo microRNA. O vírus da hepatite C utiliza o miR-122 para se multiplicar, mas não pode usá-lo, se este estiver vinculado ao miravirsen. A utilização de miravirsen em indivíduos com infecção crônica por HCV genótipo 1 apresenta reduções dose-dependentes nos níveis de RNA do HCV (www.clinicalTrials.gov, NCT01200420). Esta capacidade de controlar diversos mecanismos moleculares e celulares bem como efeitos Regula/Inflama, torna os microRNAs potentes ferramentas terapêuticas a serem utilizadas no controle de diversos contextos patológicos e/ou manutenção do estado fisiológico.

1.6 microRNAs na tolerância

microRNAs já foram estudados em diferentes formas de tolerância imunológica. Já foi visto que a menor expressão do miR-181a, em linfócitos T imaturos, reduz a intensidade de reatividade aos peptídeos próprios, pois o miR-181a aumenta a força de transdução de sinais intracelulares do TCR, por reprimir reguladores negativos da via de sinalização, como PTPN22, DUP5, DUSP6 e SHP-2 (Li et al., 2007). Esses dados mostram que a reatividade do TCR e a cascata de sinalização ativada nos mecanismos de tolerância central, ao próprio, podem ser reguladas por microRNAs, repercutindo em desfechos biológicos importantes, como na seleção positiva e negativa, no timo.

Além da tolerância ao próprio, também tem sido investigado o papel dos microRNAs na interação com o sistema imune e a microbiota intestinal (Runtsch et al., 2014), ou seja, o papel do microRNA na tolerância ao não próprio. Foi visto que camundongos *knockout* para miR-29 apresentam alta expressão de IL-23 e Th17 na mucosa intestinal. O miR-29 regula,

negativamente, IL-12p40 e IL12p19, em células dendríticas, e essa ação tem efeito na proteção contra colites, e pode ser importante em outros contextos inflamatórios (Brain *et al*, 2013).

Dentre os diversos componentes envolvidos no fenômeno fisiológico de regulação da resposta imune a aloantígenos, os miRNAs que são sintetizados e expressos na placenta, principalmente em trofoblastos, podem ter mecanismos envolvidos na tolerância materno-fetal (Ng *et al.*, 2013). Os miRNAs mais abundantes nos exossomos placentários são miR-17, miR-106a e miR-200c. Por análise de bioinformática, foi possível identificar que esses compartilham alvos associados aos mecanismos de implantação do embrião no útero (Ng *et al.*, 2013). No entanto, há poucos estudos que exploram as implicações funcionais da regulação do transcriptoma uterino, principalmente na interface com o sistema imunológico, que tem um papel crítico no estabelecimento da tolerância materno-fetal.

Na TO do transplante hepático, já foi observada uma maior expressão de miR-95, miR-24, miR-31, miR-146a e miR-155 em células Tregs de indivíduos tolerantes, quando comparada àquela de indivíduos com RC (Revilla- Nuin *et al.*, 2016). O grupo sugere que Tregs quando ativadas, podem desempenhar um papel de regulação da tolerância ao transplante hepático, com potencial participação do seu perfil diferencial de microRNAs (Revilla- Nuin *et al.*, 2016).

Na TO renal, há dados na literatura de uma análise comparativa da expressão de miRNAs dos TO com indivíduos EST e SAU em PBMC. Foram encontrados oito miRNAs diferencialmente expressos na TO, sendo eles: miR-450b-5p, miR-142-3p, miR-876-3p, miR-106b, miR508-3p, miR-148b, miR-324-5p e miR-98 (Danger *et al*, 2012). Os autores ainda descrevem o miR-142-3p em maior quantidade em células B purificadas de pacientes TO. A partir do uso da bioinformática, os autores observaram que este microRNA pode modular quase 1.000 genes, muitos dos quais estão relacionados com a resposta imune, como a

ativação de células B e comunicação celular (Danger et al, 2012). Em um experimento subsequente, a transfecção de miR-142-3p em células B raji levou a uma maior expressão de moléculas já descritas na TO, como MS4A1 (CD20), CD38 e BANK1 e, em contraste, a expressão de TGFBR1 estava diminuída. O interessante é que a estimulação de células B com TGF- β levou ao aumento na expressão de miR-142-3p. Entretanto, uma vez aumentado, o miR-142-3p induz a diminuição da expressão de TGFBR1. Para saber se esse *feedback* negativo entre miR-142-3p e TGF- β pode ter alguma contribuição na manutenção da tolerância, novas investigações devem ser realizadas (Danger et al, 2012).

Nessa pesquisa, a ausência de comparação com a RC, desfecho clínico oposto à TO, impossibilitou os autores de levantar hipóteses sobre potenciais mecanismos de ação envolvidos na TO, uma vez que, as alterações na expressão desses microRNAs podem envolver mecanismos críticos nos processos de tolerância ao enxerto. Além disso, o pequeno número de microRNAs investigados nesse trabalho, provavelmente em virtude das limitações técnicas da época, nos motivou a explorar quais outros microRNAs e como os seus potenciais alvos podem contribuir nos mecanismos da TO. Como os microRNAs circulantes são importantes parâmetros periféricos de homeostase, levantamos a hipótese de que a tolerância operacional apresenta um perfil sistêmico diferencial de miRNAs que, associados a outros mecanismos biológicos podem contribuir com o estado de homeostase imunológica no transplante humano.

2.OBJETIVO GERAL

Determinar se há um perfil diferencial de microRNAs no estado de tolerância operacional no transplante renal humano, indicando sua potencial participação nos mecanismos de tolerância operacional.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar potenciais alvos dos microRNAs, diferencialmente detectados na tolerância operacional, e levantar hipóteses de como a regulação desses alvos pode estar envolvida com o estado de tolerância operacional.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Figura 2: Desenho experimental. Legenda: TO= Tolerância Operacional; RC= Rejeição crônica; EST= Estáveis; SAU= Saudáveis.

3.2 Sujeitos de pesquisa

Este projeto faz parte do Estudo Multicêntrico Brasileiro em Tolerância Operacional: *“Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica”*, coordenado por Verônica Coelho. O Estudo Multicêntrico está vinculado ao Instituto de Investigação Imunológica (iii) – Instituto Nacional de ciência e tecnologia-INCT, CNPq (465434/2014/2) coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Kalil. Neste estudo, os sujeitos de pesquisa são provenientes dos seguintes centros brasileiros: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e do Hospital Beneficência Portuguesa (SP). O estudo do presente projeto é um estudo transversal que usa um ponto basal do estudo longitudinal. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAPPesq no 0476/08) e, para realização do projeto atual, uma nova solicitação foi enviada ao comitê de ética sendo este incluído e aprovado como subprojeto (CAPPesq no 1097/05) (Anexo 2). O Estudo Multicêntrico está em andamento desde 2005, e o material biológico coletado de todos os grupos ocorreu após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 3). As informações clínicas dos pacientes transplantados renais foram obtidas no prontuário eletrônico do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP e no serviço de transplante renal do Hospital São Lucas da PUC-RS (Apêndice A) , com auxílio dos colaboradores clínicos do projeto. Os indivíduos saudáveis são doadores de pacientes transplantados renais no HCFMUSP.

Foram analisados quatro grupos de sujeitos de pesquisa:

- (i) **Grupo Tolerante Operacional (TO)** – Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos 1 ano (n=8);
- (ii) **Grupo Rejeição Crônica (RC)** – Indivíduos com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com rejeição crônica (diagnóstico por biópsia utilizando-se os critérios histopatológicos de classificação do rim transplantado – Banff) (n=12)
- (iii) **Grupo Estável (EST)** – Indivíduos com função renal estável com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com doses habituais de imunossupressores (n=12);
- (iv) **Grupo Saudável (SAU)** – Indivíduos saudáveis doadores de transplante renal (n=12).

Foram realizadas coletas de sangue dos sujeitos de pesquisa para obtenção do soro, sendo congelado e mantido à temperatura de -20 °C. Para a realização dos experimentos do estudo multicêntrico, foram coletados cerca de 55ml de sangue, sendo 10ml em tubo seco para separação de soro.

3.3 Extração e determinação da concentração de RNA total

Como critério de qualidade do soro, foi avaliado o grau de hemólise das amostras por nanodrop 2000 (nanoDrop. Technologies, Delaware, EUA). Os níveis de hemoglobina livre na amostra de soro foram avaliados e os picos de absorbância em 414 nm foram considerados como indicativos de hemoglobina livre (Wong et al., 2006). Como os soros com hemólise interferem na detecção de microRNAs, amostras com indicativo de hemoglobina livre precisaram ser substituídas (Apêndice C).

Após retiradas do freezer -70°C, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e submetidas à extração de RNA, por meio do kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 1ml da solução QIAzol foi adicionado a 200µl de soro, sendo em seguida, homogeneizados vigorosamente em vortex por 15 segundos, e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para promover a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após a incubação, 3µl do miRNA-39 sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39; Qiagen, Alemanha) foram adicionados como controle “*spike-in*”, para normalização dos dados. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio (Merk, Alemanha), e a amostra homogeneizada, vigorosamente, por 30 segundos, seguidos por 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram, então, submetidas à centrifugação sob força de 14.000g a 4°C, por 20 minutos, para a separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi, então, transferida para outro microtubo de 1,5ml onde foram adicionados 1,5 volumes de etanol 100% (Merk, Alemanha) para a precipitação do RNA total. A purificação do RNA total extraído foi realizada por meio das colunas miRNeasy (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA final foi eluído das colunas em 14µl de água RNase-free (Qiagen, Alemanha).

Usualmente, a determinação da concentração e qualidade do RNA de uma amostra é mensurada por meio de espectrofotometria ultravioleta (UV). Para a realização do *screening* em busca do perfil diferencial de microRNAs, nós fizemos, inicialmente, a quantificação de RNA por espectrometria (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Delaware, EUA), com base na relação da absorbância A260nm:A280nm e da leitura a A320nm. As razões de absorbância A260/280 foram utilizadas como critério da qualidade e da pureza das extrações. A razão 260/280 indica, principalmente, a possível contaminação por material protéico, fenol ou outro contaminante, e também informa a boa qualidade da amostra, quando possui resultado em torno de 2,0

(Thermo Scientific – Technical Bulletin). Apesar da boa pureza em nossas amostras (Apêndice C), este tipo de método não é adequado para estudos de detecção de miRNAs em biofluidos, por uma série de fatores. Entre eles, está o baixo conteúdo de RNA (e alta concentração de proteínas) no soro e o baixo volume de amostra utilizado para a extração. Somados, estes fatores tornam a quantificação de RNA por espectrofotometria UV extremamente difícil. Nestes casos, é amplamente recomendado o uso de um volume de RNA fixo para todas as amostras ao invés de uma quantidade (ng) como molde para a reação de transcrição reversa. Desta forma, um método alternativo para monitoração das amostras deve ser empregado. Tratando-se de soro ou plasma, o uso de miRNAs sintéticos (*spike-in*) é um dos métodos mais aceitos para monitorar a eficiência da extração de RNA, síntese de cDNA (pela técnica de transcrição reversa) e amplificação por PCR (Kroh et al., 2010). Assim, foi empregado, neste estudo, o uso de uma quantidade conhecida do miRNA sintético Cel-miR-39 (Qiagen), tanto na primeira fase do projeto (perfil de microRNAs), como na validação individual da quantificação do miR-885-5p.

3.4 Reação de transcrição reversa e pré-amplificação

Perfil de microRNAs

Para a realização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é necessário que os RNAs extraídos das amostras sejam convertidos em DNA complementar (cDNA), por meio da reação de transcrição reversa. Os primers Megaplex™ RT foram utilizados para a síntese de cDNA. Os primers Megaplex™ RT contam com dois *pools* de primers para microRNAs humanos, o *pool A* e o *pool B*, cada um destinado para a transcrição reversa dos microRNAs contidos nas placas de PCR array TaqMan® *low-density array* (TLDA) A e B. A reação foi montada de acordo com a recomendação do fabricante: 0,8 µl de Megaplex™ RT Primers (10x), 0,2 dNTPs com dTTP (100mM), 1,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µl), 0,8 µl 10x RT Buffer, 0,9 µl MgCl₂ (25 mM), 0,1 µl RNase Inhibitor (20U/µl), 0,2

μl água livre de Nuclease. Ao material da reação com de 4,5 μl, foram acrescentados 3 μl de RNA total, totalizando o volume de 7,5 μl de reação. Os tubos foram colocados no termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com velocidade máxima de rampa, e com o seguinte protocolo de ciclos: 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 1 minuto a 42°C, 1 segundo a 50°C e 1 ciclo de 85°C por 5 minutos, essas diferentes temperaturas são importantes nos processos de anelamento, extensão e polimerização. As amostras ficaram a 4°C até serem retiradas do equipamento e armazenadas a -80°C. Como trabalhamos com soro, foi necessário realizar a técnica de pré-amplificação, para aumentar a quantidade de cDNA e para melhorar a sensibilidade da reação TaqMan® qPCR. Usamos um Kit contendo, *TaqMan PreAmp Master Mix* (2x); *Megaplex PreAmp Primers* (10x) e água livre de nucleases. Nós utilizamos 22,5μl da reação de *PreAmp* nos tubos contendo o produto de RT (2,5μl). A pré-amplificação seguiu como seguinte protocolo de ciclos: 10 minutos a 95°C, 2 min a 55 ° C, 2 min a 72 ° C, seguido de 12 ciclos de 15 s a 95 ° C, 10 min a 99,9 ° C e 4 min a 60 ° C.

miR-885-5p (ensaio individual)

Para a montagem das reações de transcrição reversa, foi utilizada meia reação padrão descrita por protocolo. Seguindo as recomendações, cada reação continha: TaqMan Universal Master Mix II no UNG (contendo a enzima AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTPs, tampão de enzima, MgCL₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1μl do primer miR-885-5p (5x), 1,5μl da amostra de cDNA e água livre de nucleases. O termociclador foi programado para a ciclagem padrão do fabricante de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1minuto.

3.5 Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR)

O perfil de detecção de 768 miRNAs foi determinado por PCR em Tempo Real, por meio do sistema de "arranjos (*arrays*) de baixa densidade" que consiste de 2 placas de 384 poços interconectados por canais microfluídicos (*TaqMan® Array human MicroRNA A +B Cards Set v3.0*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Figura 3), contendo os iniciadores (primers) e sondas (probes) imobilizados em cada poço, para cada um dos miRNAs a ser analisado. A relação dos miRNAs imobilizados em cada placa pode ser vista no endereço: http://www6.appliedbiosystems.com/support/cardmap_miRNA_Human_A.html e em Anexo 4.

As reações de qPCR foram montadas utilizando-se o seguinte protocolo: 444 µl de água livre de nucleases, 450µl de TaqMan Universal Master Mix II no UNG (contendo a enzima AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTPs, tampão de enzima, MgCl₂, e a referência passiva de fluorescência ROX®) (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 6 µl do cDNA feito com o pool de primers A ou B. Cada placa TLDA recebeu 100µl desta reação, em cada uma de suas oito canaletas. As placas foram centrifugadas duas vezes a 321xg por 1 minuto, seladas e em seguida as canaletas de aplicação da amostra foram removidas. As placas foram colocadas no (*QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System- Thermo Fisher Scientifics*) obedecendo a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, e 1 minuto a 60°C.

Figura 3: Exemplo do desenho das Placas Tecnologia TaqMan®. Card A. Em cada placa há 384 poços com sondas de microRNAs.

Os dados com as curvas de expressão de cada placa foram extraídos do equipamento QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, EUA) e analisados no programa *Cloud* (Thermo Fisher Scientific) (Applied Biosystems – Life Technologies, EUA) com a seguinte programação: *baseline* automático; o limiar (*threshold*) alinhado, manualmente, quando havia captação de ruídos. Foi utilizada uma normalização global para análise dos microRNAs. No processo de normalização global subtrai-se o valor de CT médio do conjunto de microRNAs da placa pelo valor de CT de cada miRNA da mesma amostra, ou seja, calculam-se fatores de normalização baseados na média dos valores de CT de todos os genes analisados de uma amostra (D'haene et al., 2012; Bockmeyer et al., 2016). Ainda na análise, mesmo avaliando-se os picos de hemoglobina livre para exclusão de amostras com hemólise, nós ainda optamos pela retirada de microRNAs que podem estar em maior quantidade em amostras hemolisadas, segundo dados da literatura. Foram eles: hsa-miR-486-5p; hsa-miR-451a; hsa-miR-324-5p; hsa-miR-25-3p; hsa-miR-215; hsa-miR-20b-5p; hsa-miR-18a-3p; hsa-miR-185-5p; hsa-miR-16-2-3p; hsa-miR-144-5p; hsa-miR-144-3p; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-106b-3p; hsa-let-7b-3p.

Os critérios escolhidos para a validação das reações de PCR em tempo real foram: (i) Curvas de amplificação em fase exponencial e com platô bem determinado; (ii) Amplificação dos microRNAs com até CT de 35; (iii) microRNAs expressos em pelo menos 50% ou mais das amostras (Apêndice B).

miR-885-5p (Ensaio individual)

A quantificação relativa dos níveis de expressão de miR-885-5p e do controle *spike-in* foi mensurada por meio da técnica qPCR, utilizando-se o kit *TaqMan® MicroRNA Assays* (Thermo Fisher Scientific, EUA), com sondas específicas para hsa-miR-885-5p e cel-miR-39. Para maior confiabilidade dos dados, todas as reações foram realizadas em triplicata. Cada reação consistiu de 5µl de TaqMan Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific, EUA),

1,5µl da sonda específica (5x), 2,5µl de amostra de cDNA. As reações foram realizadas em placas de 384 poços (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcodes - Thermo Fisher Scientific, EUA) e quantificadas na plataforma QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, EUA). A qPCR foi conduzida utilizando-se as condições padrões de amplificação, descritas pelo fabricante, consistindo dos seguintes parâmetros: 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s, e 60°C por 1min.

Os dados foram obtidos do software *QuantStudio™ 12K Flex v1.2.2* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e analisados no Excel 2010 (Microsoft, EUA), por meio do cálculo comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Schmittgen et al., 2008). Desta forma, os resultados são expressos em Fold Change (FC), no qual representa quantas vezes um dado miRNA está mais expresso em uma amostra em relação a outra.

$$Fold\ change = 2^{-[(Ct\ miR - \bar{X}\ Ct\ controle)Amostra\ A - (Ct\ miR - \bar{X}\ Ct\ controle)Amostra\ B]}$$

3.6 Estratégia de normalização dos dados do miR-885-5p

O propósito da normalização dos dados é minimizar a variação técnica dos dados que não está relacionada às variações biológicas sob investigação. Diversos genes endógenos são aceitos como referência (*housekeeping genes*) para a normalização dos dados em RNAs celulares. No entanto, até o momento não existem genes de referência bem estabelecidos para a normalização de miRNAs circulantes, tornando, assim, este processo desafiador e controverso. Tipicamente, amostras de fluidos biológicos, como soro e plasma, não possuem muitos tipos de pequenos RNAs (*small RNAs*), como o 5S, U6 e os snoRNAs, os quais são, frequentemente, usados para a normalização dos dados de expressão de miRNAs em outros tipos de amostras. Desta forma, tem sido adotado o uso de miRNAs exógenos sintéticos, como cel-miR-39, cel-miR-54 e cel-miR-238 (pertencentes à espécie *Caenorhabditis elegans*),

os quais não possuem sequência homóloga em humanos (Roberts et al., 2014). Estes miRNAs sintéticos são inseridos na amostra a ser testada, durante a extração de RNA, como já descrito, representando um método chamado *Spike-in* (Kroh et al., 2010). Esse RNA de sequência e quantidade conhecidas é usado para calibrar as medidas. Esse teste de normalização foi utilizado para análise do miR-885-5p do ensaio individual. Para maior confiabilidade dos dados, todas as reações foram realizadas em triplicata, incluindo o controle *spike-in*. Assim, os dados de expressão dos miRNAs foram normalizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Ct normalizado} = \bar{X} \text{ Ct miR} - (\bar{X} \text{ Ct controle} - \bar{X} \text{ Ct controles})$$

3.7 Estratégia para interpretação dos dados

Usamos uma estratégia de análise que nos possibilita fazer interpretações biológicas a partir de diferentes comparações entre TO e os diferentes grupos de estudo. Esta estratégia tem sido usada em nossos trabalhos (Moraes-Vieira et al., 2012; Hernandez et al., 2012). Nós levantamos hipóteses sobre potenciais mecanismos na TO, a partir da comparação com a RC e da detecção de um perfil diferencial. Nossa estratégia de comparação também nos permite identificar se os níveis de microRNAs podem estar aumentados ou diminuídos em relação ao estado fisiológico, comparando os níveis dos microRNAs do perfil diferencial em TO com o grupo de indivíduos saudáveis.

Figura 4: Estratégia de análise utilizada no projeto. TO= Tolerante Operacional. RC= Rejeição Crônica. SAU= Saudável

3.8 Identificação de alvos e vias pelo IPA - *Ingenuity Pathway Analysis*

Para a identificação dos alvos dos microRNAs do perfil diferencial (TO x RC), usamos o *software* IPA (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, EUA) e dividimos nossa estratégia de caracterização dos alvos, em cinco partes (Figura 6).

1. Identificamos os RNAs mensageiros alvo que foram altamente preditos por ferramentas de bioinformática e/ou com base em dados experimentais;
2. Em seguida, utilizamos filtros para identificar quais dos alvos preditos poderiam ter envolvimento com o sistema imune. Identificamos a quais grupos funcionais esses alvos podem pertencer (Figura 5);
3. Considerando apenas os alvos com algum envolvimento com a resposta imune, usamos filtros para os quantificar e qualificar em grupos funcionais (Figura 5);

4. Usando-se filtros, identificamos quais células do sistema imune podem expressar esses potenciais alvos (Figura 5);

IPA

File Edit View Window Help

Genes and Chemicals Diseases and Functions Pathways and Tox Lists

NEW

Enter gene names/symbols/IDs or chemical/drug names here

microRNA Target Filter: microRNAs TO x RC - 2017-03-05 01:14 PM

7 microRNA have targeting information available.
Filtered to 7 microRNAs targeting 91 mRNAs.

ADD/REPLACE MRNA DATASET EXPRESSION PAIRING

Details Summary

ADD TO MY PATHWAY ADD TO MY LIST CREATE DATASET

Use to filter a column. Add data or more columns using 'Add column(s)'.

microRNA dataset: microRNAs TO x RC	Add column(s)	Relationship	Add column(s)	mRNA	
ID C-1	Symbol C-2	Expr Log Ratio C-3	Source C-4	Confidence C-5	Symbol C-6
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	BMF
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	CXCR5
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	DNASE2
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	FAH
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	GPC1
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	HS3ST2
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	PAX8
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	SCNN1A
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	SH2D1A
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	SPG7
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	TRIM32
☐ MIMAT0005588	miR-1233-3p (miRNAs w/sc)	-0,872	TargetScan Human	High (predicted)	XYLT2
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	ACO1
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	ACVR1B
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	BRK1
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	CAP1
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	CD9
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	CST3
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	DAXX
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	DBI
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	DDOST
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	DSTYK
☐ MIMAT0005911	miR-1260a (and other miRNAs)	-0,680	TargetScan Human	High (predicted)	ETS2

Selected/Total rows : 0/94

VIEW FILTER SUMMARY

Figura 5: Exemplo dos filtros utilizados para selecionar alvos específicos. Em cada coluna (C) é dada uma informação. Do lado esquerdo, na primeira coluna (C-1), é dado o tipo de microRNA, seguido do símbolo (C-2), fold (C-3), o database (C-4), a predição (C-5). Da coluna 6 em diante, já é possível identificar os potenciais alvos, sua caracterização funcional e vias moleculares envolvidas.

5. Foram preditas vias de sinalização relacionadas com os potenciais alvos dos microRNAs, diferencialmente, detectados entre TO x RC (Figura 6).

Figura 6: Esquema gráfico da estratégia de análise no IPA- *Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®)*. Esquema utilizada para busca e caracterização de potenciais alvos.

Os alvos dos microRNAs que o programa IPA fornece são derivados de diferentes bancos de dados, como o TarBase (<http://www.mirbase.org>) e TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71/).

Conteúdo do TargetScan: Os alvos são previstos usando-se o algoritmo TargetScan, que procura a presença de sítios conservados de 8mer e 7mer que correspondem à região *seed* de cada microRNA. MicroRNAs interagem com seus alvos, principalmente, por meio da região *seed*, que vai do nt 2 até o 8.

Figura 7: Região *seed*. No pontilhado superior ilustração do RNAm alvo e a cauda PolyA que é uma estrutura localizada na extremidade 3' (Biggar et al., 2015). No pontilhado inferior, ilustração do microRNA se ligando por complementaridade ao seu alvo. O sufixo “mer” refere-se ao número específico de bases moleculares. Legenda: N = nucleotídeo.

Conteúdo TarBase: identifica microRNAs/mRNAs, experimentalmente, validados usando-se o conteúdo do banco de dados TarBase e miRBase (<http://www.mirbase.org>).

Com esses dados, nós levantamos hipóteses sobre possíveis interações moleculares entre o miRNA e seu potencial RNAm alvo, potenciais mecanismos de ação, bem como a possibilidade de efeitos biológicos dessa regulação, nos contextos estudados TO e RC, considerando também o que pode ocorrer no estado fisiológico.

3.9 Análise da frequência dos efeitos de Vida/Morte

Para identificar, de maneira global, as diferenças entre os efeitos que favorecem a vida ou morte nos grupos TO x RC, nós criamos um escala de pontuação (Tabela 2). Cada efeito que favorece VIDA ou MORTE recebeu diferentes pontuações, considerando os **níveis dos microRNAs** detectados a **função do alvo**.

Favorece Vida

Na comparação *TO x RC*, **consideramos efeito que favorece vida** com pontuação =2: Níveis menores (<) de microRNAs que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem vida. Na comparação com o *estado fisiológico*, **consideramos efeito que favorece vida** com pontuação =1: Níveis de microRNAs preservados (P) que têm o potencial de regular

negativamente genes que favorecem vida. **Consideramos os efeitos que favorece vida** com pontuação=2: níveis diminuídos ($\downarrow$) de microRNAs que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem vida. **Consideramos os efeitos que favorece vida** com pontuação=3: níveis mais diminuídos ($\downarrow\downarrow$) de microRNAs que têm o potencial de regular negativamente genes que favorecem vida. Na comparação *TO x RC*, **consideramos efeito que favorece vida** com pontuação=2: níveis de microRNAs maiores ($>$) que regulam, negativamente, alvos que favorecem a morte. Na comparação com o *estado fisiológico*, **consideramos efeito que favorece vida** com pontuação=2: níveis de microRNAs aumentados ($\uparrow$) que regulam, negativamente, alvos que favorecem a morte. **Consideramos efeito que favorece vida** com pontuação =3: níveis de microRNAs mais aumentados ($\uparrow\uparrow$) que regulam negativamente alvos que favorecem a morte.

Favorece Morte

Na comparação *TO x RC*, **consideramos efeito que favorece morte** com pontuação=2: Menores níveis ($<$) de microRNAs que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem a morte. Na comparação com o *estado fisiológico*, **consideramos efeito que favorece morte** com pontuação=1: Níveis de microRNAs preservados (P) que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem morte. **Consideramos efeito que favorece morte** com pontuação=2: níveis diminuídos ($\downarrow$) de microRNAs que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem morte. **Consideramos efeito que favorece morte** com pontuação =3: níveis mais diminuídos ($\downarrow\downarrow$) de microRNAs que têm o potencial de regular, negativamente, genes que favorecem morte. Na comparação *TO x RC*, **consideramos efeito que favorece morte** com pontuação =2: maiores níveis ($>$) de microRNAs que regulam alvos que favorecem a vida. Na comparação com o *estado fisiológico*, **consideramos efeito que favorece morte** com pontuação=2: níveis de

microRNAs aumentados (↑) que regulam, negativamente, alvos que favorecem a vida.

Consideramos efeito que favorece morte com pontuação =3: níveis de microRNAs mais aumentados (↑↑) que regulam, negativamente, alvos que favorecem a vida.

A pontuação é cumulativa, se o microRNA na comparação TO x RC apresenta menores níveis ele pontua 2, entretanto, se na comparação com o estado fisiológico ele tiver níveis preservados, ele pontua mais 1 (total 3). Por outro lado, se o microRNA na comparação TO x RC estiver com níveis menores, ele pontua 2, mas, se na comparação com o estado fisiológico, ele apresentar níveis diminuídos, ele pontua mais 3 (total 5).

Tabela 2. Critérios de Pontuação dos Efeitos dos microRNAs sobre potenciais alvos

Critérios de Pontuação	Pontuação
Efeitos que favorecem Vida	
microRNAs (<) →Cujos alvos são genes que favorecem vida (TO x RC)	2
microRNAs (P) →Cujos alvos são genes que favorecem a vida (Fisiológico)	1
microRNAs (↓) →Cujos alvos são genes que favorecem vida (Fisiológico)	2
microRNAs (↓↓) →Cujos alvos são genes que favorecem vida (Fisiológico)	3
microRNAs (>) →Cujos alvos genes que favorecem a morte (TO x RC)	2
microRNAs (↑) →Cujos alvos genes que favorecem a morte (Fisiológico)	2
microRNAs (↑↑) →Cujos alvos genes que favorecem a morte (Fisiológico)	3
Efeitos que favorecem Morte	
microRNAs (<) →Cujos alvos são genes que favorecem a morte(TO x RC)	2
microRNAs (P) →Cujos alvos são genes que favorecem a morte (Fisiológico)	1
microRNAs (↓) →Cujos alvos são genes que favorecem a morte (Fisiológico)	2
microRNAs (↓↓) →Cujos alvos são genes que favorecem a morte (Fisiológico)	3
microRNAs (>) →Cujos alvos são genes que favorecem a vida (TO x RC)	2
microRNAs (↑) →Cujos alvos são genes que favorecem a vida (Fisiológico)	2
microRNAs (↑↑) →Cujos alvos são genes que favorecem a vida (Fisiológico)	3

Legenda: (>) Maior ou (<) menor, na comparação TO x RC; (↓) Diminuídos; (↓↓) Mais Diminuídos; (↑) Aumentado; (↑↑) mais aumentado; (P) preservados, na comparação com o estado fisiológico. (→) alvos. TO x RC = comparação com tolerância operacional e rejeição crônica.

3.10 Análise estatística

Para a análise dos níveis de microRNAs, na primeira etapa do projeto (perfil de microRNAs), nós utilizamos o *software cloud* da *Thermo Fisher Scientific®* (<https://www.thermofisher.com/br/pt/home/cloud.html>) e as diferenças entre os grupos foram apresentadas por volcano plot, utilizando-se o teste t. O volcano plot organiza os genes ao longo de dimensões de significância biológica e estatística. No primeiro eixo horizontal é o fold change entre os dois grupos (em uma escala de log), ou seja, é uma medida que descreve o quanto uma quantidade muda de uma amostra para outra. O segundo eixo (vertical) representa o valor de p, utilizando o teste t para verificar se há diferenças entre as amostras. Para essas amostras não foi utilizado o teste FDR (*False discovery rate*) devido o número de amostras. Para o agrupamento hierárquico do heatmap foi realizado o teste de correlação de Pearson também pelo *Software cloud* da *Thermo FisherScientific®*.

Na análise individual dos níveis de miR-885-5p, os resultados foram exibidos em gráficos utilizando-se o *software GraphPad Prism* e a análise estatística foi realizada pelo método de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para comparação intergrupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

As diferenças de frequências de ocorrência dos efeitos VIDA, MORTE entre os grupos TO e RC foram calculadas pelo teste de qui-quadrado. Foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Nos dados clínicos, as variáveis contínuas foram analisadas, inicialmente, pelo teste *Shapiro-Wilk* para a verificação da normalidade. O teste T foi usado para os dados paramétricos e *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos na comparação TO x RC. Utilizamos teste qui-quadrado para variáveis não contínuas. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.RESULTADOS

4.1 Análise dos níveis séricos de microRNAs, nos diferentes grupos clínicos e indivíduos saudáveis - Agrupamento hierárquico

Analizamos os níveis diferenciais de um conjunto de microRNAs no soro dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos e saudáveis, pelo programa *Cloud* (Thermo Fisher Scientific). Foi avaliado o perfil de 768 microRNAs, dos quais 47% destes foram amplificados nas placas (Apêndice D). Realizamos esta técnica de detecção mais abrangente, para ampliar a chance de identificar microRNAs com potencial envolvimento na TO, além dos já descritos na literatura como os envolvidos na resposta imune.

Com o objetivo de determinar se os níveis desses miRNAs analisados, no soro, eram capazes de discriminar o grupo TO dos grupos de RC, SAU e EST, submetemos, inicialmente, os dados a um teste de agrupamento hierárquico. Na análise de agrupamento hierárquico não encontramos um padrão nos níveis de detecção dos microRNAs capaz de diferenciar os grupos (Figura 8).

Figura 8: Agrupamento hierárquico baseado na correlação de Pearson. Grupos: Tolerância Operacional- TO (n=8); Rejeição Crônica- RC (n=5); Estável – EST (n=5); Saudável – SAU (n=5). Cada linha representa um microRNA e cada coluna uma amostra. A escala de cor ilustra o nível de expressão relativa de (ΔCt) dos microRNAs em todas as amostras, onde vermelho e verde representam expressão acima ou abaixo da média de normalização global, respectivamente.

4.2 Análise dos níveis séricos de microRNAs, na tolerância operacional comparativamente ao grupo em rejeição crônica (TO x RC)

Visando determinar o perfil diferencial entre os grupos com desfechos clínicos opostos, primeiramente, comparamos os grupos TO x RC, e determinamos os valores de *fold* e de *p*, expressos na análise por *volcano plot*. Nesta comparação, identificamos 7 microRNAs do painel completo, com detecção diferencial entre TO x RC (Figura 9), sendo 3 desses em maior quantidade na TO (em vermelho): miR-885-5p (*p*=0,031), miR-331 (*p*=0,009), miR-27a-5p, (*p*=0,033) e 4 com menores níveis na TO (em verde): miR-1233-3p (*p*=0,029), miR-572 (*p*=0,028), miR-1260a (*p*=0,017), miR-638 (*p*=0,047).

Down-regulated				Up-regulated				Insignificant				Flat			
miRNA	Fold Change	< / >	p Value	miRNA	Fold Change	< / >	p Value								
miR-1233-3p	0.128	<	0.029	miR-885-5p	3.655	>	0.031								
miR-572	0.198	<	0.028	miR-27a-5p	2.446	>	0.033								
miR-1260a	0.320	<	0.017	miR-331	3.685	>	0.009								
miR-638	0.363	<	0.047												

Figura 9: microRNAs diferencialmente detectados entre TO x RC. Tolerante Operacional (TO) n=8; Rejeição Crônica (RC) n= 5. No *Volcano plot* os pontos em vermelho indicam microRNAs com maior detecção e os pontos em verde indicam menor detecção entre TO x RC. Os dados são mostrados em *fold change* (eixo x) e significância estatística (-log10, valor de *p*, eixo y). A linha cinza tracejada indica que os pontos acima têm valores de *p* <0,05. O cálculo estatístico utilizado pelo programa *Cloud* foi o *t* de *student*.

Esse conjunto de microRNAs detectados na comparação TO x RC, que nomeamos de **“microRNAs do perfil diferencial”** (TO x RC), será importante na elaboração de hipóteses sobre os potenciais mecanismos envolvidos na tolerância operacional, com potencial ação de microRNAs. Dentro dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC, dois deles também foram, diferencialmente, detectados em relação à condição fisiológica, como veremos mais adiante. Os demais provavelmente têm seus níveis preservados na TO, uma vez que não apresentaram diferenças em relação aos indivíduos saudáveis.

4.3 Análise dos níveis séricos de microRNAs na tolerância operacional, comparativamente ao grupo saudável

Comparamos os grupos TO e SAU, com o objetivo de identificar quais dos miRNAs cuja detecção foi diferencial em relação ao grupo RC, estavam com os níveis aumentados, diminuídos ou mantidos, em relação ao estado fisiológico. Do painel completo, 8 microRNAs presentes nessa comparação apresentavam níveis significativamente diferentes (Figura 10), dos quais, dois já haviam sido diferenciais na comparação com indivíduos em RC. O miR-27a-5p, que foi detectado em maior quantidade na comparação TO com RC, na comparação TO x SAU, mostrou níveis diminuídos na TO ($p=0,048$). Ou seja, os indivíduos de ambos os grupos TO e RC possuem níveis mais baixos do miR-27a-5p no soro em relação ao estado fisiológico, entretanto, os indivíduos em RC têm níveis ainda mais baixos do que na TO. Por outro lado, o miR-1260a, que já estava em menor quantidade na TO, em relação à RC, mostrou níveis diminuídos quando comparamos com indivíduos SAU ($p=0,039$). Ou seja, os níveis de miR-1260a diminuíram na TO em relação ao estado fisiológico.

Os demais microRNAs, diferencialmente detectados entre TO x RC, não tiveram seus níveis estatisticamente diferentes na comparação TO x Saudáveis. Diante disso, interpretamos que, uma vez que eles não apresentaram aumento, nem diminuição em relação ao estado

fisiológico, é possível que estejam com níveis preservados na TO. Sendo assim, os níveis do miR-885-5p, miR-331, miR-1233-3p, miR-572, miR-638 não apresentam diferenças nos seus níveis entre TO e indivíduos saudáveis estando, possivelmente, com níveis preservados em relação ao estado fisiológico. Diante disso, podemos dizer que na TO encontramos um conjunto de microRNAs do perfil diferencial TO x RC que podem estar com níveis preservados, e dois microRNAs que estão diminuídos, pois estão com níveis diferentes da condição fisiológica (miR-27a-5p e miR-1260a). Por outro lado, na RC há um grupo de microRNAs que estão em maiores quantidades (miR-1233-3p; miR-572; miR-638), outros em menores quantidades (miR-885-5p; miR-27a-5p; miR-331) e um microRNA com níveis preservados (miR-1260a), em relação ao estado fisiológico.

Na comparação com indivíduos saudáveis, ainda podemos destacar os níveis diferenciais dos miR-28, miR-1290, miR-770-5p, que estão diminuídos na TO. O miR-33a foi o único microRNA com níveis aumentados nos indivíduos Tolerantes em relação ao estado fisiológico.

Na análise global, podemos dizer que dentro do perfil diferencial TO x RC, há na TO um predomínio de manutenção de níveis de microRNAs no soro, sem diferença significativa em relação aos indivíduos saudáveis (miR-885-5p, miR-331, miR-1233-3p, miR-572, miR-638). No entanto, detectamos diminuição dos níveis de microRNAs miR-1260a e miR-27a-5p na TO, na comparação com o grupo SAU. Assim, os indivíduos com RC apresentam mais diferenças em relação aos níveis de microRNAs integrantes do “perfil diferencial TO x RC” quando comparado ao estado fisiológico (Tabela 10).

miRNA	Fold Change	< / >	p Value	miRNA	Fold Change	< / >	p Value
miR-28	0.276	<	0.011	miR-27a-5p	0.363	<	0.048
miR-770-5p	0.239	<	0.017	miR-33 ^a	4.668	>	0.037
miR-1290	0.101	<	0.033				
miR-1260a	0.351	<	0.039				

Figura 10: microRNAs diferencialmente detectados entre TO x SAU. Tolerância Operacional (TO) n=8; Saudáveis (SAU) n= 5. No *Volcano plot* os pontos em vermelho indicam microRNAs com maior detecção e os pontos em verde indicam menor detecção entre TO x RC. Os dados são mostrados em *fold change* (eixo x) e significância estatística ($-\log_{10}$, valor de p, eixo y). A linha cinza tracejada indica que os pontos acima têm valores de $p < 0,05$. O cálculo estatístico utilizado pelo programa *Cloud* foi o t de *student*.

Tabela 3: microRNAs com detecção diferencial de níveis entre TO x RC comparados com o estado fisiológico

miRNA	TO x RC *	TO x SAU	RC x SAU
miR-885-5p	>	Preservado	Diminuído
miR-27a	>	Diminuído*	Mais diminuído *
miR-331	>	Preservado	Diminuído
miR-1233-3p	<	Preservado	Aumentado
miR-572	<	Preservado	Aumentado
miR-1260a	<	Diminuído*	Preservado
miR-638	<	Preservado	Aumentado

Legenda: O * indica valor de $p < 0,05$. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição Crônica. SAU= Saudável.

4.3 Análise dos níveis séricos de microRNAs na tolerância operacional, comparativamente ao grupo de estáveis em uso de imunossupressores

Na comparação com o grupo estável (EST), os indivíduos em TO apresentaram 9 microRNAs diferencialmente detectados (Figura 11). Detectamos 4 microRNAs em maiores quantidades nos indivíduos TO: miR-30d ($p=0,008$), miR-425-3p ($p=0,005$), miR-19a ($p=0,008$), miR-30a-5p ($p=0,030$) e 5 microRNAs em menores quantidades, miR-454 ($p=0,000$), miR-140 ($p=0,004$), miR-34b ($p=0,024$), miR-193b ($p=0,023$), miR-301($p=0,038$) comparativamente com estáveis. Não foram detectados níveis significativamente diferentes entre TO e EST para aqueles microRNAs do perfil diferencial TO e RC.

Figura 11: microRNAs diferencialmente detectados entre TO x EST. Tolerância Operacional (TO) n=8; Estáveis (EST) n= 4. No *Volcano plot* os pontos em vermelho indicam microRNAs com maior detecção e os pontos em verde indicam menor detecção entre TO x RC. Os dados são mostrados em *fold change* (eixo x) e significância estatística ($-\log_{10}$, valor de p, eixo y). A linha cinza tracejada indica que os pontos acima têm valores de $p < 0,05$. O cálculo estatístico utilizado pelo programa *Cloud* foi o t de *student*.

4.4 Identificação, *in silico*, de potenciais alvos dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC, e agrupamento funcional dos potenciais alvos

Depois de identificar os microRNAs com níveis de diferenciação entre TO e RC, buscamos caracterizar potenciais RNAs mensageiros alvos, utilizando o *software IPA - Ingenuity pathway analysis*. Nós consideramos para análise, alvos classificados como

altamente preditos e experimentalmente observados (Tabela 4). De maneira geral, destacamos o miR-1260a que está diminuído na TO em relação à RC e, pelas análises do IPA, é um dos microRNAs com mais alvos (290 alvos), seguido do miR-27a-5p (165 alvos). Destacamos também que apenas 4 alvos foram experimentalmente observados, dos quais 3 são regulados pelo miR-331-3p e 1 pelo miR-638.

Tabela 4: Número de alvos dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC

microRNA	Nº de alvos Totais	Nº de alvos altamente preditos e experimentalmente observados	Nº de alvos experimentalmente observados
miR-1260a	1190	290	-
miR-27a-5p	1001	165	-
miR-1233-3p	733	136	-
miR-331-3p	666	133	3
miR-638	506	60	1
miR-885-5p	309	45	-
Total	4.405	829	4

Legenda: Dados obtidos pelo IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

Após quantificar o número de potenciais alvos desses microRNAs, partimos para a identificação de quantos desses alvos poderiam ter relação com o sistema imunológico. Dos 833 potenciais alvos altamente preditos e/ou experimentalmente observados, 238 (28,6%) podem ter relação com o sistema imune. Em seguida, nós utilizamos esses 238 alvos e, a partir do uso de filtros de seleção de busca no IPA, foi possível classificá-los em diversos grupos funcionais (Figura 12). Nós destacamos alguns desses alvos nomeando-os acima das barras (Figura 12). Os alvos nomeados têm, em comum, o fato de estarem presentes em diferentes tipos de células do sistema imune. Destacamos os grupos de enzimas e de

reguladores da transcrição, que são os que concentram o maior número de potenciais alvos. No agrupamento intitulado como “outros”, foi possível visualizar, individualmente, um considerável número de fatores de transcrição da família *Zinc finger* e moléculas associadas à sobrevivência celular.

Figura 12: Agrupamento funcional de potenciais alvos dos miRNAs do perfil diferencial TO x RC. Acima das barras, temos alguns exemplos de genes e seus respectivos grupos funcionais. Essas análises foram realizadas a partir de filtros do IPA como discutido em M&M.

4.5. Agrupamento funcional dos potenciais alvos dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC, nos diferentes tipos celulares

Depois de classificar esses alvos, funcionalmente, nós buscamos caracterizar a distribuição desses, nos diferentes tipos de células do sistema imunológico. Vimos que há uma distribuição heterogênia entre as diferentes populações celulares (Figura 13). Chama-nos

a atenção a quantidade de enzimas e de fatores de transcrição que podem ser regulados por esses microRNAs do perfil diferencial (TO x RC), nos diferentes tipos celulares. Há poucos alvos nos granulócitos e nas células *natural killers* (NK). Entretanto, nas células que têm um papel de destaque no transplante, como aquelas envolvidas com a apresentação de antígenos, as produtoras de anticorpos e de citocinas pró e anti-inflamatórias, há uma concentração considerável de alvos, e estes estão distribuídos de forma heterogênea nos diferentes grupos funcionais (Figura 13). Não há na figura, a discriminação de células com perfil imunorregulador (Tregs, Bregs, macrófagos M2, DC tolerogênicas) devido às limitações do programa. Entretanto, muitos dos alvos preditos são comuns nessas populações celulares com atividades Regula e Inflama.

Figura 13: Agrupamento Funcional dos potenciais alvos dos miRNAs do perfil diferencial TO x RC, nas diferentes células do sistema imune.

4.6. microRNAs do perfil diferencial TO x RC e seus potenciais alvos agrupados por atividade funcional

Objetivamos quantificar e qualificar os potenciais alvos que cada microRNA do perfil diferencial TO x RC poderia regular. Identificamos a quantidade de alvos que cada microRNA, individualmente, poderia regular e em quais classes funcionais essa regulação poderia ser mais acentuada. Com isso, identificamos peculiaridades importantes de cada microRNA sobre seus alvos. Vimos por exemplo, que o miR1260a (< em TO x RC) e o miR-27a-5p (> em TO x RC), além de ser os microRNAs que possuem maiores quantidades de alvos, têm a maior concentração de alvos nos grupos de enzimas e fatores de transcrição (Figura 14).

Figura 14: Número de alvos por microRNAs do perfil diferencial TO x RC. Dados obtidos pelo *Ingenuity Pathway Analysis*.

Podemos observar, também, que a distribuição de alvos não é homogênea entre os grupos. Dentre esses microRNAs, o miR-572 é o que possui a menor quantidade de alvos e a menor distribuição desses alvos nos grupos funcionais (Figura 14). O miR-885-5p também tem uma menor quantidade e distribuição de alvos, mas se destaca dos demais pela quantidade de peptidases que regula. O miR-331 se destaca, também, por regular uma maior quantidade de enzimas do que os demais. Já o miR-1233 concentra maior quantidade de fosfatases como alvos. O miR-638 parece regular mais reguladores da transcrição (Figura 14).

Na Figura 14, não acrescentamos os alvos NR4A1 (do inglês, *nuclear receptor subfamily 4 group A member 1*) e EIFIAY (do inglês, *eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*), pois esses genes eram únicos dentro de seus grupos funcionais (receptor nuclear e regulador da tradução, respectivamente). O NR4A1 é potencialmente regulado pelo miR-27a-5p e o EIFIAY, pelo miR-885. Também não acrescentamos o grupo “outros” nesta figura, mas todos os microRNAs regulam quantidades maiores de outros tipos de mRNA que não se enquadram nos grupos funcionais dados pelo IPA, mas que têm grande impacto em processos biológicos, como por exemplo, alguns fatores de transcrição e genes envolvidos com atividade anti-apoptótica, como o BCL2.

4.7. Identificação, *in silico*, das vias altamente enriquecidas, com base nos alvos dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC

Depois da caracterização dos alvos, nosso próximo passo foi utilizar o IPA para identificar quais vias de sinalização estariam altamente enriquecidas pela regulação desses microRNAs. A ideia é explorar como os potenciais alvos podem estar interligados, de quais vias eles poderiam fazer parte, e em quais etapas eles seriam importantes. Essa estratégia nos permitiu levantar hipóteses de mecanismos a serem testados, posteriormente.

As vias preditas como reguladas pela ação dos microRNAs integrantes do perfil diferencial (TO x RC) têm atividade funcional concentrada em processos apoptóticos, como a *Granzyme B signaling* (Sinalização da granzima B), *Death receptor Signaling* (Receptor de morte), entre outras, bem como na manutenção e regeneração de tecidos biológicos em indivíduos adultos, como por exemplo, a via *Sonic Hedgehog Signaling* (Figura 15). Nós selecionamos para elaboração de hipóteses e interpretações, as 3 primeiras vias moleculares dentre as 12 vias canônicas apresentadas, que são: a via da flavina, via da granzima B e receptor de morte, como destacado no quadro em vermelho (Figura 15). Nosso objetivo foi fazer o exercício interpretativo dos potenciais efeitos da regulação desses microRNAs do perfil diferencial, sobre os seus alvos, nessas vias. Na construção dessas hipóteses também consideramos os níveis dos microRNAs nos diferentes contextos (TO, RC e SAU), afim de discutir sobre o seu potencial envolvimento nos mecanismos de tolerância. Ambas as vias podem ser biologicamente relevantes para se discutir no contexto da tolerância, uma vez que elas têm papel na morte celular que é também um mecanismo de manutenção da homeostase.

Apresentaremos as figuras na seguinte ordem: Via flavina, seguida da granzima B e receptor de morte.

Figura 15: As 12 primeiras vias canônicas alvo dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC. Dados derivados das análise do programa IPA. Seguindo a "Análise de Núcleo" do IPA, esses 12 caminhos canônicos surgiram. O Gráfico mostra classificações de categorias. Na parte superior do gráfico temos o nível de significância (-log (p-value), do teste exato de Fisher, definido aqui em 1,25). O valor "Ratio" representa o número de microRNAs diferencialmente atuantes na via, dividido pelo número total de moléculas da via.

Via Flavina

A via da flavina possui cerca de 7 componentes envolvidos com a produção de FAD. Dois dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC podem regular alvos críticos nesta via. O miR-27a-5p regula o RFK (do inglês, *Riboflavina quinase*) e o miR-572 regula o FLAD1 (do inglês, *Flavina adenina dinucleótido sintetase 1*) (Figura 16).

Figura 16: Representação gráfica da via Flavina. Via potencialmente regulada pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC. As análises são derivadas do programa IPA (*Ingeniuty Pathway Analysis*). A alteração da expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade de cores (verde: hipotético e vermelho: hipotético). A legenda na figura discrimina a predição da regulação dos alvos.

Considerando apenas a interpretação de maiores ou menores níveis dos microRNAs de interesse, na comparação entre TO x RC, os potenciais efeitos que eles teriam sobre as moléculas alvos, nas vias, levariam a uma maior ou menor ativação dessas moléculas e, conseqüentemente, dois desfechos clínicos opostos, como podemos ver na legenda da Figura 16. Embora nosso foco principal seja a diferença nos níveis de microRNAs entre TO e RC, temos também considerado que a comparação com o grupo saudável é essencial para uma interpretação sobre como o contexto de tolerância operacional se diferencia ou se assemelha ao estado fisiológico, em relação aos níveis dos microRNAs do perfil diferencial (Tabela 5).

Tabela 5. Potenciais efeitos do miR-27a-5p e do miR-572 nos diferentes alvos da via Flavina, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via Flavina	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desfecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-27a-5p	TO > RC	↓ TO ↓↓ RC	RPK (<i>Riboflavina quinase</i>)	TO x RC: < RPK (TO) > RPK (RC) Comparação com estado fisiológico: ↑ RPK (TO) ↑↑ RPK (RC)	É uma enzima essencial que catalisa a fosforilação da riboflavina (vitamina B2) em FMN ativo, que pode ser convertido em FAD.	O miR-27a diminuído pode ajudar a promover mais FMN na TO e ainda mais na RC. A super expressão de FMN pode ter impacto na atividade mitocondrial que associada a outros fatores pode levar a mais morte na RC
miR-572	TO < RC	(P) TO ↑ RC	FLAD1 (<i>Flavina adenina dinucleótido sintetase 1</i>)	TO x RC : > FLAD1 (TO) < FLAD1 (RC) Comparação com estado fisiológico: (P) FLAD1 (TO) ↓ FLAD1 (RC)	Enzima que catalisa a adenilação de FMN em FAD, que é um cofactor essencial em vias importantes, incluindo, a cadeia transportadora de elétrons (Respiração mitocondrial).	Como o miR-572 está aumentado na RC pode haver menos conversão de FMN em FAD, uma vez que FLAD1 pode estar diminuído. Somado ao efeito do miR-27a-5p teríamos maior acúmulo de FMN na RC mais do que na TO, com potencial impacto na atividade mitocondrial de diferentes células.

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica. FMN=Flavina mononucleotide. FAD=Dinucleótido de Flavina e Adenina.

Dentro da via da flavina, os microRNAs do perfil diferencial, miR-27a e miR-572, mesmo possuindo níveis séricos e alvos diferentes, podem contribuir para acúmulo de FMN e consequente alteração da atividade mitocondrial na RC. Este acúmulo pode ser maior na RC, uma vez que, miR-27a-5p que possui níveis menores na RC pode levar à maior expressão de RFK. Como esta enzima é responsável pela transformação da riboflavina em FMN, interpretamos que o aumento de RFK pode levar a uma maior produção de FMN. Em acréscimo, o acúmulo de FMN, na RC, pode ser ainda intensificado, devido à menor expressão de FLAD1, consequente aos maiores níveis de miR-572 na RC. Vale salientar que os níveis do miR-572 estão menores na TO quando comparados à RC, mas possuem níveis semelhantes ao estado fisiológico, o que nos leva a interpretar que as alterações na produção de FAD ocorre de maneira mais acentuada na RC.

Via da granzima B

Na via da granzima B há cerca de 30 componentes envolvidos no processo de morte celular, dos quais, seis, podem ser regulados pelos microRNAs do perfil diferencial (Figura 17). Nesta via, 5 microRNAs aparecem regulando diferentes alvos, entre eles, destacamos as caspases. Devido aos maiores níveis na TO do miR-885, miR-27 e miR-331, quando comparados com os da RC, levantamos a hipótese de que, pode haver na TO, menor expressão das caspases 3, 8 e 9, respectivamente, e, consequentemente, menos morte celular na TO. Por outro lado, interpretamos que o oposto pode estar ocorrendo na RC, uma vez que os níveis desses microRNAs estão menores. É importante destacar, que essas caspases também têm outras funções e impacto nos efeitos Regula e Inflama, nos diversos tipos celulares como nos mostram nas Tabelas 6 e 7. No entanto, daremos mais ênfase ao seu papel apoptótico.

Figura 17: Representação gráfica da via de Granzimas B. Via potencialmente regulada pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC. As análises são derivadas do programa IPA(*Ingenuity Pathway Analysis*). A alteração da expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade de cores (verde: hipoeexpresso e vermelho: hipereexpresso). A legenda na figura discrimina a predição da regulação dos alvos.

Tabela 6. Potenciais efeitos do miR-27a-5p e do miR-331 nos diferentes alvos da via Granzima, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via Granzima	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desfecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-27a-5p	TO > RC	↓ TO ↓↓ RC	Perforina	TO x RC: < Perforina (TO) > Perforina (RC) Comparação com estado fisiológico: ↑ Perforina (TO) ↑↑ Perforina (RC)	Forma túbulos transmembranares e é capaz de lisar uma variedade de células alvo. Esta proteína é uma das principais proteínas citolíticas de grânulos citolíticos, e é conhecida por ser uma molécula efetora chave para a citólise mediada por células T e células NK	Menos ação lítica na TO x RC
			Caspase 8	TO x RC: < Caspase 8 (TO) > Caspase 8 (RC) Comparação com estado fisiológico: ↑ Caspase 8 (TO) ↑↑ Caspase 8 (RC)	1. Ativação sequencial de caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular 2. Atua na ativação do NF-KB 3. Atua na inativação do inflamassoma NLRP3	1. Menos morte na TO x RC 2. Menos ativação de genes inflamatórios – Efeito Regula - TO x RC 3. Mais ativação Inflamassoma- Efeito Inflama na TO x RC
miR-331	TO > RC	(P) TO ↓ RC	Caspase 9	TO x RC: < Caspase 9 (TO) > Caspase 9 (RC) Comparação com estado fisiológico: (P) Caspase 9 (TO) ↑ Caspase 9 (RC)	1. Atua na ativação sequencial da caspase 3. 2. Pode atuar indiretamente nos efeitos REGULA	1. Pode existir menos apoptose na TO x RC 2. Pode existir menos efeito Regula na TO x RC

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica. Efeito Regula = Ações que favorecem um contexto imunoregulador. Efeito Inflama = Ações que favorecem um contexto inflamatório.

Tabela 7. Potenciais efeitos do miR-885, miR-1233 e do miR-1260a nos diferentes alvos da via Granzima, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via Granzima	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-885	TO>RC	(P) TO ↓ RC	Caspase 3	TO x RC: <Caspase 3 (TO) > Caspase 3 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)Caspase 3 (TO) ↑ Caspase 3 (RC)	1.Fragmentação do DNA 2.Atua na exposição da fosfatidilserina e degradação da IL-33	1.Pode existir menos apoptose na TO x RC
miR-1233	TO<RC	(P) TO ↑ RC	CAD (<i>carbamoyl-phosphate synthetase 2</i>)	TO x RC: > CAD (TO) <CAD 3 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)CAD (TO) ↓ CAD (RC)	Envolvida na ativação da cascata de MAPK e a biossíntese de novo de nucleótidos de pirimidina.	Pode haver maior proliferação celular na TO x RC
miR-1260a	TO <RC	↓ TO (P) RC	NUMA (<i>nuclear mitotic apparatus protein</i>)	TO x RC: > NUMA (TO) < NUMA (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ NUMA (TO) (P) NUMA (RC)	Interage com microtúbulos e desempenha um papel na formação e organização do fuso mitótico durante a divisão celular.	Impacto na divisão celular. Maior proliferação na TO x RC

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Figura 18: Representação dos potenciais efeitos que podem estar ocorrendo na TO e RC, na via Granzima B, com base nos níveis de microRNAs do perfil diferencial. O gradiente de cores no fim da figura indica que os quadros em azul teriam um efeito de promoção da sobrevida celular, enquanto aqueles em vermelho, um efeito de morte. O verde seria um efeito ainda não definido, com desdobramentos que podem favorecer, indiretamente, a sobrevida ou maior expressão de genes inflamatórios. Nos quadros amarelos consta a comparação com o estado fisiológico. Legenda: (>) maior ou (<) menor nas comparações entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Na Figura 18, vemos de maneira global, os principais efeitos da potencial regulação dos alvos moleculares da via Granzima B, considerando os níveis séricos dos microRNAs do perfil diferencial, e a função de seus potenciais alvos. Além dos efeitos canônicos das caspases, nós destacamos os efeitos adicionais que estão envolvidos com respostas imunes Regula e Inflama em diferentes contextos celulares (Tabelas 6 e 7). Nós levantamos como hipótese que as alterações nos níveis desses microRNAs, principalmente dos microRNAs miR-331, miR-885-5p e miR-27a-5p, podem favorecer maior sobrevivência na TO e maior ocorrência de morte celular na RC.

Via de receptor de morte

Na via de receptor de morte há mais de 50 moléculas que estão envolvidas no processo de morte celular (Figura 19), dentre elas, 11 podem ser reguladas pelos microRNAs do perfil diferencial. Nesta complexa e grande via, seis dos sete microRNAs diferencialmente detectados na TO x RC estão regulando alvos centrais no processo de morte celular. Há alguns alvos mais bem conhecidos como o RIPK1 (*Receptor interacting serine/threonine kinase 1*), BCL2 e as caspases, como também, receptores e moléculas de TNF-alfa. Nesta via, também nos chama a atenção o fato do receptor TL1, conhecido como TNFSF15 (*TNF superfamily member 15*), poder sofrer regulação de 4 microRNAs do perfil diferencial TO x RC; são eles miR-27a-5p, miR-331, miR-1260a e miR-1233. Interpretamos que essa regulação pode provocar alterações na expressão de genes pró-inflamatórios e do BCL2, podendo favorecer maior sobrevivência celular, ora na TO, ora na RC.

Figura 19: Representação gráfica da via de Receptor de morte. Via potencialmente regulada pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC. As análises são derivadas do programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). A alteração da expressão dos microRNAs é representada pela graduação da intensidade de cores (verde: hipotexpresso, vermelho: hiperexpresso). A legenda na figura discrimina a predição da regulação dos alvos.

Tabela 8. Potenciais efeitos do miR-27a-5p nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-27a-5p	TO >RC	↓ TO ↓↓ RC	RIPK1 (<i>Receptor interacting serine/threonine kinase 1</i>)	TO x RC: < RIPK1 (TO) > RIPK1 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ RIPK1 (TO) ↑↑ RIPK1 (RC)	Quinase envolvida na transdução de sinais de necrose	Pode haver menor quantidade de RIPK1 na TO, e como consequência, menor indução de morte celular na TO x RC
			BCL2	TO x RC: < BCL2 (TO) > BCL2 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ BCL2 (TO) ↑↑ BCL2 (RC)	Regulador positivo da sobrevivência celular	Pode haver menor quantidade de BCL2 na TO que favorece a sobrevida celular e menor ativação da transcrição de genes inflamatórios
			TL1 (TNFSF15) <i>TNF superfamily member 15</i>	TO x RC: < TNFS15 (TO) > TNFS15 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ TNFS15 (TO) ↑↑ TNFS15 (RC)	Ativa NF-kappaB e MAP quinases, e atua como um fator autócrino de indução de apoptose. NF-KappaB pode ativar a transcrição de genes inflamatórios e moléculas antiapoptóticas como BCL2.	Pode haver menor ativação de NF-kappaB e ativação da transcrição de genes inflamatórios e BCL2 que favorece a sobrevida celular na TO

Legenda:(>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Tabela 9. Potenciais efeitos do miR-331 e miR-885 nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-331	TO >RC	(P) TO ↓RC	TL1 (TNFSF15) (<i>TNF superfamily member 15</i>)	TO x RC: < TNFS15 (TO) > TNFS15 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P) TNFS15 (TO) ↑ TNFS15 (RC)	Ativa NF-kappaB e MAP quinases, e atua como um fator autócrino de indução de apoptose em células endoteliais. NF-KappaB pode ativar a transcrição de genes inflamatórios e moléculas antiapoptóticas, como BCL2.	Menos ativação de NK-kappaB na TO podendo haver menos ativação da transcrição de genes inflamatórios e BCL2 que atua na sobrevivência celular
			TNF(<i>tumor necrosis factor</i>)	TO x RC: < TNF (TO) > TNF (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)TNF (TO) ↑ TNF (RC)	Envolvida na regulação de processos biológicos incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação	Pode haver menor atividade pró-inflamatória na TO
			CASP9 (<i>Caspase9</i>)	TO x RC: < CASP9 (TO) > CASP9 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)CASP9 (TO) ↑CASP9 (RC)	1.Atua na ativação sequencial da CASP3 2.Pode atuar indiretamente nos efeitos Regula	1.Pode existir menos apoptose na TO 2.Pode existir efeito Regula
miR-885	TO >RC	(P) TO ↓RC	CRADD (RAIDD)	TO x RC: < CRADD (TO) > CRADD (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)CRADD (TO) ↑CRADD (RC)	Esta proteína recruta a caspase 2 para o complexo de transdução do sinal de morte celular e atua na promoção da apoptose.	Pode existir menos apoptose na TO
			CASP3 (<i>Caspase 3</i>)	TO x RC: <CASP3 (TO) >CASP3 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P)CASP3 (TO) ↑ CASP3 (RC)	1.Fragmentação do DNA 2.Atua na exposição da fosfatidilserina e degradação da IL-33	1. Pode existir menos apoptose na TO 2. Efeito Regula

Legenda:(>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica. Efeito Regula = Ações que favorecem um contexto imunoregulador. Efeito Inflama = Ações que favorecem um contexto inflamatório.

Tabela 10. Potenciais efeitos do miR-1260a nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-1260a	TO<RC	↓ TO (P) RC	TL1 (TNFSF15) <i>TNF superfamily member 15</i>	TO x RC: >TNFS15 (TO) < TNFS15 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ TNFS15 (TO) (P)TNFS15 (RC)	Ativa NF-kappaB e MAP quinases, e atua como um fator autócrino de indução de apoptose em células endoteliais. NF-KappaB pode ativar a transcrição de genes inflamatórios e moléculas antiapoptóticas como BCL2.	Na TO, pode haver mais ativação de NK-kappaB e ativação da transcrição de genes inflamatórios e também de BCL2 que atua na sobrevivência celular tanto em relação à RC como em relação ao estado fisiológico.
			DAXX <i>Death domain associated protein</i>	TO x RC: > DAXX (TO) < DAXX (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ DAXX (TO) (P)DAXX (RC)	Interage com uma grande variedade de proteínas, tais como Fas que está envolvida na ativação da apoptose. Esta proteína também se associa com centrômeros na fase G2 e inibe a transcrição.	Pode haver mais morte celular na TO
			MAP3K5 (ASK1) <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>	TO x RC: > MAP3K5 (TO) <MAP3K5 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ MAP3K5(TO) (P)MAP3K5 (RC)	Quinase envolvida na ativação da cascata de sinalização que pode ativar c-Jun e p38, com desfechos imunológicos distintos	Na TO pode haver um aumento da propagação dos sinais da via MAP3K5 que pode ter importância em muitos desfechos imunológicos, inclusive na diferenciação de células T
			BCL2	TO x RC: > BCL2 (TO) < BCL2 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ BCL2 (TO) (P)BCL2(RC)	Regulador negativo da apoptose	Pode haver maior expressão de BCL2 na TO, que pode levar à maior sobrevivência celular

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Tabela 11. Potenciais efeitos do miR-638 e miR-1233 nos diferentes alvos da via de Receptor de morte, no contexto TO x RC

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-638	TO < RC	(P) TO ↑RC	TNF (<i>tumor necrosis factor</i>)	TO x RC: > TNF (TO) < TNF (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)TNF (TO) ↓TNF (RC)	Envolvida na regulação de processos biológicos incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação	Pode haver maior atividade pró-inflamatória na TO
			TBK1 (<i>TANK binding kinase 1</i>)	TO x RC: >TBK1 (TO) <TBK1 (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)TBK1 (TO) ↓TBK1 (RC)	Fosforila resíduos de serina nas proteínas, marcando –as para destruição pela via de ubiquitinação. Leva também à ativação do NF-kappaB	Pode haver aumento da atividade da fosforilação e aumento da ativação e translocação nuclear do complexo NF-kappaB na TO x RC. Isso se soma para aumentar a indução de genes inflamatórios e de BCL2 na TO.
miR-1233	TO < RC	(P) TO ↑RC	TL1 (TNFSF15) <i>TNF superfamily member 15</i>	TO x RC: > TNFS15 (TO) < TNFS15 (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)TNFS15 (TO) ↓TNFS15 (RC)	Ativa NF-kappaB e MAP quinases, e atua como um fator autócrino de indução de apoptose em células endoteliais. NF-KappaB pode ativar a transcrição de genes inflamatórios e moléculas antiapoptóticas	Pode haver maior ativação de NK-kappaB na TO x RC, podendo haver maior ativação da transcrição de genes inflamatórios e de BCL2 que atua na sobrevivência celular.
			DFFB (<i>DNA fragmentation factor subunit beta</i>)	TO x RC: > DFFB (TO) < DFFB (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)DFFB (TO) ↓DFFB (RC)	Substrato para a caspase 3 e desencadeia a fragmentação do DNA durante a apoptose. DFFB desencadeia tanto a fragmentação do DNA como a condensação da cromatina durante a apoptose.	Pode haver aumento da fragmentação do DNA de alguns tipos celulares, na TO em relação à RC

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído ou (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Nas Figuras 20 e 21 podemos observar de maneira global, os principais efeitos da potencial regulação dos alvos moleculares da via de receptor de morte, considerando os níveis séricos dos microRNAs do perfil diferencial, e a função de seus potenciais alvos. Entre os alvos potencialmente regulados, destacamos o fator antiapoptótico BCL2, que pode ser regulado pelo miR-1260a e o miR-27a-5p. Embora o miR-27a-5p, que está ainda mais diminuído na RC em relação ao estado fisiológico, possa atuar promovendo maior expressão do BCL2 na RC, o miR-1260a, que está preservado na RC e mais diminuído na TO, pode atuar de maneira diferencial, promovendo maior expressão de BCL2 na TO, favorecendo maior sobrevivência celular (Tabela 10 e Figura 20). Assim, temos na TO, dois microRNAs atuando, potencialmente, na maior expressão de mecanismos antiapoptóticos. Entretanto, embora esses diferentes mecanismos de morte e vida possam estar sendo mobilizados na TO e RC, em virtude do conjunto de desfechos relacionados aos níveis e função dos alvos regulados, interpretamos que, na RC, podem estar ocorrendo as maiores perturbações à homeostase e maior favorecimento de morte celular (Figuras 20 e 21).

Figura 20: Representação dos potenciais efeitos que podem estar ocorrendo na TO e RC, na via de receptor de morte, com base nos níveis de microRNAs do perfil diferencial encontrado. O gradiente de cores no fim da figura indica que os quadros em azul teriam um efeito de promoção da sobrevivida celular, enquanto aqueles em vermelho, um efeito de morte. O verde seria um efeito ainda não definido, com desdobramentos que podem favorecer, indiretamente, a sobrevivida ou maior expressão de genes inflamatórios. Nos quadros amarelos constam a comparação com o estado fisiológico. Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

A fim de obter a quantificação global dos efeitos de sobrevida celular na TO e RC, baseada na potencial regulação dos microRNAs sobre a via de morte e granzimas quantificamos as frequências dos potenciais efeitos de vida e morte, como apontadas na Tabela 2 do M&M. Observamos maior percentagem de efeitos que favorecem morte celular na RC (Figura 22). A maioria dos efeitos que podem favorecer morte na RC ocorre, por exemplo, via a maior promoção de expressão de proteínas pró-apoptóticas como as Caspases 3, 8 e 9, que podem ser reguladas pelos microRNAs miR-885, miR-27a-5p e miR-331, respectivamente. Na TO há maiores níveis séricos desses microRNAs quando comparados com aqueles à RC. Sendo assim, levantamos a hipótese de que pode haver, na TO, menor expressão de moléculas pró-apoptóticas, favorecendo efeitos de sobrevida celular, enquanto que, na RC, pode haver um aumento nessas caspases que favorecem efeitos de morte celular.

Efeito global **vida/morte** dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC nas vias de sinalização de morte celular (Granzimas + Receptor de Morte)

Razão **Vida/Morte**:1,95

Razão **Vida/Morte**:0,39

Figura 22: Quantificação global dos efeitos de vida e morte na TO e RC. Quantificação baseada na potencial regulação dos microRNAs sobre as vias granzima B e via do receptor de morte. A quantidade de efeitos VIDA, MORTE estão expressos em %. Também foram calculadas a razão Vida/Morte para cada grupo. As frequências de ocorrência dos efeitos VIDA, MORTE entre os grupos TO e RC foram calculadas por teste de qui-quadrado. O * indica ($p = 0,0001$). A pontuação seguiu os critérios estabelecidos na tabela 2 do M&M.

4. 8. Rede Geral dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC relacionando à rede de interação na rejeição do enxerto

Para verificar se alguns dos componentes moleculares, previamente, conhecidos por seu envolvimento na rejeição do transplante, podem ser regulados pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC, nós selecionamos os microRNAs e os lançamos numa rede de interação molecular já construída pelo IPA para rejeição do enxerto. Nessa rede, as moléculas fornecidas pelo programa já têm papel conhecido nos processos de ativação imunológica envolvidos na rejeição, como por exemplo, CD80, IFNG (Figura 23). Os alvos em verde, mostrados na figura, como o ICOS, PPP3R1, TGFB1 estão diminuídos, devido à potencial regulação pelos microRNAs miR-331, miR-885 e miR-27a-5p, respectivamente.

Nós também levantamos hipóteses de regulação dos mecanismos de rejeição do enxerto via a ação dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC (Tabelas 12-15). Nós destacamos a potencial regulação do miR-27a-5p sobre o TGFB1, podendo favorecer sua expressão, sobretudo na RC. Ademais, detectamos potencial regulação de moléculas coestimuladoras, tais como CD80 e CD86, críticas no processo de ativação ou inativação da proliferação celular, a partir da ligação com CD28 ou CTLA4, respectivamente. O CD80 e CD86 podem ser regulados pelos microRNAs miR-27a e miR-1260, respectivamente, e esses microRNAs estão diminuídos na TO x SAU.

Figura 23: Representação gráfica da rede de Interação molecular da rejeição do enxerto. Temos na figura os microRNAs do perfil diferencial TO x RC. A alteração da expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade de cores (verde: hipoeexpresso, vermelho: hiperexpresso). Legenda na figura discrimina a predição da regulação dos alvos. As imagens e análises são produzidas pelo IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

Tabela 12. Potenciais efeitos do miR-27 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-27a	TO >RC	↓ TO ↓↓ RC	CD80	TO x RC: < CD80 (TO) > CD80 (RC) Comparação com o estado fisiológico ↑ CD80 (TO) ↑↑CD80 (RC)	CD80/B7 –É um receptor de membrana que é ativado ou inativado pela ligação de CD28 ou CTLA-4, respectivamente. A proteína ativada induz a proliferação de células T e a produção de citocinas.	A ligação com CD28→ Ativa a célula → Pode levar a efeitos Inflama A ligação com CCTLA4 → Inibe a célula → Pode levar a efeitos Regula
			TGFB1 (<i>transforming growth factor beta 1</i>)	TO x RC: <TGFB1 (TO) > TGFB1 (RC) Comparação com o estado fisiológico ↑ TGFB1 (TO) ↑↑TGFB1 (RC)	TGFB1 regula a proliferação, diferenciação e crescimento celular. Tem papel no processo fibrótico e na geração de células Tregs.	Mais expressão de TGFB1 na RC que poderia estar associada com a fibrose no enxerto Geração de células Tregs → Pode levar a efeitos Regula
			FKBP1A (<i>FK506 binding protein 1A</i>)	TO x RC: < FKBP1A (TO) >FKBP1A (RC) Comparação com o estado fisiológico ↑ FKBP1A (TO) ↑↑ FKBP1A (RC)	Desempenha um papel na imunorregulação e processos celulares básicos, envolvendo dobramento e tráfico de proteínas. Ele interage com várias proteínas de transdução de sinal intracelular, incluindo o receptor TGF-beta do tipo I.	Alteração em processos celulares como dobramento de proteínas

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído na comparação com o estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica. Efeito Regula = Ações que favorecem um contexto imunorregulador. Efeito Inflama = Ações que favorecem um contexto inflamatório.

Tabela 13. Potenciais efeitos do miR-885 e miR-331 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-885	TO>RC	(P) TO ↓RC	PPP3R1 (protein phosphatase 3 regulatory subunit B, alpha)	TO x RC: < PPP3R1 (TO) >PPP3R1 (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)PPP3R1 (TO) ↑ PPP3R1 (RC)	Sem função descrita	--
miR-331	TO>RC	(P) TO ↓RC	PPP3R2 (protein phosphatase 3 regulatory subunit B, beta)	TO x RC: < PPP3R2 (TO) > PPP3R2 (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)PPP3R2 (TO) ↑ PPP3R2 (RC)	calcineurin B, type II (<i>Mus musculus</i>)	--
			ICOS (inducible T-cell costimulatory)	TO x RC: < ICOS (TO) >ICOS (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)ICOS (TO) ↑ ICOS (RC)	Pertence à família de receptores de superfície celular CD28 e CTLA-4. Forma homodímeros e desempenha um papel importante na sinalização celular, na resposta imune e na regulação da proliferação celular.	Menos ativação celular na TO

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído na comparação com o estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

A última molécula que gostaríamos de destacar, nesta rede de interação molecular, é o mTOR que pode ser regulado pelo miR-1233. Por estar diminuído na TO, o miR-1233 pode levar à maior expressão de mTOR. Embora os efeitos ainda não sejam bem estabelecidos em relação a favorecer ativação regula ou inflama no contexto estudado, sabemos que o mTOR é encontrado em dois distintos complexos, o mTORC1 e mTORC2, sendo críticos na diferenciação de Th1 e Th2, respectivamente (Delgoffe et al., 2009).

Tabela 14. Potenciais efeitos do miR-1260a e miR-1233 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto

microRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desfecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-1260a	TO < RC	↓ TO (P) RC	CD86	TO x RC: > CD86 (TO) < CD86 (RC) Comparação com o estado fisiológico: ↑ CD86 (TO) (P) CD86 (RC)	CD80 / B7.2--É um receptor de membrana que ao se ligar as moléculas CD28 ou CTLA-4 pode ativar ou inativar, respectivamente, a proliferação de células T e a produção de citocinas.	Pode existir: A ligação com CD28--> Ativa a célula--> Pode levar a efeitos Inflama na TO A ligação com CCTLA4--> Inibe a célula--> Pode levar a efeitos Regula na TO
miR-1233	TO < RC	(P) TO ↑ RC	PPP3R2 (protein phosphatase 3 regulatory subunit B, beta)	TO x RC: > PPP3R2 (TO) < PPP3R2 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P) PPP3R2 (TO) ↓ PPP3R2 (RC)	Calcineurin B, type II (<i>Mus musculus</i>)	--
			mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase)	TO x RC: > mTOR (TO) < mTOR (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P) mTOR (TO) ↓ mTOR (RC)	Essa quinase é encontrada na forma mTOR1 e mTOR2 medeiam as respostas celulares e atuam na diferenciação de células TCD4+	Maior atividade de mTOR na TO x RC
			SERPING1 (serpin family G member 1)	TO x RC: > SERPING1 (TO) < SERPING1 (RC) Comparação com o estado fisiológico: (P) SERPING1 (TO) ↓ SERPING1 (RC)	Essa proteína inibe os componentes do sistema complemento C1r e C1s.	Menos ativação do sistema complemento na TO- Efeito Regula na TO x RC

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído na comparação com o estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Tabela 15. Potenciais efeitos do miR-638 nos diferentes alvos da rede de interações moleculares da rejeição do enxerto

miRNA	Nível do miRNA na TO e RC	Nível do miRNA em relação ao estado fisiológico	Potenciais alvos na via de Receptor de morte	Potenciais efeitos dos microRNAs nos alvos	Função do gene alvo	Potencial desdecho da regulação do microRNA no contexto TO x RC
miR-638	TO < RC	(P) TO ↑ RC	LY6E (<i>lymphocyte antigen 6 family member E</i>)	TO x RC: > LY6E (TO) < LY6E (RC) Comparação com o estado fisiológico (P) LY6E (TO) ↓ LY6E (RC)	Sem função descrita	--
			IFNG (<i>Interferon gamma</i>)	TO x RC: > IFNG (TO) < IFNG (RC) Comparação com o estado fisiológico (P)IFNG (TO) ↓ IFNG (RC)	É uma citocina secretada por células do sistema imune. Tem função predominantemente Inflama, no contexto do TX.	Pode existir mais IFNG na TOx RC. Isso pode estar associado aos menores riscos de infecção na TO
			GABRG2 (<i>gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma2 subunit</i>)	TO x RC: > GABRG2 (TO) < GABRG2 (RC) Comparação com o estado fisiológico (P) GABRG2 (TO) ↓ GABRG2 (RC)	Este gene codifica um receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro de mamíferos, onde atua nos receptores GABA-A, que são canais de cloreto ligados por ligando.	Maior produção de GABA na TO x RC

Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído na comparação com o estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Nas Figuras 24 e 25, observamos o efeito global da potencial regulação dos alvos envolvidos com processo de rejeição do enxerto pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC. Como mostramos na figura, não é possível uma definição categórica dos efeitos que podem ser mais Regula e/ou Inflama na TO e RC, devido à diversidade de efeitos e ao fato de que algumas moléculas ainda terem sua função desconhecida, como o PP3R1 e LY6E, que podem ser reguladas pelos microRNAs: miR-885-5p, miR-1233 e miR-638, respectivamente.

Embora tenhamos, muitas vezes, considerado em nossas análises de potenciais efeitos, os níveis dos microRNAs do perfil diferencial em relação ao estado fisiológico, gostaríamos de enfatizar que não é a comparação do grupo TO x SAU que nos permite levantar hipóteses de potenciais mecanismos na TO. A análise combinada entre os grupos TO, RC e SAU nos permite ter uma visão mais crítica e complexa do que pode estar acontecendo na imunobiologia da tolerância operacional, ou aquilo que pode estar mais próximo dos complexos mecanismos biológicos, sendo assim, acentuamos que é a comparação de TO x RC que nos dará mais subsídios dos potenciais mecanismos de ação envolvidos na TO

Figura 24: Representação dos potenciais efeitos que podem estar ocorrendo na TO e RC, na rede de interações com componentes da rejeição ao enxerto com base nos níveis do perfil diferencial encontrado. O gradiente de cores no fim da figura indica que os quadros em azul teriam um efeito de promoção da sobrevivência celular, enquanto aqueles em vermelho, um efeito de morte. O verde seria um efeito ainda não definido, com desdobramentos que podem favorecer, indiretamente, a efeitos Regula ou Inflama. Nos quadros amarelos consta a comparação com o estado fisiológico. Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

Figura 25: Representação dos potenciais efeitos que podem estar ocorrendo na TO e RC, na rede de interações com componentes da rejeição ao enxerto com base nos níveis do perfil diferencial encontrado. O gradiente de cores no fim da figura indica que os quadros em azul teriam um efeito de promoção da sobrevivência celular, enquanto aqueles em vermelho, um efeito de morte. O verde seria um efeito ainda não definido, com desdobramentos que podem favorecer, indiretamente, a efeitos Regula ou Inflama. Nos quadros amarelos consta a comparação com o estado fisiológico. Legenda: (>) maior ou (<) menor na comparação entre os grupos transplantados; (P) preservado; (↓) diminuído; (↓↓) mais diminuído em relação ao estado fisiológico. TO= Tolerância Operacional. RC= Rejeição crônica.

4.9 Seleção de microRNA para validação individual

Para validar os níveis dos microRNAs no soro em um maior número de sujeitos de pesquisa, nós selecionamos o miR-885-5p para o ensaio individual. Esse microRNA tem um papel central na regulação das vias de morte celular, por regular a Caspase 3. Nossos dados mostram que o miR-885-5p continua apresentando maiores níveis na TO quando comparados com aqueles na RC ($p=0,0063$), e também apresentou maiores níveis quando comparados com indivíduos saudáveis ($p=0,0035$).

Figura 26 – Expressão relativa do miR-885-5p. TO n= 8; RC n=12; SAU n=12. Os valores estão expressos na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para o cálculo estatístico usamos o método de Kruskal-Wallis e os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$

Em resumo, nossos dados mostram que há um perfil diferencial de microRNAs na TO em relação à RC. O nosso conjunto de dados, *in silico*, sobre as vias de sinalização, enriquecidas para esses microRNAs, aponta que pode haver, na TO e RC, regulação de moléculas e vias envolvidas com a morte celular. Com base em nossas hipóteses de potenciais efeitos, interpretamos que há, na RC, maior frequência de efeitos que podem favorecer os mecanismos de morte celular. O miR-885-5p que se manteve em maiores níveis na TO x RC, por ensaio individual, sustenta a ideia de que o perfil diferencial de microRNAs encontrado na TO x RC pode estar, de fato, envolvido nos mecanismos de tolerância ao enxerto.

Para resumir os principais achados deste trabalho, na Figura 27, destacamos as principais hipóteses de mecanismos da TO, via regulação dos microRNAs do perfil diferencial. Optamos por dar ênfase aos mecanismos envolvidos com morte celular, uma vez que, como já mencionado, as vias de sinalização preditas como diferenciais na TO x RC têm moléculas cujas funções principais estão relacionadas aos processos de morte celular.

Figura 27: Potenciais mecanismos de ação envolvidos na tolerância operacional. Na parte superior das figuras temos os três principais achados do nosso trabalho (Dentro dos quadros na cor verde). Na parte inferior (área azul pontilhada) os potenciais mecanismos envolvidos na TO.

5. Discussão

A existência de um perfil diferencial de níveis de microRNAs na tolerância operacional, em relação ao seu desfecho clínico oposto, rejeição crônica, sugere que os microRNAs podem integrar a rede de mecanismos envolvidos na tolerância no transplante renal humano. Neste perfil diferencial de detecção sérica, as diferenças se deram, também, por alterações no grupo RC em relação ao estado fisiológico e pela capacidade de preservar níveis de microRNAs na TO. Para 5 dos 7 microRNAs, diferencialmente, detectados entre TO x RC, observamos preservação dos níveis na TO em relação ao estado fisiológico (miR-1233-3p, miR-572, miR-885-5p, miR-638, miR-331). Para 2 dos 7 microRNAs do perfil diferencial TO x RC, detectamos diminuição dos níveis na TO em relação ao estado fisiológico (miR-27a-5p, miR-1260a), sendo os níveis de miR-27a ainda mais diminuídos na RC, mas preservados para o miR-1260a. Isso indica que o estabelecimento de um estado de homeostase no transplante, com o desenvolvimento de tolerância pode envolver tanto a ativação/inibição de mecanismos que se diferenciam do estado fisiológico quanto alguns que são preservados.

Sabe-se que alterações na expressão de microRNAs podem estar associadas a diferentes formas de tolerância imunológica, inclusive tolerância ao aloenxerto. Já foi observado que, na gravidez, também um contexto de estímulo alogeneico, um conjunto de miRNAs podem regular a expressão de genes uterinos envolvidos na implantação do feto (Chakrabarty et al., 2007). No sangue materno e placenta também foi detectado um conjunto de microRNAs com uma particularidade em especial, eles estão localizados em uma mesma região do cromossomo 19 e podem estar associados à adaptação do organismo à gravidez, especialmente por induzir tolerância imunológica (Miura et al., 2010; Morales Prieto et al., 2011). Os microRNAs do nosso perfil diferencial estão localizados em diferentes cromossomos, dois deles, o miR-27a-5p e o miR-638, estão

localizados no cromossomo 19 (dados do miRBase). Embora nossos microRNAs não participem do *cluster* C19MC, sugerimos que, se diferentes microRNAs podem compor a rede de tolerância ao feto na gravidez, acreditamos que os microRNAs do nosso perfil possam participar dos mecanismos de tolerância do aloenxerto renal.

Para investigar potenciais mecanismos envolvendo microRNAs na TO, adotamos a estratégia de selecionar potenciais ações desses microRNAs do perfil diferencial TO x RC, identificando alvos experimentalmente observados, bem como, alvos altamente preditos, e levantamos hipóteses sobre novas moléculas que podem fazer parte da rede de respostas imunológicas, potencialmente envolvidas na promoção da homeostase na TO. Observamos que esses microRNAs podem ter ação sobre diversas moléculas envolvidas com as resposta imunes. A determinação das vias de sinalização também nos permitiu identificar como essas moléculas poderiam estar interagindo e de quais etapas da via de sinalização elas participam. Essa estratégia nos permitiu levantar hipóteses sobre o impacto biológico da ação dos microRNAs na TO, sobretudo a ação dos microRNAs do perfil diferencial nos mecanismos de morte celular, uma vez que, as vias de morte aparecem, predominantemente, nas nossas análises.

A primeira via que gostaríamos de destacar é a via da flavina, por ter sido a mais enriquecida das vias canônicas fornecidas pelo IPA- *Ingenuity Pathways Analysis*. Observamos que a via flavina pode sofrer regulação de dois dos microRNAs do perfil diferencial TO x RC: miR-27a e o miR-572. O miR-27a que possui menores níveis na RC quando comparados à TO e ao estado fisiológico, pode regular a expressão de RFK (do inglês, *riboflavin kinase*), sendo esta, uma enzima que catalisa a fosforilação da riboflavina (vitamina B2) para formar o FMN (do inglês, *flavin mononucleotide*). Interpretamos que, por estar diminuído na RC, o miR-27a pode favorecer a maior

expressão de RFK e, conseqüentemente, haver maior produção de FMN que é um importante precursor de FAD (do inglês, *flavin adenine dinucleotide*). Por outro lado, o miR-572 também pode regular potencialmente esta via atuando sobre FAD1 (do inglês, *flavin adenine dinucleotide synthetase*), enzima responsável por catalisar a adenilação do FMN para formar a coenzima FAD. Por estar em maiores níveis na RC, quando comparados aos da TO, o miR-572 poderia levar a uma menor expressão do FAD1 e, conseqüentemente, menor produção de FAD. Em conjunto, a soma da potencial regulação desses dois microRNAs pode levar ao acúmulo de FMN, prejudicando o desfecho da via que é a produção de FAD. O FAD é uma molécula chave que está envolvida em diversos processos metabólicos, pois funciona como uma molécula transportadora de energia metabólica, sendo utilizada como substrato na fosforilação oxidativa (Karthikeyan et al., 2003).

Devido à ampla localização e função de FMN, diversas alterações biológicas podem ocorrer em diferentes organelas, sobretudo nas mitocôndrias, local onde há maior concentração de flavoproteínas. Embora a avaliação da atividade mitocondrial do enxerto seja ainda pouco explorada e não haja dados a respeito da função mitocondrial na TO e na RC, com base nos nossos, levantamos que este pode ser um campo interessante a ser investigado. Podemos sugerir que, se a alteração na produção de FAD, via regulação dos microRNAs do perfil diferencial, pode levar a alterações nos processos de fosforilação oxidativa na RC, células que usam principalmente esse tipo de metabolismo para manutenção da sua sobrevivência, como por exemplo, células de memória e células Tregs (Michalek et al., 2011; Van de Windt et al., 2012) podem sofrer danos, como desregulação metabólica ou morte celular. Além disso, com base nos desfechos bem conhecidos de perturbação à mitocôndria, sugerimos que na RC, pode ocorrer comprometimento na via da flavina, via regulação efetuada pelos miR-27a

e miR-572, havendo mais estímulo de morte pela via intrínseca. Um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, junto ao FAD, é o citocromo c, que está envolvido nas últimas etapas da respiração celular, por meio da geração de um gradiente que armazena energia para a produção de ATP. A morte celular pela via intrínseca ocorre quando há perturbação na membrana mitocondrial interna e liberação do citocromo C (Skulachev et al., 1998). Para testar essa hipótese, seria interessante investigar, em primeiro lugar se, de fato, os alvos RFK e FAD1 podem ser regulados pelos microRNAs miR-27a e miR-572, respectivamente e, posteriormente, avaliar a expressão de FAD nas células reguladoras dos indivíduos em TO e RC, bem como a própria atividade mitocondrial.

É importante destacar que o tecido renal tem o maior conteúdo mitocondrial e consumo de oxigênio, após o coração (Pagliarini *et al* 2008; Forbes 2016). Sendo assim, o rim também pode sofrer alterações devido às possíveis perturbações à mitocôndria, via o acúmulo de FMN e consequente alteração na produção de FAD. Já foi observado que há uma relação entre a geração de ATP mitocondrial e a proteção contra lesões após a isquemia-reperfusão no rim (Tran, et al., 2016). Diante disso, podemos sugerir que uma investigação nas células de sistema imune e do enxerto renal para avaliação da atividade mitocondrial pode ser uma estratégia importante com grande potencial de intervenção terapêutica no transplante.

Outra via que gostaríamos de destacar é a via de granzimas que está relacionada à atividade citotóxica. Temos 5 dos 7 microRNAs do perfil diferencial TO x RC, com potencial atividade reguladora em diferentes alvos desta via. Destacamos o miR-27a que integra essa via, regulando alvos como a perforina e a CASP8. Por estar em menores níveis na RC comparado com a TO, esse microRNA poderia estar envolvido nos mecanismos de rejeição, intensificando a expressão e ação dessas moléculas (Perforina

e CASP8) envolvidas com morte celular. A perforina é uma molécula que facilita a entrada de granzimas no citoplasma da célula alvo e induz morte celular por vários mecanismos que podem ser dependentes ou não da ativação de caspases (Trapani et al., 2002; Voskoboinik et al., 2006). Há dados na literatura mostrando maiores números de células $CD8^+ CD28^-$ com maior expressão de perforina e granzima A, na RC, em comparação com o estado da TO e indivíduos saudáveis (Baeten et al., 2006). Em outros trabalhos já foi observado, experimentalmente, que miR-27a leva à inibição da expressão da perforina PRF1 e diminui a atividade citotóxica das células NK, no contexto tumoral (Kim et al., 2011). Diante disso, levantamos como hipótese que o miR-27a, por estar aumentado na TO, levaria à menor expressão de perforina na TO, contribuindo para maior sobrevivência celular, de outro modo, seus menores níveis na RC, quando comparado com TO, favorecendo morte celular.

O miR-27a-5p também tem como alvo a caspase 8 (CASP8). Por possuir maiores níveis na TO x RC, pode haver, mais uma vez, mais sobrevivência celular na TO e maior morte na RC, uma vez que CASP8 é classificada como uma caspase iniciadora que propaga um sinal letal em resposta à ativação via receptores de morte na membrana plasmática (Galluzzi et al., 2012). Entretanto, vale destacar que além do seu envolvimento com a morte celular, já foi observado que a CASP8 está envolvida na ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B (Stoven et al., 2003). Esse mesmo fator que está menos expresso na TO quando comparado com EST (Rebollo-Mesa et al., 2016). Os mecanismos pelos quais CASP8 leva à ativação de NF- κ B ainda não foram elucidados. CASP8 também é necessária para a iniciação do inflamassoma em macrófagos (Allam et al., 2014), e também há relatos de que ela estimula a imunidade inata ao interagir com a complexa maquinaria que regula a clivagem de CASP1 e a consequente liberação de IL-18 (Philip et al., 2014). A interleucina IL-18 tem sido

estudada como potencial biomarcador capaz de prever a função retardada do enxerto (DGF) após transplante renal (Hallet al., 2010). Também é importante citar que CASP8 não só exerce funções Inflama, como citado acima, mas também tem papel do tipo Regula. CASP8 inibe (em vez de promover) a ativação dependente de RIPK3, em células dendríticas de camundongo (Kang et al., 2013), essa molécula que, como citaremos mais adiante, é parte da via de receptor de morte por necroptose. Essa dualidade de efeitos Regula e Inflama reflete um papel multifuncional de CASP8 nos diferentes tipos de células e estímulos. Diante disso, a CASP8, potencialmente diminuída na TO, pode levar a diferentes desfechos funcionais. Nós, no entanto, enfatizamos seu papel mais bem conhecido que é o na morte celular. Com base na via de granzimas B, sugerimos que pode haver, na RC, mais perturbações aos mecanismos de morte celular, enquanto que na TO pode existir maior promoção de sobrevivência.

Em relação à via de receptor de morte, terceira via canônica encontrada pelo IPA em nossos resultados, podemos sugerir outros mecanismos de ação relacionados com morte celular e, potencialmente, envolvidos na TO e RC. Nesta via, 6 dos 7 microRNAs do perfil TO x RC podem regular alvos importantes e centrais nos processos de vida e morte celular. Dentro da via de receptor de morte destacaremos as mortes por apoptose (envolvendo caspases) e necrose/necroptose (envolvendo RIPK1).

A apoptose possui diferentes mecanismos de morte, um envolve caspases efetoras (via extrínseca), o outro, amplificação do sinal de morte por via mitocondrial (via intrínseca) (Garofalo et al., 2009). Na apoptose, uma molécula em especial nos chama atenção, o BCL2, que é um importante fator anti-apoptótico na via intrínseca. É interessante destacar que dois dos nossos microRNAs, miR-1260a e miR-27a-5p, podem regular o BCL2. O mecanismo de ação do BCL2 se dá, principalmente, por

inibição das proteínas pró-apoptóticas como BAX (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e BAK (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) que promovem a morte celular, por meio da permeabilização da membrana mitocondrial e consequente ativação da cascata de caspases (Green, 2004).

Como o miR-1260a encontram-se diminuído na TO, interpretamos que pode haver maior expressão de BCL2 no contexto da TO, favorecendo maior sobrevivência celular. Entretanto, vale destacar que os níveis de miR-27a-5p, que estão maiores na TO x RC, quando comparados com o estado fisiológico, estão menores na TO e ainda mais baixos na RC. Isso nos levou a interpretar que pode haver maior expressão dessa molécula na RC, talvez favorecendo a sobrevivência de células mais pró-inflamatórias como as de memórias e as efectoras. Em concordância com essa interpretação, há dados na literatura, mostrando maiores números de células T efectoras na RC (Baeten et al., 2005).

Como esses microRNAs (miR-27a-5p e miR-1260a) podem compartilhar o mesmo alvo que tem papel na sobrevivência celular, é possível que o saldo dos efeitos da regulação de determinadas moléculas-chave, como o BCL2, seja determinante no desfecho de morte celular. Esse dado nos mostra a complexa atividade dos microRNAs, que embora participem de um mesmo perfil diferencial, podem ter efeitos múltiplos e distintos, com base nos seus níveis ou expressão na célula. Podemos observar que há uma complexa rede de interações moleculares que parece manter um ajuste fino nos mecanismos celulares que levam aos desfechos de morte e manutenção da vida celular na TO e RC.

Conforme apontamos, uma característica diferencial na TO é a capacidade de manter os números de células T e B reguladoras, como nos indivíduos saudáveis, em contraste com os indivíduos com RC que têm menores números de células reguladoras

(Braudeau et al., 2007; Moraes-Vieira et al 2012; Hernandez et al., 2012). Essas células têm um papel importante na regulação negativa de processos inflamatórios. As Tregs, por exemplo, têm sido amplamente investigadas no contexto de transplante, e sua presença no enxerto (Tregs FOXP3+) tem sido associada com um melhor prognóstico do transplante renal (Bestard et al., 2008; Bestard et al., 2011) e melhor função do enxerto, dois anos após o transplante (Bestard et al., 2008). Na TO, a capacidade de manter os números das Tregs pode ser um dos mecanismos de tolerância ao enxerto. Levantamos algumas hipóteses a respeito das causas que podem estar levando à perda de Tregs na RC e sua possível manutenção na TO.

Uma hipótese se baseia nos dados, ainda *in silico*, do presente estudo, apontando uma potencial participação de microRNAs. Muitos dos microRNAs identificados no perfil diferencial TO x RC podem regular a morte celular. Assim, eles poderiam ter um papel relevante regulando a morte de diversas células sanguíneas, inclusive das Tregs, favorecendo sobrevida na TO e morte na RC. Testar se há alterações na expressão de BCL2 na TO x RC em células Tregs, por exemplo, poderia nos ajudar a investigar se a diminuição nos números de células T e B reguladoras circulantes, na RC, pode ser decorrente de uma disfunção da preservação nessas células, via menor expressão de moléculas antiapoptóticas. Determinar quais os mecanismos importantes envolvidos na perda de células reguladoras, podem nos ajudar a desenvolver estratégias de auto renovação celular que possam ajudar a prolongar o tempo de meia vida de células reguladoras circulantes e também teciduais. Nesse sentido, vale destacar que o gene BCL2 pode ser mais expresso em células de memória, repercutindo na sua maior sobrevivência celular (Rosenblum et al., 2016; Mueller et al., 2016). Uma outra hipótese não excludente, envolvendo a perda do número de células Tregs, na rejeição crônica, se baseia nos efeitos das drogas imunossupressoras, sobretudo as inibidoras de

calcineurina que na RC podem levar à diminuição de Tregs por mecanismos que ainda estão sendo elucidados (Gao et al., 2007). Por outro lado, sabe-se que os inibidores de mTOR, como o everolimus, ajudam na proliferação de Tregs (Gao et al., 2007; Kogina et al., 2009). No entanto, este efeito favorável dos inibidores de mTOR é improvável em nosso estudo, porque apenas 2 indivíduos usaram esses imunossupressores, um no grupo RC e outro no grupo TO (Apêndice A).

Sabe-se, hoje, que microRNAs têm envolvimento no desenvolvimento de células Tregs (Cobb et al., 2006). Estudos iniciais sugeriram que os miRNAs teriam um papel predominantemente tolerogênico nas células T, uma vez que as células T CD4⁺ que carecem de miRNAs têm um potencial diminuído para se diferenciar em células Tregs induzidas, *in vitro* (Cobb et al., 2006; Baumjohann et al., 2013). Como as células Tregs têm seu perfil metabólico semelhante ao de células de memória (Pollizzi et al., 2014; Ghesquière et al., 2014), elas têm a capacidade de manter sua longevidade. Entretanto, ainda não se sabe se o prolongamento do seu tempo de vida, pode ser restabelecido ou mantido por ação de microRNAs. Desenvolver estratégias para o controle dos mecanismos de morte das Tregs é fundamental para controlar sua sobrevivência, em contextos onde a sua ausência ou deficiência está envolvida em processo patológico, como em doenças autoimunes e microambientes excessivamente inflamatórios, como no transplante. Após validação das hipóteses, aqui discutidas, sobre as potenciais ações dos nossos microRNAs na via de morte celular, sugerimos que os microRNAs poderiam ser utilizados como ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para a promoção da sobrevivência celular, via estimulação de genes como BCL2 ou controlando a morte celular, via regulação negativa de caspases. Entretanto, esse controle precisaria ser feito de maneira específica nas células que mais sofrem com o processo de morte celular. Uma possibilidade poderia ser a

aplicação de microRNAs envolvidos com atividade anti-apoptótica ou via inoculação de células com perfil imunorregulador, tratadas com tais microRNAs em alguns sítios do enxerto.

Na via de receptor de morte, o miR-1260a e o miR-27a-5p também regulam outro alvo em comum, o TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*). Essa citocina, assim como o TL1/TNFS15 (do inglês, *TNF superfamily member 15*), pode ter um papel importante na ativação de NF-kappaB (Tracey et al., 2008). Sabe-se que a ligação de TNF- α ao seu receptor TNFR1 induz a expressão de uma variedade de mediadores inflamatórios, por meio da ativação dos fatores de transcrição e do fator nuclear NF- κ B (Tracey et al., 2008). Por outro lado, a ativação de NF- κ B também induz reguladores negativos do apoptose, tais como o próprio BCL2 (Garofalo et 2009; Catz et al., 2001). Como temos os níveis do miR-1260a menores na TO, quando comprado com RC, interpretamos que pode existir maior estímulo para ativação da via NF- κ B, na TO podendo favorecer maior expressão de genes inflamatórios e de sobrevivência celular, uma vez que esta é uma via canônica (Garofalo et al., 2009; Zong et a., 1999). Não obstante, não podemos deixar de pontuar que a ativação via TNF/ NF- κ B pode ser ainda mais complexa, se considerarmos seus outros possíveis desdobramentos. Por exemplo, se a ativação de NF- κ B for inadequada, pode ocorrer indução de apoptose mediada por caspase-8, por meio da ativação de quinase amino-terminal (JNK) e vias mitocondriais (Garofalo et al., 2009).

Podemos ainda discutir que, por estar menor na TO em relação a RC, o miR-1260a pode levar a maior expressão de outras moléculas que podem favorecer morte celular, como o DAXX (do inglês, *death domain associated protein*) da via FAS/ASK1 e o MAPK, que são moléculas adaptadoras envolvidas na transdução de sinal de morte celular (Yang et al., 1997). O miR-27a-5p também pode atuar favorecendo morte

celular pois tem como potencial alvo o RIPK1 (do inglês, *receptor interacting serine/threonine kinase 1*), molécula envolvida na morte celular por necroptose, uma morte programada, mas sem ação de caspases e com desfecho pró-inflamatório (Newton et al., 2015). Como os níveis de miR-27a-5p são menores na RC do que na TO, acreditamos que neste grupo possa haver maior promoção de morte via maior expressão de RIPK1. Estudos envolvendo a ativação dessas e de outras vias de sinalização molecular poderão trazer uma melhor compreensão sobre essas diferentes possibilidades.

Na via de receptor de morte ainda temos o miR-1233 e o miR-638 que estão menores na TO em relação à RC. Os maiores níveis de miR-1233, na comparação com o estado fisiológico, têm sido apontados como um potencial biomarcador para carcinoma celular renal (Wulfken et al., 2011) e na HDCP (*hypertensive disorder complicating pregnancy*) (Zhong et al., 2015). Em nossos dados no IPA, o miR-1233 possui diversos potenciais alvos que, quando classificados em diferentes grupos funcionais, têm a maior concentração nos grupos de canais iônicos e enzimas (Figura 14). Uma das enzimas que merece destaque é a PRMT5 (do inglês, *protein arginine methyltransferase 5*) que já foi apontada como um cofator das células Tregs (Nagay et al., 2016). Em estudos ainda muito preliminares, utilizando-se inibidores de PRMT5, foi observado haver uma diminuição no número de Tregs no contexto tumoral (Nagay et al., 2016). Partindo desta observação, nós poderíamos sugerir que os níveis de miR-1233 que estão maiores na RC em relação a TO, poderiam ter papel na diminuição de PRMT5 e, com isso, promover também menor geração de Tregs. Como nos indivíduos tolerantes, os níveis de miR-1233 são semelhantes aos de indivíduos saudáveis e sabendo que os números de Treg na TO estão preservados em relação ao estado fisiológico, podemos interpretar que a perda da Tregs na RC, ou da manutenção na TO,

pode ter a participação da ação de microRNAs, inclusive do miR-1233. Na via de receptor de morte, o miR-1233 pode também ter como alvos o TL1 e o DFFB (do inglês, *DNA fragmentation factor subunit beta*). O DFFB desencadeia tanto a fragmentação do DNA como a condensação da cromatina durante a morte celular (Liu et al., 1997). Como o miR-1233 encontra-se com níveis maiores na RC, nós interpretamos que pode haver mais ação desse microRNA, limitando alguns mecanismos de morte celular, que podem estar superativados na RC.

O miR-638 também possui um pequeno número de alvos descritos, sendo boa parte deles relacionados a reguladores da transcrição (Figura 14). Na via de morte, ele regula o TNF15 e o TBK1 (do inglês, *TANK-binding kinase*) que pode levar à ativação de NF- κ B (Pomerantz et al., 1999). Como o miR-638 encontra-se em maiores níveis na RC quando comparados com aqueles na TO, ele pode diminuir a expressão desses alvos, na RC, diminuindo a força de transdução de sinal dessas moléculas para ativação de NF- κ B. Essa menor expressão de NF- κ B pode levar à menor ativação de genes pró-inflamatórios e genes de sobrevivência celular na RC, enquanto que, na TO, pode haver maior estimulação à sobrevivência celular.

Ainda dentro do nosso perfil diferencial TO x RC, detectamos o miR-331 cujos níveis são maiores na TO em relação a RC, mas preservados quando comparados com aqueles do estado fisiológico. Nossos dados, *in silico*, mostram que este microRNA regula diversos alvos envolvidos com a transdução de sinais intracelulares, como as fosfatases e quinases (Figura 14). No contexto da via de receptor de morte, o miR-331, também possui alvos, cuja expressão pode estar diminuída devido ao seu menor nível na TO em relação à RC. São eles: o TL1/TNFSF15 (TNF *superfamily member 15*), o TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*) e a caspase 9. Levantamos a hipótese de que a CASP9 pode estar menos expressa na TO, devido aos maiores níveis de miR-331 e, assim,

favorecer maior sobrevivência celular. O contrário, entretanto, pode estar ocorrendo na RC onde, devido aos menores níveis de miR-331, pode existir maior expressão de CASP9. A principal ação de CASP9 é ativar CASP3 (Li et al., 1997). Uma vez que os níveis do miR-331 na RC estão menores na RC, e esse microRNA, regula um alvo crítico no processo de morte, os efeitos podem favorecer uma maior perturbação da homeostase imunológica na RC.

Na via de receptor de morte, o miR-885 pode regular a CASP3 (caspase 3) que tem um papel central na promoção da morte celular, por estar envolvida na condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Porter et al., 1999). Portanto, interpretamos que os maiores níveis do miR-885-5p, na TO, podem culminar na menor expressão da CASP3, favorecendo maior promoção de sobrevivência celular. Selecionamos o miR-885-5p para validação de seus níveis em um número maior de sujeitos de pesquisa (Figura 26). Os níveis de miR-885-5p se mantiveram maiores na TO quando comparados com aqueles encontrados na RC, e também foram maiores quando comparado com o estado fisiológico. Nos chama atenção o fato de dois dos indivíduos tolerantes apresentarem uma expressão muito acentuada do miR-885-5p, o LTX8 e o LTX91 (Figura 26). Supondo que a principal ação deste microRNA na TO, seja a regulação da via de morte celular, por intermédio da menor expressão de CASP3, sugerimos que, nesses indivíduos, a super expressão de CASP3 pode estar associada a um maior controle da morte celular de determinadas células, contribuindo no reestabelecimento ou manutenção da homeostase imunológica. Sabe-se que constitutivamente miR-885-5p pode se ligar a CASP3 (Guan et al., 2013) e levar a sua menor expressão e consequente menor morte celular. Nós interpretamos que por estar diminuído na RC, o miR-885 pode levar ao aumento da CASP3, favorecendo a morte celular. Além de atuar na CASP3, o miR-885 regula, ainda nesta via, as moléculas RAIDD/CRADD (do inglês,

CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain -CRADD). O CRADD recruta a caspase 2 para o complexo de transdução de sinal de morte celular que inclui o receptor de morte (TNFR1A) e a quinase RIPK1/RIP (*receptor interacting serine/threonine kinase 1*), atuando assim, na promoção de morte celular (Duan et al., 1997). Acreditamos que esse microRNA pode ter papel nos mecanismos de tolerância, via a regulação da sobrevivência das células do sistema imune e do enxerto. Essa é uma área que pretendemos aprofundar a investigação.

Em resumo, observamos que os microRNAs diferencialmente detectados na TO x RC podem estar envolvidos com a regulação da morte celular, podendo ser esse, um dos mecanismos envolvidos na tolerância ao enxerto. A maioria desses microRNAs, bem como alguns de seus alvos, têm sido pouco estudados no contexto do transplante e, ainda, não há dados que mostrem seu envolvimento com os mecanismos de homeostase. Entretanto, a observação de que muitos dos genes envolvidos com a apoptose têm sítios de ligação preservados, evolutivamente, para diversos microRNAs, como é o caso de algumas caspases, indica que a regulação direta de alvos que estão envolvidos com a morte ou manutenção da vida celular é um dos mecanismos críticos utilizados na regulação da homeostase (Schickel et al., 2008). É interessante apontar que embora já tenha sido descrito um conjunto de “apoptomiRs”, microRNAs que regulam diretamente a apoptose (Schickel et al., 2008), novos microRNAs, incluindo os do perfil diferencial TO x RC deste trabalho podem, futuramente, ser integrados à lista e considerados como reguladores da apoptose. Sugerimos que é interessante explorar como determinados “apoptomiRs” atuam na regulação da resposta imune, de modo a contribuir com a tolerância imunológica.

Outra questão importante a ser discutida, diz respeito ao significado biológico de microRNAs presentes no soro e sua potencial ação dentro das células e como sinais de

alerta. Sabemos que no soro, os microRNAs são abundantes e estáveis (Chen et al., 2008). Além disso, em um dos primeiros trabalhos caracterizando os microRNAs, mostrou-se que microRNAs encontrados no soro de indivíduos saudáveis tinham os mesmos níveis de expressão dos microRNAs isolados das células sanguíneas dos mesmos indivíduos (Chen et al., 2008). Ou seja, os mesmos miRNAs, foram detectadas tanto no soro como nas células sanguíneas, sugerindo que, em condições fisiológicas, a maioria dos miRNAs séricos são derivados de células sanguíneas circulantes (Chen et al., 2008). Levando em consideração que esses microRNAs, diferencialmente detectados no soro da TO x RC, podem estar envolvidos em processos de comunicação celular, ou mesmo liberados por morte celular, podemos sugerir que eles poderiam, ao menos em parte, ter sido originados das células imunes circulantes, inclusive de células com perfil imunorregulador.

Vale salientar a possibilidade desses microRNAs serem derivados de outros tecidos, inclusive do próprio tecido renal. Sabemos que na rejeição crônica, há constante lesão tecidual devido às intensas respostas inflamatórias, e nesse processo de lesão, microRNAs podem ser liberados. No caso da liberação de microRNAs por morte celular, vemos que na apoptose, a ativação de uma complexa cascata de sinalização de caspases, sendo algumas delas reguladas pelos microRNAs do perfil diferencial TO x RC (miR-885-5p, miR-331 e miR-27a-5p), leva à indução de morte celular programada que, embora menos imunoestimulante do que o processo de necrose (Chen et al., 2010), leva à liberação do conteúdo intracelular. Sugerimos que os microRNAs envolvidos com a regulação da apoptose podem ser liberados via corpos apoptóticos. Em contraste, na necrose, a ruptura da membrana plasmática e perda do volume celular (Hotchkiss et al., 2009), pode liberar o conteúdo intracelular, incluindo microRNAs, para o meio extracelular e ativar o sistema imunológico de maneira mais inflamatória. Além da

necrose, a necroptose que se assemelha em morfologia à necrose clássica, mas que depende de uma via de sinalização mediada por quinases denominadas RIPK e RIPK3 (Weinlich et al., 2017), também tem um potencial pró-inflamatório exacerbado, devido à liberação de DAMPS, (do inglês, *Damage-associated molecular patterns*) (Kaczmarek et al., 2013), sendo assim, sua capacidade de induzir resposta inflamatória é semelhante à necrose. Embora diferentes, todas essas formas de morte celular liberam da célula algum tipo de conteúdo intracelular. Ainda não há relatos de que, microRNAs podem ser considerados “alarminas ou DAMPS”, ou seja, moléculas liberadas na morte celular que são indicativas ou estão associadas ao processo de morte da célula. Entretanto, sugerimos que, diversos órgãos e células em processo de morte, podem liberar microRNAs, sobretudo os que estão associados à morte celular, e estes podem participar dos mecanismos de comunicação celular.

Sabemos que os tipos de morte celular podem estar associados a diferentes desfechos “Regula ou Inflama”. Sabe-se que o processo de morte dependente de caspase é único na sua capacidade de induzir uma forma imunologicamente mais “silenciosa” ou imunorreguladora de morte celular, enquanto outros tipos de morte celular possuem mais propriedades pró-inflamatórias (Bröker et al., 2005; Martin et al., 2012). No entanto, podemos considerar que a morte celular, independentemente do tipo, pode ser um desfecho deletério tanto no contexto da TO como da RC, pois pode estar associado à perda do enxerto, e de diversas células do sistema imune importantes na homeostase. Não obstante, morte celular exagerada, de células com perfil mais imunorregulador, leva a perturbações na homeostase, ou disfunção do enxerto renal. A morte de células com perfil mais inflama, por outro lado, pode levar a um estado de imunodeficiência, predispondo os indivíduos a maiores chances de infecção. Assim, é importante determinar o que está ocorrendo, de forma diferencial, na TO e RC, no que diz respeito

à maior ou menor favorecimento de morte celular, nos diferentes tipos celulares com funções Regula e Inflama.

Em relação à rede de interações moleculares estabelecida com os microRNAs do perfil diferencial TO x RC, associada às moléculas envolvida nos mecanismos de rejeição, destacamos o miR-27a e sua potencial ligação ao TGFB1 (Figura 23). Sabemos que o TGF-beta pode ter papel na produção de fibrose no enxerto, contribuindo na disfunção do órgão. Por outro lado, o TGF- β também tem envolvimento em atividades imunorreguladoras, como estimulação e expansão de células T Foxp3+ com capacidade imunossupressora (Treg) (Chen et al., 2003). Os efeitos funcionais do TGF- β no contexto do transplante, dependem do tipo celular que o produz, do estímulo que leva à sua produção e do próprio contexto biológico, se na tolerância ou na rejeição. Como o miR-27a encontra-se em maiores níveis na TO do que na RC, interpretamos que pode haver mais expressão de TGF- β na RC e, talvez haja mais fibrose renal induzida por participação deste microRNA. Em um estudo sobre o potencial terapêutico dos miRNAs para controle da fibrose renal, os camundongos miR-21(-/-) tiveram menos fibrose intersticial em resposta à lesão renal, e camundongos selvagens tratados por via intraperitoneal com anti-miR-21 tiveram melhora da lesão renal e fibrose (Chau et al., 2012). Nesse estudo é discutido que, outra estratégia relevante na terapia gênica pode ser a indução da menor expressão do microRNA de interesse e, consequentemente, de seu alvo. No entanto, o desafio deste tipo de estratégia é que a sua inibição pode gerar a menor expressão de múltiplos alvos. Não obstante, a busca por um microRNA que regule um gene de interesse e que possui um baixo número de outros alvos, pode ser uma estratégia importante para a elaboração de novas terapias. Nesse sentido, vale salientar que o miR-885-5p, cujos níveis são maiores na TO, possui poucos alvos preditos, até o momento (Figura 14). Entre os alvos está a CASP3. Não se sabe se esses

microRNAs reguladores de alvos críticos à célula, em geral, possuem um número mais restrito de alvos. Porém, já foi apontado que genes envolvidos em funções comuns para todas as células têm menos microRNAs como alvo (Stark et al., 2005).

Além de genes bem estudados na imunobiologia do transplante, a rede de rejeição também mostra outras moléculas cuja função ainda não foi completamente descrita e que poderiam ter suas funções investigadas em diferentes tipos de células do sistema imunológico e do enxerto, *in vitro* e *in vivo*, são elas, PPP3R1 (*Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, beta*), PPP3R2 (*Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, beta*) e LY6E (*Lymphocyte Antigen 6 Family Member E*). Sabemos que a validação da função de novos genes é importante, uma vez que, mais de 75% da pesquisa de proteína ainda se concentra nas 10% das proteínas já conhecidas antes do genoma ser mapeado (Edwards et al., 2011). É possível que alguns desses “novos genes” estejam envolvidos nos mecanismos relevantes de manutenção da TO.

Incluímos, em nosso estudo, o grupo EST, cujos indivíduos fazem uso de doses habituais de imunossuppressores e têm boa função do enxerto. Apesar de a comparação com este grupo ser de difícil interpretação em relação à investigação de potenciais mecanismos envolvidos na TO, é interessante analisar o seu perfil imunológico, em relação à TO e à RC, uma vez que este é um grupo alvo para futuros ensaios clínicos, visando identificar pacientes como potencial para desenvolver TO e mesmo em maior risco para RC. No grupo EST não encontramos, com as análises que realizamos, microRNAs que possam servir como discriminadores de evolução para o estado de TO. No entanto, ainda estamos buscando estratégias para identificar no grupo EST, os indivíduos com perfil diferente a TO e aqueles diferentes ao perfil de RC.

Uma contribuição importante do nosso trabalho é trazer à cena a discussão sobre potenciais mecanismos epigenéticos envolvidos na tolerância ao transplante. A regulação do transcriptoma, via microRNAs, pode fazer parte dos mecanismos pelo qual o sistema imune atua na TO e RC de maneira diferencial, levando células de uma mesma subpopulação, mas de indivíduos diferentes, a responderem de forma distinta ao desafio alogeneico. Mostramos a existência de um perfil diferencial de microRNAs que regulam moléculas envolvidas no processo de morte celular e, levantamos a hipótese de que a ação desses microRNAs faz parte dos mecanismos de tolerância operacional. A regulação das vias de morte celular pode estar ocorrendo de forma desregulada nas células reguladoras e nas células do enxerto na RC, favorecendo morte celular enquanto que na TO pode haver maior homeostase nos processos de morte celular. Pensamos que a compreensão dos mecanismos envolvidos com a manutenção da sobrevivência celular, na TO, principalmente das células T e B reguladoras, poderá contribuir para a elaboração de novas estratégias terapêuticas, que favoreçam a modulação da resposta imune na direção da tolerância operacional, via o controle específico dos genes envolvidos com a sobrevivência dessas células com atividade imunorreguladora e do órgão transplantado.

Nas últimas décadas, temos visto grande esforço da comunidade científica em estudar a epigenética e elucidar formas como esta pode estar envolvida com a regulação de respostas imunológicas. Tem sido observado que “encontros” com antígenos podem alterar a expressão gênica em células do sistema imune, por diferentes mecanismos epigenéticos (Busslinger et al., 2014), como por exemplo, por meio do remodelamento da cromatina (Medzhitov et al., 2009). Essa diferença nos padrões de expressão gênica, leva a respostas imunológicas, funcionalmente distintas e adaptações biológicas a este novo contexto, fisiológico ou patológico. Considerando que esses encontros são de

natureza diversa – sejam eles autólogos, heterólogos, patogênicos ou não - e ocorrem de forma contínua, pensamos que a epigenética pode fazer parte dos mecanismos mais complexos envolvendo a resposta inflamatória e a imunorregulação, ajudando o organismo a construir e manter um estado de homeostase. Diante de um novo desafio imunológico, os “ajustes finos” envolvidos na manutenção da homeostase, podem exigir adaptações pontuais e rápidas, ou mais duradouras, controlando respostas inflamatórias exacerbadas e ou impactando nas “decisões” do organismo, em relação a acionar ativação ou inativação de mecanismos imunorreguladores locais e sistêmicos.

6. CONCLUSÕES

1. A existência de um perfil diferencial nos níveis séricos de microRNAs na tolerância operacional, em relação ao seu desfecho clínico oposto, rejeição crônica, sugere que os microRNAs podem participar dos mecanismos envolvidos no estado de tolerância imunológica no transplante humano.
2. O perfil diferencial nos níveis de 7 microRNAs (miR-885-5p, miR-27a, miR-331, miR-1233-3p, miR-572, miR-1260a e miR-638) se deu, principalmente, por alterações na rejeição crônica (6 de 7 com níveis alterados) e preservação na tolerância operacional (5 de 7 com níveis preservados), em relação aos níveis fisiológicos, sugerindo que a capacidade de manter níveis fisiológicos desses microRNAs pode ser relevante nos mecanismos da tolerância operacional.
3. Os microRNAs do perfil diferencial na tolerância operacional, apresentam, *in silico*, múltiplos potenciais alvos, presentes em diferentes tipos celulares da resposta imune e em diferentes vias de sinalização molecular, indicando uma complexa rede de potenciais ações, desses microRNAs, contribuindo nos mecanismos na tolerância operacional.
4. Os microRNAs do perfil diferencial na tolerância operacional, estão potencialmente envolvidos em diferentes vias de sinalização que, em parte, estão relacionadas à morte celular, sugerindo que regulação de vias de morte celular integra os mecanismos na tolerância operacional.
5. A validação individual confirmando os maiores níveis de miR-885-5p na TO em relação à RC e ao estado fisiológico, sugere que esse microRNA integra a rede de mecanismos de tolerância do enxerto. Considerando que CASP3 é alvo da ação do miR-885-5p, interpretamos que a expressão desta molécula da via de morte pode estar diminuída na TO, favorecendo a sobrevivência celular.
6. A complexa e dinâmica imunobiologia da tolerância ao alotransplante envolve também mecanismos epigenéticos, via controle de genes envolvidos com sobrevivência celular.

7. REFERÊNCIAS

- Abdelwahid E, Kalvelyte A, Stulpinas A, de Carvalho KAT, Guarita-Souza LC, Foldes G. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 2016;21(3):252-268. doi:10.1007/s10495-015-1203-4.
- Alex Bishop G, Bertolino PD, Bowen DG, McCaughan GW. Tolerance in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012; Feb;26(1):73-84. doi: 10.1016/j.bpg.2012.01.003.
- Alexander M, Hu R, Runtz MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun*. 2015; Jun 18;6:7321. doi: 10.1038/ncomms8321.
- Allam R, Lawlor KE, Yu EC-W, et al. Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Reports*. 2014;15(9):982-990. doi:10.15252/embr.201438463.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(6):355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-5008. doi:10.1073/pnas.1019055108.
- Ashton-Chess, J., S. Brouard and J. P. Souillou. "Is clinical tolerance realistic in the next decade?" *Transpl Int*. 2006 Jul;19(7):539-48. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2006.00339.x
- Baeten D, Louis S, Braud C, Braudeau C, Ballet C, Moizant F, Pallier A, Giral M, Brouard S, Souillou JP. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-freetolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jan;17(1):294-304. doi: 10.1681/ASN.2005020178
- Banerjee S, Xie N, Cui H, Tan Z, Yang S, Icyuz M, Abraham E, Liu G. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J Immunol*. 2013 Jun 15;190(12):6542-9. doi: 10.4049/jimmunol.1202496. Epub 2013 May 10.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. PMID: 14744438
- Bartolucci Sabrina and Piccirillo Ciriaco. Immune Regulation in Human Health and Disease. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000952.pub2. Published Online: 15 DEC 2017
- Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep;13(9):666-78. doi: 10.1038/nri3494. Epub 2013 Aug 2.
- Bektas H, Schrem H, Lehner F, Lueck R, Beker T, Musholt T, Klempnauer J. Blood Transfers Infectious Immunologic Tolerance in MHC-Incompatible Heart Transplantation in Rats. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. Volume 24, Issue 5, May 2005, Pages 614-617. DOI: 10.1016/j.healun.2004.01.016
- Belver L, de Yébenes VG, Ramiro AR. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):713-22. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.010.
- Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ Regulatory T Cells Predicts Outcome of Subclinical Rejection of Renal Allografts. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2008;19(10):2020-2026. doi:10.1681/ASN.2007111174.
- Bestard O, Cuñetti L, Cruzado JM, Lucia M, Valdez R, Olek S, Melilli E, Torras J, Grinyó JM et al. Intra-graft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are

- protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2162-72. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03633.x.
- Biggar KK, Storey KB. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *J Exp Biol*. 2015 May;218(Pt 9):1281-9. doi: 10.1242/jeb.104828.
- Bockmeyer CL, Säuberlich K, Wittig J, et al. Comparison of different normalization strategies for the analysis of glomerular microRNAs in IgA nephropathy. *Scientific Reports*. 2016;6:31992. doi:10.1038/srep31992.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Röttschke, O., & Falk, K et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1225-32. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>.
- Brain, O., Owens, B. M. J., Pichulik, T., Allan, P., Khatamzas, E., Leslie, A., et al. (2013). The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity* 39, 521–536. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.035
- Braudeau C, Racape M, Giral M, Louis S, Moreau A, Berthelot L, Heslan M, Ashton-Chess J, Souillou JP, Brouard S. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int*. 2007 Oct;20(10):845-55. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x
- Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2015. doi: 10.1681/ASN.2014050480
- Bröker LE1, Krüyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3155-62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223
- Brouard S, Pallier A, Renaudin K et al. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012; 12:3296–307. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04249.x
- Brouard, S., A. Dupont, M. Giral, S. Louis, D. Lair, C. Braudeau, N. Degauque, F. Moizant, A. Pallier, C. Ruiz, M. Guillet, D. Laplaud and J. P. Souillou. "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):330-40. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00700.x
- Brouard, S., Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A. et al., The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant*. 2012 Dec;12(12):3296-307. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04249.x.
- Busslinger M, Tarakhovsky A. Epigenetic Control of Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(6):a019307. doi:10.1101/cshperspect.a019307.
- Caillard S, F.X.Lamy, C.Quelen, J.Dantal, Y. Lebranchu, P. Lang, M.Velten and B. Moulin et al. Epidemiology of posttransplant lymphoproliferative disorders in adult kidney and kidney pancreas recipients: report of the French registry and analysis of subgroups of lymphomas. *Am J Transplant*. 2012 Mar;12(3):682-93. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03896.x.
- Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (38) (2007), pp. 15144-15149
- Chau, B. N. et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med*. 2012 Feb 15;4(121):121ra18. doi: 10.1126/scitranslmed.3003205.
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *at Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826-37. doi: 10.1038/nri2873.

- Chen W, Konkel JE. TGF- β and “Adaptive” Foxp3+ Regulatory T cells. *Journal of molecular cell biology*. 2010;2(1):30-36. doi:10.1093/jmcb/mjp004.
- Chen W., Wahl S.M. TGF-beta: the missing link in CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:85–89.PMID: 12651220
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Zhang CY et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
- Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, Le Bot S, Cadoux M, Dugast E, Giral M, Brouard S et al. Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. *Am J Transplant*. 2016 Nov 26. doi: 10.1111/ajt.14142.
- Chesneau M, Danger R, Souillou JP, Brouard S. B cells in operational tolerance. *Hum Immunol*. 2018 Feb 16. pii: S0198-8859(18)30047-8. doi: 10.1016/j.humimm.2018.02.009.
- Chuang JC1, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007 May;61(5 Pt 2):24R-29R. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180457684
- Civello A. On the genesis of the idiotypic network theory. *J Hist Biol*. 2013 Spring;46(1):125-58. doi: 10.1007/s10739-012-9346-4.
- Cobb B. S., Hertweck A., Smith J., O'Connor E., Graf D., Cook T., et al. (2006). A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med*. 203, 2519–2527 doi:10.1084/jem.20061692
- Coelho V, Kalil J. *Imunobiologia dos transplantados*. In : *Imunologia*, 2nd ed. Rio de Janeiro ; Livraria e Editora Revinter Ltda ; 2009.p241-263.
- Cohen I. Discrimination and dialogue in the immune system. *Semin Immunol*. 2000 Jun;12(3):215-9; discussion 257-344. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0234>
- Cotsapas C, Hafler DA "Immune-mediated disease genetics: the shared basis of pathogenesis". *Trends in Immunology*. (2013). 34 (1): 22-6. doi:10.1016/j.it.2012.09.001.
- Danger R, Pallier A, Giral M, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:597–606
- Daniel C, Horvath S, Allen PM. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity*. 1998 May;8(5):543-52.
- Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. mTOR differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;30(6):832-844. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.014.
- Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998 Apr;27(4):926-33. DOI: 10.1002/hep.510270406
- D'haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol*. 2012;822:261-72. doi: 10.1007/978-1-61779-427-8_18.
- Duan H, Dixit VM. "RAIDD is a new 'death' adaptor molecule". *Nature*. January 1997. 385 (6611): 86–9. doi:10.1038/385086a0.
- Dudda JC, SALAUN B, JI Y, et al. MicroRNA-155 is required for effector CD8+T cell responses to virus infection and cancer. *Immunity*. 2013;38(4):742-753. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.006.
- Eberl G. Immunity by equilibrium. *Nat Rev Immunol*. 2016 Aug;16(8):524-32. doi: 10.1038/nri.2016.75.
- Edwards AM, Isserlin R, Bader GD, Frye SV, Willson TM, Yu FH. Too many roads not taken. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):163-5. doi: 10.1038/470163a.

- Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.
- Faria A, Howard L. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:232-59. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x
- Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1998 Jun 11;338(24):1741-51. DOI: 10.1056/NEJM199806113382407
- Fong MY, Zhou W, Liu L, et al. Breast cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in pre-metastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology.* 2015;17(2):183-194. doi:10.1038/ncb3094.
- Forbes JM. Mitochondria-Power Players in Kidney Function? *Trends Endocrinol Metab.* 2016 Jul;27(7):441-2. doi: 10.1016/j.tem.2016.05.002.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation.* 2012;19(1):107-120. doi:10.1038/cdd.2011.96.
- Gao W, Lu Y, Essawy BE, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting Effects of Cyclosporine and Rapamycin in De Novo Generation of Alloantigen-Specific Regulatory T Cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2007;7(7):10.1111/j.1600-6143.2007.01842.x. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01842.x.
- Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 200–208; doi:10.1038/cdd.2009.105
- Germain RN. Maintaining system homeostasis - the third law of Newtonian immunology. *Nature immunology.* 2012;13(10):902-906. doi:10.1038/ni.2404.
- Ghesquière B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature.* 2014 Jul 10;511(7508):167-76. doi: 10.1038/nature13312. Review
- Gong D, Gong X2, Wang L1, Yu X1, Dong Q1. Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:6951091. doi: 10.1155/2016/6951091.
- Gonzalez-Martin A, Adams BD, Lai M, et al. The microRNA miR-148a functions as a critical regulator of B cell tolerance and autoimmunity. *Nature immunology.* 2016;17(4):433-440. doi:10.1038/ni.3385.
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004 Jul 30;305(5684):626-9. DOI: 10.1126/science.1099320
- Guan X, Liu Z, Liu H, et al. A functional variant at the miR-885-5p binding site of CASP3 confers risk of both index and second primary malignancies in patients with head and neck cancer. *The FASEB Journal.* 2013;27(4):1404-1412. doi:10.1096/fj.12-223420.
- Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Sep;9(9):513-21. doi: 10.1038/nrendo.2013.86.
- Haas M, SisB, Racusen L C, Solez K, Glotz D, Colvin R B, Castro M C R, David D S R, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2):272-83. doi: 10.1111/ajt.12590.
- Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, et al. IL-18 and Urinary NGAL Predict Dialysis and Graft Recovery after Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2010;21(1):189-197. doi:10.1681/ASN.2009030264.
- Harton JA, Ting JP-Y. Class II Transactivator: Mastering the Art of Major Histocompatibility Complex Expression. *Molecular and Cellular Biology.* 2000;20(17):6185-6194. PMID: PMC86093

- Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. A 'biomarker signature' for tolerance in transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 6(10):606-13, 2010. DOI: 10.1038/nrneph.2010.112
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." *J Immunol* 173(8): 4828-4837. PMID: 15470023
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*. 1999 Feb 11;397(6719):530-4. DOI: 10.1038/17401
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England journal of medicine*. 2009;361(16):1570-1583. doi:10.1056/NEJMra0901217.
- Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*. 2010;25(1):61-74. doi:10.1007/s00467-008-1020-x.
- Janssen HL1, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Patel K, van der Meer AJ, Hodges MR et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013 May 2;368(18):1685-94. doi: 10.1056/NEJMoa1209026.
- Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*. 1974 Jan;125C(1-2):373-89.
- Jiménez-Pérez M, González-Grande R, Omonte Guzmán E, Amo Trillo V, Rodrigo López JM. Metabolic complications in liver transplant recipients. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(28):6416-6423. doi:10.3748/wjg.v22.i28.6416.
- Kaczmarek A1, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):209-23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.
- Kang TB1, Yang SH, Toth B, Kovalenko A, Wallach D. Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*. 2013 Jan 24;38(1):27-40. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.015.
- Karthikeyan S., Zhou Q., Mseeh F., Grishin N. V., Osterman A. L., Zhang H. Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a β barrel fold and a novel active site arch. *Structure*. 2003 Mar;11(3):265-73.
- Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, et al. HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression. *The New England journal of medicine*. 2008;358(4):353-361. doi:10.1056/NEJMoa071074.
- Kim T-D, Lee SU, Yun S, et al. Human microRNA-27a* targets Prf1 and GzmB expression to regulate NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2011;118(20):5476-5486. doi:10.1182/blood-2011-04-347526.
- Kim, V.N. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005. 6:376–385. DOI: 10.1038/nrm1644
- Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(6):377-391. doi:10.1038/nri3667.
- Kogina K1, Shoda H, Yamaguchi Y, Tsuno NH, Takahashi K, Fujio K, Yamamoto K. Tacrolimus differentially regulates the proliferation of conventional and regulatory CD4(+) T cells. *Mol Cells*. 2009 Aug 31;28(2):125-30. doi: 10.1007/s10059-009-0114-z.
- Koshiba T, Li Y, Takemura M, et al. Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007; 17: 94. DOI: 10.1016/j.trim.2006.10.004

- Kroesen BJ, Teteloshvili N, Smigielska-Czepiel K, Brouwer E, Boots AM, van den Berg A, Kluiver J. Immuno-miRs: critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology*. 2015 Jan;144(1):1-10. doi: 10.1111/imm.12367.
- Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif)*. 2010;50(4):298-301. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.032.
- Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*. 1996 May 30;381(6581):434-8. DOI: 10.1038/381434a0
- Le J, Durand CM, Agha I, Brennan DC. Epstein Barr virus and renal transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017 Jan;31(1):55-60. doi: 10.1016/j.trre.2016.12.001.
- Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med*. 1982 Jan 1;155(1):31-41.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen, F. H. Bach. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today*. 1990 Mar;11(3):83-8.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Li L, Wozniak LJ, Rodder S, Heish S, Talisetti A, Wang Q, Esquivel C, Cox K, Chen R, McDiarmid SV, Sarwal MM. A common peripheral blood gene set for diagnosis of operational tolerance in pediatric and adult liver transplantation. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1218-28. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03928.x.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):479-89.
- Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Klein LO, Davis MM, Chen CZ et al. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. Volume 129, Issue 1, 6 April 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.008
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. "DFF a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis". *Cell*. April 1997. 89 (2): 175–84. doi:10.1016/S0092-8674(00)80197-X.
- Louis A, Matis, Simona B. Sorger, David L. McElligott†, Pamela J. Fink, Stephen M. Hedrick. The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones. Volume 51, Issue 1, 9 October 1987, Pages 59–69
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, Moreau A, Souillou JP, Brouard S. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drugfree tolerance. *Transplantation*. 81(3):398-407, 2006. doi: 10.1097/01.tp.0000203166.44968.86
- Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(1):28-41. doi:10.1111/ajt.14107.
- Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M, Danger R, López M, Giral M, et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am J Transplant*. 2011 Sep;11(9):1916-26. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x.
- Lu L-F, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 2010;142(6):914-929. doi:10.1016/j.cell.2010.08.012.

- Marino IR, Doyle HR, Aldrighetti L, et al. Effect of Donor Age and Sex on the Outcome of Liver Transplantation. *Hepatology*. 1995 Dec;22(6):1754-62.
- Martin SJ, Henry CM, Cullen SP. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol Cell*. 2012 May 25;46(4):387-97. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.026.
- Massart A, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D. Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers. *Clin Exp Immunol*. 2017 Aug;189(2):138-157. doi: 10.1111/cei.12981.
- Massart A, Pallier A, Pascual J, Viklicky O, Budde K, Spasovski G, Klinger M, et al. The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2016. 31: 1002–1013.
- Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):692-703. doi: 10.1038/nri2634.
- Mehta A, Mann M, Zhao JL, Marinov GK, Majumdar D, Chowdhury K, Baltimore D, et al. The microRNA 212/132 cluster regulates B cell development by targeting Sox4. *J Exp Med*. 2015 Sep 21;212(10):1679-92. doi: 10.1084/jem.20150489. Epub 2015 Sep 14.
- Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4⁺ T Cell Subsets. *J Immunol*. 2011 Mar 15;186(6):3299-303. doi: 10.4049/jimmunol.1003613.
- Min S L, Li M, Zhang Y, Zhang X, Liang Y, Xie Q, He Q, Li Y, Sun J, Qiu L, Xiang Y, Zhang Y, Che R, Yang T. TGF- β -associated miR-27a inhibits dendritic cell-mediated differentiation of Th1 and Th17 cells by TAB3, p38 MAPK, MAP2K4 and MAP2K7. *Genes Immun*. 2012 Dec;13(8):621-31. doi: 10.1038/gene.2012.45. Epub 2012 Oct 4.
- Mittelbrunn M, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282. doi: 10.1038/ncomms1285.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1767-71. doi: 10.1373/clinchem.2010.147660.
- Montecalvo A, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766 (2012).
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Moraes-Vieira P, M., H. M. Silva, M. C. Takenaka, S. M. Monteiro, F. Lemos, D. Saitovitch, J. Kalil and V. Coelho. "Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals." *Hum Immunol*. 2010 May;71(5):442-50. doi: 10.1016/j.humimm.2010.01.022.
- Moraes-Vieira P, M., M. C. Takenaka, H. M. Silva, S. M. Monteiro, F. Agena, F. Lemos, D. Saitovitch, J. Kalil and V. Coelho. "GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation." *Clin Immunol*. 2012 Feb;142(2):117-26. doi: 10.1016/j.clim.2011.08.015.
- Morales Prieto DM, Markert UR. MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2):106-11. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.004.
- Moreau A, Valey E, Anegón I, Cuturi M-C. Effector Mechanisms of Rejection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013;3(11):a015461. doi:10.1101/cshperspect.a015461.

- Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):79-89. doi: 10.1038/nri.2015.3.
- Nagai., Yasuhiro, Mei Ji, Yan Xiao, Hongtao Zhang, Bin Li, Takuya Ohtani and Mark I Greene. PRMT5 is a novel cofactor of Foxp3 and can be a target for tumor immunotherapy. *J Immunol* May 1, 2016, 196 (1 Supplement) 211.7
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(6):1836-1847. doi:10.1172/JCI39933.
- Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol.* 2015 Jun;25(6):347-53. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.001.
- Ng YH, Rome S, Jalabert A, et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. Ward WS, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58502. doi:10.1371/journal.pone.0058502.
- Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 1994 Oct;6(5):757-64.
- Nova-Lamperti E, Chana P, Mobillo P, et al. Increased CD40 ligation and reduced BCR signalling leads to higher IL-10 production in B-cells from tolerant kidney transplant patients. *Transplantation.* 2017;101(3):541-547. doi:10.1097/TP.0000000000001341.
- Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, Hosenpud JD. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999 May;18(5):425-31.
- O’Gorman W. E., Dooks H., Thorne S. H., Kuswanto W. F., Simonds E. F., Krutzik P. O., Nolan G. P., Abbas A. K. (2009). The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J. Immunol.* 183, 332–339. doi:10.1093/jimmunol.183.2.332
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* 2008;134(1):112-123. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racape, M., Degauque, N., et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010;78(5):503-13.
- Philip NH, Dillon CP, Snyder AG, et al. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- κ B and MAPK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(20):7385-7390. doi:10.1073/pnas.1403252111.
- Pollizzi KN, Powell JD. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):435-46. doi: 10.1038/nri3701.
- Pomerantz JL, Baltimore D. Ativação de NF-kappaB por um complexo de sinalização contendo TRAF2, TANK e TBK1, uma nova quinase relacionada à IKK. *O Jornal EMBO.* 1999; 18 (23): 6694-6704. doi: 10.1093 / emboj / 18.23.6694.
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999 Feb;6(2):99-104.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55(2):713-23.
- Rebollo-Mesa I, Nova-Lamperti E, Mobillo P, et al. Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *American Journal of Transplantation.* 2016;16(12):3443-3457. doi:10.1111/ajt.13932.

- Revilla-Nuin B, de Bejar A, Martínez-Alarcón L, Herrero JI, Baroja-Mazo A, Pons JA, et al. Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2016 Dec 22. doi: 10.1002/lt.24691.
- Roberts TC, Coenen-Stass AML, Wood MJA. Assessment of RT-qPCR Normalization Strategies for Accurate Quantification of Extracellular microRNAs in Murine Serum. Mukhopadhyay P, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89237. doi:10.1371/journal.pone.0089237.
- Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev.* 2003;196:51-64.
- Rose NR, Bona C "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)". *Immunol Today*. 1993 Sep;14(9):426-30. doi:10.1016/0167-5699(93)90244-F.
- Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):90-101. doi:10.1038/nri.2015.1.
- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J.-F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S. and Souillou, J.-P. Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):736-46.DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01280.x
- Runtsch MC, Hu R, Alexander M, Wallace J, Kagele D, Petersen C, Valentine JF, Welker NC, Bronner MP, Chen X, Smith DP, Ajami NJ, Petrosino JF, Round JL, O'Connell RM. MicroRNA-146a constrains multiple parameters of intestinal immunity and increases susceptibility to DSS colitis. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):28556-72. DOI: 10.18632/oncotarget.5597
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(6):1848-1861. doi:10.1172/JCI39922.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. "Regulatory T cells and immune tolerance". *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. 22:531-62.
- Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 2000;101(2):169-177. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.
- Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5959-74. doi: 10.1038/onc.2008.274.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
- Shoskes, D. A., K. J. Wood. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol. Today* 15:32.DOI: 10.1016/0167-5699(94)90023-X
- Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, Mantovani A. et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):762-7.
- Silva HM, Takenaka MCS, Moraes-Vieira PMM, et al. Preserving the B-Cell Compartment Favors Operational Tolerance in Human Renal Transplantation. *Molecular Medicine*. 2012;18(1):733-743. doi:10.2119/molmed.2011.00281.
- Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades.*FEBS Lett.* 1998 Feb 27;423(3):275-80. doi:10.1016/S0014-5793(98)00061-1
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft

- nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007;7(3):518-26.DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x
- Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell.* 2005 Dec 16;123(6):1133-46.DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.023
- Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet.* 1992 Oct 10;340(8824):876-7.
- Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, et al. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity.* 2011;35(2):169-181. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.009.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040
- Stöven S, Silverman N, Junell A, et al. Caspase-mediated processing of the Drosophila NF- κ B factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(10):5991-5996. doi:10.1073/pnas.1035902100.
- Strober S, Dhillon M, Schubert M, Holm B, Engleman E, Benike C, Hoppe R, Sibley R, Myburgh JA, Collins G, et al. Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med.* 1989 Jul 6;321(1):28-33 DOI: 10.1056/NEJM198907063210106
- Takahashi H, Kanno T, Nakayamada S, et al. TGF- β and retinoic acid induce miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains helper T cell plasticity. *Nature immunology.* 2012;13(6):587-595. doi:10.1038/ni.2286.
- Tay SS, Plain KM, Bispo GA. Papel das respostas de IL-4 e Th2 na rejeição e tolerância do aloenxerto. *Curr Opin Transplante de órgãos.* 2009 Feb; 14 (1): 16-22. doi: 10.1097 / MOT.0b013e32831ebdf5.
- Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F. The HL-A system: evidence of a third sub-locus. *Scand J Haematol.* 1970;7(3):195-200.
- Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, Düber S, Geffers R, Huehn J et al. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J Immunol.* 2013 Apr 1;190(7):3180-8. doi: 10.4049/jimmunol.1203473.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008 Feb;117(2):244-79.
- Tran MT, Zsengeller ZK, Berg AH, et al. PGC1 α -dependent NAD biosynthesis links oxidative metabolism to renal protection. *Nature.* 2016;531(7595):528-532. doi:10.1038/nature17184.
- Trapani JA1, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):735-47.DOI: 10.1038/nri911
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011 Sep 1;39(16):7223-33. doi: 10.1093/nar/gkr254.
- Van der Windt GJW, Everts B, Chang C-H, et al. Mitochondrial Respiratory Capacity Is A Critical Regulator Of CD8+ T Cell Memory Development. *Immunity.* 2012;36(1):68-78. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.007.
- Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 940–952. DOI: 10.1038/nri1983
- Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to Transplant Tolerance versus Rejection: The Role of Cytokines. *Immunity.* 2004;20(2):121-131.

- Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Feb;18(2):127-136. doi: 10.1038/nrm.2016.149.
- Wong C. H., Song C., Heng K. S., Kee I. H., Tien S. L., Kumarasinghe P., et al. (2006). Plasma free hemoglobin: a novel diagnostic test for assessment of the depth of burn injury. *Plast. Reconstr. Surg.* 117 1206–1213
- Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Ellinger J et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One.* 2011;6(9):e25787. doi: 10.1371/journal.pone.0025787.
- Yang L, Boldin MP, Yu Y, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *The Journal of Experimental Medicine.* 2012;209(9):1655-1670. doi:10.1084/jem.20112218.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis. *Cell.* 1997;89(7):1067-1076.
- Yao R, Ma YL, Liang W, Li HH, Ma ZJ, Yu X, Liao YH. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One.* 2012;7(10):e46082. doi: 10.1371/journal.pone.0046082.
- Zernecke, A. et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009 Dec 8;2(100):ra81. doi: 10.1126/scisignal.2000610.
- Zhong W, Peng H, Tian A, et al. Expression of miRNA-1233 in placenta from patients with hypertensive disorder complicating pregnancy and its role in disease pathogenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2015;8(6):9121-9127.
- Zhu E, Wang X, Zheng B, Wang Q, Hao J, Chen S, Zhao Q, Zhao L, Wu Z, Yin Z. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J Immunol.* 2014 Jun 15;192(12):5599-609. doi: 10.4049/jimmunol.1303488.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 382–387.

8. APÊNDICE

APÊNDICE A- Dados demográficos e clínicos

Tabela 16: Dados demográficos e clínicos

Sujeitos de pesquisa	TO LTX3	TO LTX8	TO LTX10	TO LTX16	TO LTX62	TO LTX75	TO LTX90	TO LTX91	RC (n = 12)	SAU (n = 12)	Valor de p TO x RC	Valor de p TO x SAU
Idade (anos)	55	42	42	48	32	37	31	57	45 (28-59)	45 (29-61)	p=0.674 ²	p=0.633 ²
Sexo (F, M)	M	M	F	F	M	M	F	M	F=2;M=10	F=6;M=6	p=0.347 ¹	p=0.669 ¹
Número de transplante	1	2	2	1	1	2	1	1	1 (n=2) 2 (n=10)	NA	p=0.668 ²	NA
Tempo de Transplante (anos)	27	5	12	28	17	6	11	31	7 (1-13)	NA	p=0.018* ² > na TO	NA
HLA (A, B, DR) disparidade	3	4	0	0	3	1	1	6	6 (n=4); 5 (n=3); 3 (n=4); 1 (n=1)	NA	p=0.012* ² < na TO	NA
Doador (vivo/morto)	Vivo	Falecido	Vivo	Vivo	Vivo	Falecido	Vivo	Vivo	Vivo (n=4) Falecido (n=8)	NA	p=0.169 ¹	NA
Creatinina	1,15	1,62	0,89	0,74	1,71	1,1	1,4	1,3	1,93 (1,3-4,4)	NA	p=0.014* ³ < na TO	NA
Livre de imunossupressor (anos)	7	2	2	8	4	4	2	30	NA	NA	NA	NA

Legenda: As variáveis contínuas foram analisadas inicialmente pelo teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.¹Teste Qui-quadrado; ²Teste T; ³Mann-Whitney. Os dados numéricos são representados como média. O valor mínimo e máximo da idade de cada grupo, tempo de transplante, número de disparidade, tipo de doador e creatinina é mostrado em parênteses. O * indica um p <0,005. NA= Não se aplica. F= Feminino. M= Masculino. Os dados fornecidos são referentes a data de coletas das amostras.

APÊNDICE A- Dados demográficos e clínicos (Individual)

TABELA 17. Dados clínicos e demográficos TO

GRUPO	PACIENTES	SEXO	IDADE (Anos)	ORIGEM ENXERTO	DOENÇA BASE	Nº DE TX	TX* TEMPO - ANOS	TX* TEMPO - (SEM IS)	IS	DISPARIDAD E HLA	CREATININA SÉRICA
TO	LTX03	M	55	Vivo	Glomerulonefrite membrano proliferativa	1	27	6	Pred, Aza	3	1,15
	LTX08	M	42	Falecido	Glomerulonefrite crônica	2	7	2	Pred; Tacro, MMF	4	1,62
	LTX10	F	42	Vivo	Nefropatia diabética	2	12	2	Cia, Aza, Pred	identico	0,89
	LTX16	F	48	Vivo	Glomerulonefrite crônica	1	28	8	Pred, Aza	identico	0,74
	LTX62	M	32	Vivo	Glomerulonefrite esclerose segmentar focal	1	17	4	Cia, Aza, Pred	3	1,71
	LTX75	M	37	Falecido	-	2	6	4	Tacr, Pred MMF, Eve	1	1,1
	LTX90	F	31	Vivo	-	1	11	4	Tacro,MPS, Pred	1	1,4
	LTX91	M	57	Vivo	Nefroesclerose Hipertensiva	1	31	30	Pred, Aza	6	1,3

F= Feminino. M= Masculino. Os dados fornecidos referem-se à data de coleta e inclusão da amostra em estudo Multicêntrico. IS= Imunossupressor. Pred = prednisona; Tacro = tacrolimus; MMF = micofenolato mofetil; MPS = micofenolato sódio, Cia = ciclosporina A; Aza = azatioprina, Eve= Everolimus.

APÊNDICE A- Dados demográficos e clínicos (Individual)

TABELA 18. Dados clínicos e demográficos RC

GRUPO	Indivíduos	SEXO	IDADE *	ORIGEM ENXERTO	DOENÇA BASE	Nº DE TX	TX* TEMPO - ANOS	DISPARIDADE HLA	IS	CREATININA SÉRICA
RC	LTX04	M	51	Falecido	Glomerulonefrite crônica	1	9	6	Pred; MMF	1,39
	LTX05	M	40	Falecido	Glomerulonefrite crônica	1	13	6	Micofenolato sódico Pred	1,41
	LTX07	M	59	Falecido	Insuficiência Renal sem causa definida	1	7	6	Pred, MPS, Tacro	1,67
	LTX32	M	28	Falecido	Nefropatia de Refluxo	1	11	4	Pred, MPS, Tacro	1,34
	LTX79	M	50	Vivo	Renal Policística	1	2	5	Everolimus, Tacro	1,4
	LTX24	M	21	Falecido	Insuficiência Renal sem causa definida	1	5	5	Pred, MPS, Tacro	1,81
	LTX25	M	51	Falecido	Glomerulonefrite crônica	1	12	6	Ciclo, Aza, Pred	2,26
	LTX26	M	55	Vivo	Nefroesclerose hipertensiva	1	2	5	Pred, MPS, Tacro	1,61
	LTX67	F	41	Vivo	Glomerulonefrite crônica	2	13	1	Pred, MPS, Tacro	2,06
	LTX80	M	42	Falecido	Hipertensão Sistêmica	2	2	5	Pred, MMF, Tacro	2,54
	LTX87	F	48	Vivo	Insuficiência Renal crônica	1	16	4	Pred,	1,3
	LTX77	M	54	Falecido	Hipertensão Sistêmica	1	1 ano e 7 meses	4	Pred, MMF, Tacro	4,4

F= Feminino. M= Masculino. Os dados fornecidos referem-se à data de coleta e inclusão da amostra em estudo Multicêntrico. IS= Imunossupressor. Pred = prednisona; Tacro = tacrolimus; MMF = micofenolato mofetil; MPS = micofenolato sódio, Cia = ciclosporina A; Aza = azatioprina, Eve= Everolimus.

APÊNDICE A- Dados demográficos e clínicos (Individual)

TABELA 19. Dados clínicos e demográficos EST

GRUPO	PACIENTES	SEXO	IDADE *	ORIGEM ENXERTO	DOENÇA BASE	Nº DE TX	TX* TEMPO - ANOS	DISPARIDADE HLA	IS	CREATININA SÉRICA
EST	LTX09	M	48	Vivo	Insuficiência renal sem causa definida	1	3	3	Pred, MMF, Tacro	0,89
	LTX11	M	59	Falecido	Nefroesclerose hipertensiva	1	4	6	Pred, MMF, Tacro	1.51
	LTX12	M	56	Falecido	Nefroesclerose hipertensiva	1	2	6	Pred, MMF, Tacro	1.15
	LTX88	M	38	Vivo	-	1	3	0	Everolimus , Tacro	1,27

F= Feminino. M= Masculino. Os dados fornecidos referem-se à data de coleta e inclusão da amostra em estudo Multicêntrico. IS= Imunossupressor. Pred = prednisona; Tacro = tacrolimus; MMF = micofenolato mofetil; MPS = micofenolato sódio, Cia = ciclosporina A; Aza = azatioprina, Eve= Everolimus.

APÊNDICE B- Exemplos das análises de detecção dos microRNAs pelo *software cloud*

APÊNDICE C- Critério de seleção das amostras

(Avaliação de hemólise)

Amostras retiradas do freezer – 80 °C.

Absorbância Nanodrop	
GRUPO	414nm
TO 03	0,005
TO 90	0,094
TO 10	0,214
TO 16	0,253
TO 91	0,133
TO 8	0,02
TO 62	0,096
TO 75	0,171
SAU 39	0,04
SAU36	0,073
SAU15	0,008
SAU40	0,190*
SAU83	0,359*
SAU 84	0,039
SAU42	0,066
EST 11	0,057
EST 12	0,174
EST 09	0,169
EST 23	0,087
EST 88	0,083
RC 04	0,228
RC 05	0,073
RC 07	0,075
RC 79	0,035
RC 32	0,071
RC77	0,330*
RC87	0,265*

* Excluídos

Amostras Selecionadas para o Screening -

Pacientes Selecionados 1° Screening			
TO 03	SAU 15	EST 11	RC 04
TO 08	SAU36	EST 12	RC 05
TO 10	SAU39	EST 09	RC 07
TO 16	SAU42	EST 23	RC 79
TO 62	SAU84	EST 88	RC 32
TO 75			
TO 90			
TO 91			

APÊNDICE C- Critério de seleção das amostras

Resultado da Quantificação de RNA total

Absorbância Nanodrop		
GRUPO	(ng/μl)	260/280
TO 03	96,5	1,44
TO 08	53,3	1,44
TO 10	24,7	1,42
TO 16	26,7	1,33
TO 62	50,3	1,54
TO 75	21,1	1,54
TO 90	25,7	1,17
TO 91	8,5	1,54
SAU 15	60,3	1,3
SAU36	12,5	1,58
SAU39	8,4	1,6
SAU42	17,8	1,22
SAU84	15,7	1,59
EST 11	25	1,08
EST 12	7,09	1,56
EST 09	7,4	1,6
EST 23	4,0*	1,37
EST 88	12,7	1,68
RC 04	11,6	1,62
RC 05	20,5	1,14

APÊNDICE D – Lista de microRNAs amplificados

miRNAs	hsa-miR-383	hsa-miR-1300	hsa-miR-106b
hsa-let-7a	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-1303	hsa-miR-340
hsa-miR-95	hsa-miR-221	hsa-miR-132a	hsa-miR-5905p
hsa-miR-130a	hsa-miR-551b*	hsa-miR-1403p	hsa-miR-595
hsa-miR-148a	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-141#	hsa-miR-596
hsa-miR-222	hsa-miR-573	hsa-miR-1423p	hsa-miR-625#
hsa-miR-335	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-1425p	hsa-miR-645
hsa-miR-208	Mamm U6	hsa-miR-135	hsa-miR-920
hsa-miR-141*	RNU44	hsa-miR-144	hsa-miR-454
hsa-miR-942	RNU48	hsa-miR-145	hsa-miR-487
hsa-miR-601	hsa-miR-202	hsa-miR-146b	hsa-miR-489
hsa-miR-605	hsa-miR-345	hsa-miR-148a#	hsa-miR-1183
hsa-let-7c	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-1513p	hsa-miR-1255
hsa-miR-130b	hsa-miR-519a	hsa-miR-1515p	hsa-miR-126
hsa-miR-148b	hsa-miR-548c	hsa-miR-15b	hsa-miR-1298
hsa-miR-223	hsa-miR-625*	hsa-miR-1825	hsa-miR-136
hsa-miR-375	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-186	hsa-miR-15 ^a
hsa-miR-211	hsa-miR-346	hsa-miR-191#	hsa-miR-18 ^a
hsa-miR-10b*	hsa-miR-106b	hsa-miR-191	hsa-miR-190b
hsa-let-7f-1*	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-193a5b	hsa-miR-193a3p
hsa-let-7d	hsa-miR-183	hsa-miR-193b	hsa-miR-23a#
hsa-miR-24	hsa-miR-203	hsa-miR-194	hsa-miR-34 ^a
hsa-miR-132	hsa-miR-410	hsa-miR-19a	hsa-miR-34a#
hsa-miR-197	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-19b	hsa-miR-34b
hsa-miR-338-5p	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-205	hsa-miR-4220
hsa-miR-376a	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-206	hsa-miR-423-5p
hsa-miR-212	hsa-miR-627	hsa-miR-20a#	hsa-miR-23b
hsa-miR-144*	hsa-miR-376c	hsa-miR-20a	hsa-miR-573
hsa-miR-939	hsa-miR-572	hsa-miR-20b	hsa-miR-193a5p
hsa-let7e	hsa-miR-15a	hsa-miR-21#	hsa-miR-629

hsa-miR-25	hsa-miR-29a	hsa-miR-21	hsa-miR-675
hsa-miR-99a	hsa-miR-107	hsa-miR-210	hsa-miR-646
hsa-miR-150	hsa-miR-193.3p	hsa-miR-211	hsa-miR-933
hsa-miR-296	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-214	hsa-miR-224
hsa-miR-339-5p	hsa-miR-185	hsa-miR-215	hsa-miR-744
hsa-miR-339-3p	hsa-miR-204	hsa-miR-218	hsa-miR-744#
hsa-miR-454	hsa-miR-302c	hsa-miR-22#	hsa-miR-663
hsa-miR-450b5p	hsa-miR-362	hsa-miR-223#	hsa-miR-115b
hsa-miR-518d	hsa-miR-411	hsa-miR-223	hsa-miR-148b#
hsa-miR-597	hsa-miR-486	hsa-miR-24	hsa-miR-708
hsa-miR-744	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-27a#	hsa-miR-483-3p
hsa-miR-126*	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-28	hsa-miR-181a2#
hsa-miR624	hsa-miR-766	hsa-miR-2995p	hsa-miR-106*
hsa-miR-374-5p	hsa-miR-590 3p	hsa-miR-29c	hsa-miR-106b
hsa-miR-374	hsa-miR-595 p	hsa-miR-301	hsa-miR-124*
hsa-miR-145*	hsa-miR-603	hsa-miR-30a3p	hsa-miR-200b
hsa-miR-645	hsa-miR-618	hsa-miR-30a5p	hsa-miR-330
hsa-miR-26a	hsa-miR-623	hsa-miR-30c	hsa-miR-433
hsa-miR-99b	hsa-miR-630	hsa-miR-30d	hsa-miR-149
hsa-miR-133b	hsa-miR-636	hsa-miR-30e3p	hsa-miR-652
hsa-miR-152	hsa-miR-638	hsa-miR-31	hsa-miR-520d
hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-642	hsa-miR-320	hsa-miR-1262
hsa-miR-339-5p	hsa-miR-652	hsa-miR-320b	hsa-miR-215
hsa-miR-598	hsa-miR-6543p	hsa-miR-3233p	hsa-miR-614
hsa-miR-758	hsa-miR-659	hsa-miR-3243p	hsa-miR-4853p
hsa-miR-125b	hsa-miR-660	hsa-miR-3245p	hsa-miR-370
hsa-miR-340*	hsa-miR-661	hsa-miR-326	hsa-miR-181c
hsa-miR-16	hsa-miR-664	hsa-miR-328	hsa-miR-103
hsa-let-7g	hsa-miR-671 3p	hsa-miR-33a	hsa-miR-330
hsa-miR-26b	hsa-miR-720	hsa-miR-334a	hsa-miR-331#
hsa-miR-299-3p	hsa-miR-8865p	hsa-miR-34c	hsa-miR-342-5p
hsa-miR-502-3p	hsa-miR-8863p	hsa-miR-363	hsa-miR-4255p

hsa-miR-616	hsa-miR-890	hsa-miR-365	hsa-miR-432
hsa-miR-135b	hsa-miR-892b	hsa-miR-423	hsa-miR-433
hsa-miR-17	hsa-miR-9 #	hsa-miR-425#	hsa-miR-4843p
hsa-miR-18a	hsa-miR-451	hsa-miR-519b3p	hsa-miR-140
hsa-miR-892b	hsa-miR-491	hsa-miR-520b	hsa-miR-1
hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-495	hsa-miR-520c3p	hsa-miR-27 ^a
hsa-miR-9	hsa-miR-93	hsa-miR-520d5p	hsa-miR-101
hsa-miR-27b	hsa-miR-7#	hsa-miR-520b	hsa-miR-183
hsa-miR-103	hsa-miR-let7a#	hsa-miR-520d5p	hsa-miR-181c
hsa-miR-135b	hsa-let7b#	hsa-miR-532	hsa-miR-494
hsa-miR-181a	hsa-miR-100	hsa-miR-5323p	hsa-miR-92 A
hsa-let-7b	hsa-miR-10b#	hsa-miR-539	hsa-miR-93#
hsa-miR-381	hsa-miR-1180	hsa-miR-548a	hsa-miR-99b#
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-1208	hsa-miR-559	hsa-miR-134
hsa-miR-584	hsa-miR-125a3p	hsa-miR-335#	hsa-miR-122
hsa-miR-10a	hsa-miR-125a5p	hsa-miR-95	hsa-miR-1227
hsa-miR-28-3p	hsa-miR-1260	hsa-miR-376	hsa-miR-1233
hsa-miR-342-3p	hsa-miR-1262	hsa-miR-143	hsa-miR-1247
hsa-miR-484	hsa-miR-1267	hsa-miR-548c	hsa-miR-1256
hsa-miR-505*	hsa-miR-127	hsa-miR-155	hsa-miR-564
hsa-miR-19b-1*	hsa-miR-1270	hsa-miR-618	hsa-miR-566
hsa-miR-875-5p	hsa-miR-1274a	hsa-miR-18a#	hsa-miR-571
hsa-miR-10b	hsa-miR-1274b	hsa-miR-17	hsa-miR-5743p
hsa-miR-28-5p	hsa-miR-1275	hsa-miR-28	hsa-miR-7
hsa-miR-106a	hsa-miR-1276	hsa-miR-146	hsa-miR-518f
hsa-miR-182	hsa-miR-1285	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-616
hsa-miR-200c	hsa-miR-128a	hsa-miR-1290	hsa-miR-30b
			hsa-miR-192
			hsa-miR-639

9.ANEXO

ANEXO 1 – Classificação de Banff

Rejeição aguda

1. Evidência morfológica de lesão tecidual aguda: Necrose tubular aguda ou neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos e/ou trombose capilar; ou arterite intimal/necrose fibrinóide/ arterite intramural ou transmural.
2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos: Deposição de C4d; e/ou deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro) ou deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinóide.
3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes: Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA da disparidade do doador ou presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

Rejeição crônica

1. Evidência morfológica de lesão tecidual: Duplicação (“duplo contorno”) da membrana basal glomerular; e/ou - multilaminação da membrana basal glomerular, e/ou - Fibrose intersticial/atrofia tubular com ou sem perda de capilares peritubulares, fibrose intimal em artérias sem duplicação da camada elástica.
2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos: Deposição difusa de C4d em capilares peritubulares.
3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes: Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA da disparidade do doador, ou presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

ANEXO 2- Aprovação do comitê de ética

2731/05/151

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

À

Comissão Científica do InCor

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 20.01.16 a execução do subprojeto intitulado "**Perfil de expressão de microRNAs da tolerância operacional no transplante renal humano**", que será dissertação de mestrado da aluna **Amanda Cabral da Silva**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 1097/05**, intitulado "**Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplantes de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica**".

Pesquisador responsável: Veronica Porto C. de Vasconcelos Coelho

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

21 / 01 / 2016

CAPPesq, 20 de Janeiro de 2016

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

2731/05/151

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 1097/05

Título: Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplantes de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica

Pesquisador Responsável: Veronica Porto C. de Vasconcelos Coelho

Pesquisador Executante: Veronica Porto C. de Vasconcelos Coelho

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 20/01/2016, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 02.12.15 – Inclusão da aluna Amanda Cabral da Silva no estudo; Relatório parcial da pesquisa**

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

21 / 01 / 2016

Anna Lucia

CAPPesq, 20 de Janeiro de 2016

Alfredo Mansur

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 3- TCLE

¹HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº.....APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de *tolerância operacional*: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica.

PESQUISADOR: Verônica Coelho (coordenadora e gerente do projeto)

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração -

Professora Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45907

---

¹Versão 2_2014.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Jorge Kalil
CARGO/FUNÇÃO: Médico. Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52834

PESQUISADORA COLABORADORA NO TRANSPLANTE RENAL: Francine Lemos

CARGO/FUNÇÃO: Médica Colaboradora da Unidade de Transplante Renal - HC - FMUSP Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da USP – São Paulo.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: 80229

.....
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X	RISCO	MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR			

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE
LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;

Neste projeto de pesquisa, estudaremos algumas diferenças no comportamento imunológico entre as pessoas que foram transplantadas e que, com o tempo, ficaram muito bem (com seu órgão transplantado funcionando bem), e aquelas que não evoluíram tão bem e rejeitaram o enxerto, desenvolvendo rejeição crônica.

Em todo mundo, médicos e pesquisadores que trabalham com transplante estão estudando para tentar compreender as diferenças nesses dois tipos de situação. Algumas pessoas que foram transplantadas conseguem chegar a um melhor equilíbrio, precisando de apenas pequenas doses de drogas imunossupressoras, que são os remédios que previnem a rejeição. Quase todos os pacientes que param de tomar as os remédios imunossupressores perdem o órgão transplantado rapidamente, porém, existem alguns casos raros de pessoas que precisaram suspender todos os remédios imunossupressores e que não perderam o enxerto. Nós acreditamos que se conseguirmos compreender melhor essas diferenças, e saber como as pessoas transplantadas que estão bem chegaram a este estado de equilíbrio, nós podemos usar este conhecimento em benefício de novos pacientes. Poderemos usar os novos conhecimentos para identificar melhor (diagnosticar) o estado de equilíbrio no transplante e, desta forma, oferecer outras opções para diminuir os remédios para rejeição de quem não precisa de tanto, e também para criar novos tratamentos para a rejeição no futuro, que possam ajudar ao organismo da pessoa transplantada a desenvolver o estado de melhor equilíbrio. Desta forma, esperamos que os conhecimentos conseguidos nessa pesquisa possam ajudar pacientes no futuro. Este projeto de pesquisa conta com a participação de vários centros de transplante no Brasil (estudo multicêntrico) e estudaremos pacientes de transplante de rim, de coração e de fígado. Também teremos um grupo de indivíduos saudáveis, não transplantados, como grupo comparativo dos padrões imunológicos.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;

Os nossos estudos serão feitos utilizando um pouco de sua urina e de seu sangue que será colhido de uma veia do seu braço. Usaremos a sua urina para analisar proteínas e o seu sangue para obter células chamadas linfócitos e também soro, e com esse material faremos nossos estudos, analisando anticorpos e substâncias produzidas pelas células. Também, se o seu médico, em algum momento, achar necessário fazer uma biópsia do seu órgão transplantado para orientá-lo no seu tratamento (não por causa da pesquisa) poderemos utilizar um fragmento do material retirado do enxerto para fazer a pesquisa. Mas, a biópsia não será realizada por causa da pesquisa.

Caso aceite participar deste estudo, você deverá assinar este documento concordando que seja colhido o seu sangue para este propósito, de acordo com o seguinte roteiro:

- Coleta de 20 ml de urina em frasco apropriado (estéril).

- Coleta de 65 ml de sangue a ser feita de uma veia do seu braço, a cada 4 meses (3 a 4 coletas) e, mais uma (01) coleta se, em algum momento do estudo, você tiver rejeição ou infecção ou em caso de necessidade de validação de algum resultado do estudo. A coleta sequencial programada será previamente agendada no momento do seu ingresso na pesquisa.

3. desconfortos e riscos esperados;

O desconforto será de uma picada da agulha para a retirada do sangue.

É importante ressaltar que você não é obrigado a participar desta pesquisa se não quiser e nada afetará o seu tratamento e acompanhamento neste hospital.

4. benefícios que poderão ser obtidos;

É importante dizer que esta pesquisa não prevê qualquer benefício direto para o seu tratamento mas, poderá ajudar outros pacientes no futuro.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não se aplica.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Os riscos desta pesquisa para o Sr ou Sra são mínimos, e estão relacionados à coleta de sangue. A coleta de sangue será semelhante à coleta de exames, feita habitualmente pelo paciente no laboratório, para os exames de rotina. O local da picada no seu braço pode ficar roxo após a punção, chamado hematoma, que desaparece com o passar dos dias. A coleta do sangue necessária para a pesquisa vai sempre ser acompanhada pelo exame de hemograma e não será colhido sangue do paciente que estiver com anemia que contra indique a retirada de sangue. O pesquisador se responsabiliza por esclarecer os riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa e quaisquer outras dúvidas que o paciente tenha sobre a pesquisa.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
O sujeito de pesquisa está livre para retirar o seu consentimento a qualquer momento e desistir de participar desta pesquisa. O fato de não querer participar desta pesquisa não vai trazer nenhum prejuízo para o seu tratamento. O paciente vai receber todos os tratamentos disponíveis e necessários para o seu caso.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
Todas as informações obtidas dos pacientes serão confidenciais e sigilosas durante toda a pesquisa e também no momento em que esta pesquisa for publicada nas revistas de saúde.
  4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
Se ocorrer algum dano causado por esta pesquisa o paciente terá toda assistência a sua saúde no hospital onde é acompanhado (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP).
  5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Este estudo prevê apenas riscos mínimos para o paciente, sem risco de dano à saúde do paciente. Não existe remuneração ou indenização ao paciente que aceitar participar deste estudo.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

1. Coordenação do projeto

- Verônica Coelho - Laboratório de Imunologia – Instituto do Coração – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 9º andar – bloco 2 — cep: 05403-010 - fones: 2661-5905 ou 2661 5180 ou 2661-5913

2. Transplante Renal:

- Francine Lemos - Unidade de Transplante Renal – Hospital das Clínicas - Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar n 255/ICHC 7 andar - sala 706-F. cep 05403-900 Tel :(11) 2661-8081.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Concordo que o material extraído do meu sangue e/ou urina (ex. Células ou RNA) possa ser utilizado em estudos adicionais aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa, no futuro, e que possa ser compartilhado com outros grupos de pesquisa nacionais e internacionais, trabalhando em colaboração com o grupo responsável por este Estudo Multicêntrico, mediante autorização de sua coordenação.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,   de   de 20   .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 4 – Lista de microRNAs Card A e B

Assay ID	Assay Name	Pool
000377	hsa-let-7a	A
000379	hsa-let-7c	A
002283	hsa-let-7d	A
002406	hsa-let-7e	A
000382	hsa-let-7f	A
002282	hsa-let-7g	A
002222	hsa-miR-1	A
000583	hsa-miR-9	A
000387	hsa-miR-10a	A
002218	hsa-miR-10b	A
000389	hsa-miR-15a	A
000390	hsa-miR-15b	A
000391	hsa-miR-16	A
002308	hsa-miR-17	A
002422	hsa-miR-18a	A
002217	hsa-miR-18b	A
000395	hsa-miR-19a	A
000396	hsa-miR-19b	A
000580	hsa-miR-20a	A
001014	hsa-miR-20b	A
000397	hsa-miR-21	A
000398	hsa-miR-22	A
000399	hsa-miR-23a	A
000400	hsa-miR-23b	A
000402	hsa-miR-24	A
000403	hsa-miR-25	A
000405	hsa-miR-26a	A
000407	hsa-miR-26b	A
000408	hsa-miR-27a	A
000409	hsa-miR-27b	A
002446	hsa-miR-28-3p	A
000411	hsa-miR-28	A
002112	hsa-miR-29a	A
000413	hsa-miR-29b	A
000587	hsa-miR-29c	A
000602	hsa-miR-30b	A
000419	hsa-miR-30c	A
002279	hsa-miR-31	A
002109	hsa-miR-32	A
002085	hsa-miR-33b	A
000426	hsa-miR-34a	A
000428	hsa-miR-34c	A

Assay ID	Assay Name	Pool
000268	dme-miR-7	B
002909	hsa-miR-548I	B
000416	hsa-miR-30a-3p	B
000417	hsa-miR-30a-5p	B
000420	hsa-miR-30d	B
000422	hsa-miR-30e-3p	B
000427	hsa-miR-34b	B
000451	hsa-miR-126#	B
000478	hsa-miR-154#	B
000483	hsa-miR-182#	B
000510	hsa-miR-206	B
000516	hsa-miR-213	B
000534	hsa-miR-302c#	B
000535	hsa-miR-302d	B
000567	hsa-miR-378	B
000570	hsa-miR-380-5p	B
002910	hsa-miR-1257	B
001011	hsa-miR-200a#	B
001026	hsa-miR-432	B
001027	hsa-miR-432#	B
001043	hsa-miR-497	B
001046	hsa-miR-500	B
002927	hsa-miR-1238	B
001106	hsa-miR-488	B
001113	hsa-miR-517#	B
001149	hsa-miR-516-3p	B
001158	hsa-miR-518c#	B
001166	hsa-miR-519e#	B
001170	hsa-miR-520h	B
001173	hsa-miR-524	B
001178	mmu-let-7d#	B
001283	hsa-miR-363#	B
001338	rno-miR-7#	B
001510	hsa-miR-656	B
001511	hsa-miR-549	B
001512	hsa-miR-657	B
001513	hsa-miR-658	B
001514	hsa-miR-659	B
001519	hsa-miR-551a	B
001520	hsa-miR-552	B
001521	hsa-miR-553	B
001522	hsa-miR-554	B

000431	hsa-miR-92a	A
001090	mmu-miR-93	A
000433	hsa-miR-95	A
000186	mmu-miR-96	A
000577	hsa-miR-98	A
000435	hsa-miR-99a	A
000436	hsa-miR-99b	A
000437	hsa-miR-100	A
002253	hsa-miR-101	A
000439	hsa-miR-103	A
002167	hsa-miR-105	A
002169	hsa-miR-106a	A
000442	hsa-miR-106b	A
000443	hsa-miR-107	A
002245	hsa-miR-122	A
001182	mmu-miR-124a	A
002199	hsa-miR-125a-3p	A
002198	hsa-miR-125a-5p	A
000449	hsa-miR-125b	A
002228	hsa-miR-126	A
000452	hsa-miR-127	A
002229	hsa-miR-127-5p	A
002216	hsa-miR-128a	A
001184	mmu-miR-129-3p	A
000590	hsa-miR-129	A
000454	hsa-miR-130a	A
000456	hsa-miR-130b	A
000457	hsa-miR-132	A
002246	hsa-miR-133a	A
002247	hsa-miR-133b	A
001186	mmu-miR-134	A
000460	hsa-miR-135a	A
002261	hsa-miR-135b	A
000592	hsa-miR-136	A
001129	mmu-miR-137	A
002284	hsa-miR-138	A
002313	hsa-miR-139-3p	A
002289	hsa-miR-139-5p	A
002234	hsa-miR-140-3p	A
001187	mmu-miR-140	A
000463	hsa-miR-141	A
000464	hsa-miR-142-3p	A
002248	hsa-miR-142-5p	A
002249	hsa-miR-143	A
002278	hsa-miR-145	A

001523	hsa-miR-555	B
001525	hsa-miR-557	B
001526	hsa-miR-558	B
001527	hsa-miR-559	B
001529	hsa-miR-562	B
001530	hsa-miR-563	B
001531	hsa-miR-564	B
001533	hsa-miR-566	B
001534	hsa-miR-567	B
001536	hsa-miR-569	B
001539	hsa-miR-586	B
001540	hsa-miR-587	B
001542	hsa-miR-588	B
001543	hsa-miR-589	B
001544	hsa-miR-550	B
001545	hsa-miR-591	B
001546	hsa-miR-592	B
001547	hsa-miR-593	B
001550	hsa-miR-596	B
001553	hsa-miR-622	B
001554	hsa-miR-599	B
001555	hsa-miR-623	B
001556	hsa-miR-600	B
001557	hsa-miR-624	B
001558	hsa-miR-601	B
001559	hsa-miR-626	B
001562	hsa-miR-629	B
001563	hsa-miR-630	B
001564	hsa-miR-631	B
001566	hsa-miR-603	B
001567	hsa-miR-604	B
001568	hsa-miR-605	B
001569	hsa-miR-606	B
001570	hsa-miR-607	B
001571	hsa-miR-608	B
001573	hsa-miR-609	B
001574	hsa-miR-633	B
001576	hsa-miR-634	B
001578	hsa-miR-635	B
001581	hsa-miR-637	B
001582	hsa-miR-638	B
001583	hsa-miR-639	B
001584	hsa-miR-640	B
001585	hsa-miR-641	B
001586	hsa-miR-613	B

000468	hsa-miR-146a	A
002361	hsa-miR-146b-3p	A
001097	hsa-miR-146b	A
002262	hsa-miR-147b	A
000470	hsa-miR-148a	A
000471	hsa-miR-148b	A
002255	hsa-miR-149	A
000473	hsa-miR-150	A
000475	hsa-miR-152	A
001191	mmu-miR-153	A
000477	hsa-miR-154	A
000480	hsa-miR-181a	A
000482	hsa-miR-181c	A
002334	hsa-miR-182	A
002269	hsa-miR-183	A
000485	hsa-miR-184	A
002271	hsa-miR-185	A
002285	hsa-miR-186	A
001193	mmu-miR-187	A
002106	hsa-miR-188-3p	A
000489	hsa-miR-190	A
002299	hsa-miR-191	A
000491	hsa-miR-192	A
002250	hsa-miR-193a-3p	A
002281	hsa-miR-193a-5p	A
002367	hsa-miR-193b	A
000493	hsa-miR-194	A
000494	hsa-miR-195	A
002215	hsa-miR-196b	A
000497	hsa-miR-197	A
002273	hsa-miR-198	A
000498	hsa-miR-199a	A
002304	hsa-miR-199a-3p	A
000500	hsa-miR-199b	A
000502	hsa-miR-200a	A
002251	hsa-miR-200b	A
002300	hsa-miR-200c	A
002363	hsa-miR-202	A
000507	hsa-miR-203	A
000508	hsa-miR-204	A
000509	hsa-miR-205	A
002290	hsa-miR-208b	A
000512	hsa-miR-210	A
002306	hsa-miR-214	A
000518	hsa-miR-215	A

001587	hsa-miR-614	B
001589	hsa-miR-616	B
001591	hsa-miR-617	B
001594	hsa-miR-643	B
001596	hsa-miR-644	B
001597	hsa-miR-645	B
001598	hsa-miR-621	B
001599	hsa-miR-646	B
001600	hsa-miR-647	B
001601	hsa-miR-648	B
001602	hsa-miR-649	B
001603	hsa-miR-650	B
001606	hsa-miR-661	B
001607	hsa-miR-662	B
001613	hsa-miR-571	B
001614	hsa-miR-572	B
001615	hsa-miR-573	B
001617	hsa-miR-575	B
001619	hsa-miR-578	B
001621	hsa-miR-580	B
001622	hsa-miR-581	B
001623	hsa-miR-583	B
001624	hsa-miR-584	B
001625	hsa-miR-585	B
001818	rno-miR-29c#	B
001986	hsa-miR-766	B
001987	hsa-miR-595	B
001992	hsa-miR-668	B
001993	hsa-miR-767-5p	B
001995	hsa-miR-767-3p	B
001996	hsa-miR-454#	B
001998	hsa-miR-769-5p	B
002002	hsa-miR-770-5p	B
002003	hsa-miR-769-3p	B
002004	hsa-miR-802	B
002005	hsa-miR-675	B
002087	hsa-miR-505#	B
002094	hsa-miR-218-1#	B
002096	hsa-miR-221#	B
002097	hsa-miR-222#	B
002098	hsa-miR-223#	B
002100	hsa-miR-136#	B
002102	hsa-miR-34b	B
002104	hsa-miR-185#	B
002105	hsa-miR-186#	B

002220	hsa-miR-216a	A
002326	hsa-miR-216b	A
002337	hsa-miR-217	A
000521	hsa-miR-218	A
000522	hsa-miR-219	A
000524	hsa-miR-221	A
002276	hsa-miR-222	A
002295	hsa-miR-223	A
002099	hsa-miR-224	A
002101	hsa-miR-296-3p	A
000527	hsa-miR-296	A
001015	hsa-miR-299-3p	A
000600	hsa-miR-299-5p	A
000528	hsa-miR-301	A
002392	hsa-miR-301b	A
000529	hsa-miR-302a	A
000531	hsa-miR-302b	A
000533	hsa-miR-302c	A
002277	hsa-miR-320	A
002227	hsa-miR-323-3p	A
002161	hsa-miR-324-3p	A
000539	hsa-miR-324-5p	A
000542	hsa-miR-326	A
000543	hsa-miR-328	A
001101	hsa-miR-329	A
000544	hsa-miR-330	A
002230	hsa-miR-330-5p	A
000545	hsa-miR-331	A
002233	hsa-miR-331-5p	A
000546	hsa-miR-335	A
002156	hsa-miR-337-5p	A
002252	hsa-miR-338-3p	A
002184	hsa-miR-339-3p	A
002257	hsa-miR-339-5p	A
002258	hsa-miR-340	A
002623	hsa-miR-155	A
002619	hsa-let-7b	A
002260	hsa-miR-342-3p	A
002147	hsa-miR-342-5p	A
002186	hsa-miR-345	A
000554	hsa-miR-361	A
002117	hsa-miR-362-3p	A
001273	hsa-miR-362	A
001271	hsa-miR-363	A
001020	hsa-miR-365	A

002107	hsa-miR-195#	B
002108	hsa-miR-30c-1#	B
002110	hsa-miR-30c-2#	B
002111	hsa-miR-32#	B
002113	hsa-miR-31#	B
002114	hsa-miR-130b#	B
002115	hsa-miR-26a-2#	B
002116	hsa-miR-361-3p	B
002118	hsa-let-7g#	B
002119	hsa-miR-302b#	B
002120	hsa-miR-302d#	B
002121	hsa-miR-367#	B
002125	hsa-miR-374a#	B
002126	hsa-miR-23b#	B
002127	hsa-miR-376a#	B
002128	hsa-miR-377#	B
002129	hsa-miR-30b#	B
002130	hsa-miR-122#	B
002131	hsa-miR-130a#	B
002132	hsa-miR-132#	B
002134	hsa-miR-148a#	B
002135	hsa-miR-33a	B
002136	hsa-miR-33a#	B
002137	hsa-miR-92a-1#	B
002138	hsa-miR-92a-2#	B
002139	hsa-miR-93#	B
002140	hsa-miR-96#	B
002141	hsa-miR-99a#	B
002142	hsa-miR-100#	B
002143	hsa-miR-101#	B
002144	hsa-miR-138-2#	B
002145	hsa-miR-141#	B
002146	hsa-miR-143#	B
002148	hsa-miR-144#	B
002149	hsa-miR-145#	B
002150	hsa-miR-920	B
002151	hsa-miR-921	B
002152	hsa-miR-922	B
002154	hsa-miR-924	B
002157	hsa-miR-337-3p	B
002158	hsa-miR-125b-2#	B
002159	hsa-miR-135b#	B
002160	hsa-miR-148b#	B
002163	hsa-miR-146a#	B
002164	hsa-miR-149#	B

000555	hsa-miR-367	A
000557	hsa-miR-369-3p	A
001021	hsa-miR-369-5p	A
002275	hsa-miR-370	A
002124	hsa-miR-371-3p	A
000560	hsa-miR-372	A
000561	hsa-miR-373	A
000563	hsa-miR-374	A
001319	mmu-miR-374-5p	A
000564	hsa-miR-375	A
000565	hsa-miR-376a	A
001102	hsa-miR-376b	A
000566	hsa-miR-377	A
001138	mmu-miR-379	A
000569	hsa-miR-380-3p	A
000571	hsa-miR-381	A
000572	hsa-miR-382	A
000573	hsa-miR-383	A
002331	hsa-miR-409-5p	A
001274	hsa-miR-410	A
001610	hsa-miR-411	A
002297	hsa-miR-422a	A
002340	hsa-miR-423-5p	A
000604	hsa-miR-424	A
001516	hsa-miR-425-5p	A
001024	hsa-miR-429	A
001979	hsa-miR-431	A
001028	hsa-miR-433	A
001030	hsa-miR-449	A
001608	hsa-miR-449b	A
002303	hsa-miR-450a	A
002208	hsa-miR-450b-3p	A
002207	hsa-miR-450b-5p	A
001141	mmu-miR-451	A
002329	hsa-miR-452	A
002318	hsa-miR-453	A
002323	hsa-miR-454	A
002244	hsa-miR-455-3p	A
001280	hsa-miR-455	A
002338	hsa-miR-483-5p	A
001821	hsa-miR-484	A
001277	hsa-miR-485-3p	A
001036	hsa-miR-485-5p	A
002093	hsa-miR-486-3p	A
001278	hsa-miR-486	A

002165	hsa-miR-29b-1#	B
002166	hsa-miR-29b-2#	B
002168	hsa-miR-105#	B
002170	hsa-miR-106a#	B
002171	hsa-miR-16-2#	B
002172	hsa-let-7i#	B
002173	hsa-miR-15b#	B
002174	hsa-miR-27b#	B
002176	hsa-miR-933	B
002177	hsa-miR-934	B
002178	hsa-miR-935	B
002179	hsa-miR-936	B
002180	hsa-miR-937	B
002181	hsa-miR-938	B
002182	hsa-miR-939	B
002183	hsa-miR-941	B
002185	hsa-miR-335#	B
002187	hsa-miR-942	B
002188	hsa-miR-943	B
002189	hsa-miR-944	B
002196	hsa-miR-99b#	B
002197	hsa-miR-124#	B
002200	hsa-miR-541#	B
002203	hsa-miR-875-5p	B
002213	hsa-miR-888#	B
002214	hsa-miR-892b	B
002231	hsa-miR-9#	B
002238	hsa-miR-411#	B
002243	hsa-miR-378	B
002254	hsa-miR-151-3p	B
002259	hsa-miR-340#	B
002263	hsa-miR-190b	B
002266	hsa-miR-545#	B
002270	hsa-miR-183#	B
002272	hsa-miR-192#	B
002274	hsa-miR-200b#	B
002286	hsa-miR-200c#	B
002287	hsa-miR-155#	B
002288	hsa-miR-10a#	B
002293	hsa-miR-214#	B
002294	hsa-miR-218-2#	B
002298	hsa-miR-129#	B
002301	hsa-miR-22#	B
002302	hsa-miR-425#	B
002305	hsa-miR-30d#	B

001279	hsa-miR-487a	A
001285	hsa-miR-487b	A
002357	hsa-miR-488	A
002358	hsa-miR-489	A
001037	hsa-miR-490	A
002360	hsa-miR-491-3p	A
001630	mmu-miR-491	A
002364	hsa-miR-493	A
002365	hsa-miR-494	A
001663	mmu-miR-495	A
001953	mmu-miR-496	A
002427	hsa-miR-499-3p	A
001352	mmu-miR-499	A
002428	hsa-miR-500	A
002435	hsa-miR-501-3p	A
001047	hsa-miR-501	A
002083	hsa-miR-502-3p	A
001109	hsa-miR-502	A
001048	hsa-miR-503	A
002084	hsa-miR-504	A
002089	hsa-miR-505	A
001051	hsa-miR-507	A
001052	hsa-miR-508	A
002092	hsa-miR-508-5p	A
002235	hsa-miR-509-5p	A
002241	hsa-miR-510	A
001823	hsa-miR-512-3p	A
001145	hsa-miR-512-5p	A
002090	hsa-miR-513-5p	A
002369	hsa-miR-515-3p	A
001112	hsa-miR-515-5p	A
002416	hsa-miR-516a-5p	A
001150	hsa-miR-516b	A
002402	hsa-miR-517a	A
001153	hsa-miR-517c	A
002397	hsa-miR-518a-3p	A
002396	hsa-miR-518a-5p	A
001156	hsa-miR-518b	A
002401	hsa-miR-518c	A
001159	hsa-miR-518d	A
002389	hsa-miR-518d-5p	A
002395	hsa-miR-518e	A
002388	hsa-miR-518f	A
002415	hsa-miR-519a	A
002403	hsa-miR-519d	A

002307	hsa-let-7a#	B
002309	hsa-miR-424#	B
002310	hsa-miR-18b#	B
002311	hsa-miR-20b#	B
002312	hsa-miR-431#	B
002314	hsa-miR-7-2#	B
002315	hsa-miR-10b#	B
002316	hsa-miR-34a#	B
002317	hsa-miR-181a-2#	B
002325	hsa-miR-744#	B
002330	hsa-miR-452#	B
002332	hsa-miR-409-3p	B
002333	hsa-miR-181c#	B
002336	hsa-miR-196a#	B
002339	hsa-miR-483-3p	B
002342	hsa-miR-708#	B
002343	hsa-miR-92b#	B
002346	hsa-miR-551b#	B
002362	hsa-miR-202#	B
002366	hsa-miR-193b#	B
002368	hsa-miR-497#	B
002371	hsa-miR-518e#	B
002376	hsa-miR-543	B
002378	hsa-miR-125b-1#	B
002379	hsa-miR-194#	B
002380	hsa-miR-106b#	B
002381	hsa-miR-302a#	B
002384	hsa-miR-519b-3p	B
002387	hsa-miR-518f#	B
002391	hsa-miR-374b#	B
002400	hsa-miR-520c-3p	B
002404	hsa-let-7b#	B
002405	hsa-let-7c#	B
002407	hsa-let-7e#	B
002410	hsa-miR-550	B
002411	hsa-miR-593	B
002417	hsa-let-7f-1#	B
002418	hsa-let-7f-2#	B
002419	hsa-miR-15a#	B
002420	hsa-miR-16-1#	B
002421	hsa-miR-17#	B
002423	hsa-miR-18a#	B
002424	hsa-miR-19a#	B
002425	hsa-miR-19b-1#	B
002432	hsa-miR-625#	B

002370	hsa-miR-519e	A
001167	hsa-miR-520a	A
001168	hsa-miR-520a#	A
002393	hsa-miR-520d-5p	A
001121	hsa-miR-520g	A
001122	hsa-miR-521	A
002413	hsa-miR-522	A
002386	hsa-miR-523	A
001982	hsa-miR-524-5p	A
002385	hsa-miR-525-3p	A
001174	hsa-miR-525	A
002382	hsa-miR-526b	A
002355	hsa-miR-532-3p	A
001518	hsa-miR-532	A
001286	hsa-miR-539	A
002201	hsa-miR-541	A
001284	hsa-miR-542-3p	A
002240	hsa-miR-542-5p	A
002265	hsa-miR-544	A
002267	hsa-miR-545	A
001538	hsa-miR-548a	A
002412	hsa-miR-548a-5p	A
001541	hsa-miR-548b	A
002408	hsa-miR-548b-5p	A
001590	hsa-miR-548c	A
002429	hsa-miR-548c-5p	A
001605	hsa-miR-548d	A
002237	hsa-miR-548d-5p	A
001535	hsa-miR-551b	A
002345	hsa-miR-556-3p	A
002344	hsa-miR-556-5p	A
001528	hsa-miR-561	A
002347	hsa-miR-570	A
002349	hsa-miR-574-3p	A
002351	hsa-miR-576-3p	A
002350	hsa-miR-576-5p	A
002398	hsa-miR-579	A
002399	hsa-miR-582-3p	A
001983	hsa-miR-582-5p	A
002409	hsa-miR-589	A
001984	hsa-miR-590-5p	A
001551	hsa-miR-597	A
001988	hsa-miR-598	A
001960	mmu-miR-615	A
002353	hsa-miR-615-5p	A

002434	hsa-miR-628-3p	B
002437	hsa-miR-20a#	B
002438	hsa-miR-21#	B
002439	hsa-miR-23a#	B
002440	hsa-miR-24-1#	B
002441	hsa-miR-24-2#	B
002442	hsa-miR-25#	B
002443	hsa-miR-26a-1#	B
002444	hsa-miR-26b#	B
002445	hsa-miR-27a#	B
002447	hsa-miR-29a#	B
002642	hsa-miR-151-5P	B
002643	hsa-miR-765	B
002658	hsa-miR-338-5P	B
002672	hsa-miR-620	B
002675	hsa-miR-577	B
002676	hsa-miR-144	B
002677	hsa-miR-590-3P	B
002678	hsa-miR-191#	B
002681	hsa-miR-665	B
002743	hsa-miR-520D-3P	B
002752	hsa-miR-1224-3P	B
002867	hsa-miR-1305	B
002756	hsa-miR-513C	B
002757	hsa-miR-513B	B
002758	hsa-miR-1226#	B
002761	hsa-miR-1236	B
002763	hsa-miR-1228#	B
002766	hsa-miR-1225-3P	B
002768	hsa-miR-1233	B
002769	hsa-miR-1227	B
002773	hsa-miR-1286	B
002775	hsa-miR-548M	B
002776	hsa-miR-1179	B
002777	hsa-miR-1178	B
002778	hsa-miR-1205	B
002779	hsa-miR-1271	B
002781	hsa-miR-1201	B
002783	hsa-miR-548J	B
002784	hsa-miR-1263	B
002785	hsa-miR-1294	B
002789	hsa-miR-1269	B
002790	hsa-miR-1265	B
002791	hsa-miR-1244	B
002792	hsa-miR-1303	B

002414	hsa-miR-616	A
001593	hsa-miR-618	A
002430	hsa-miR-624	A
002431	hsa-miR-625	A
001560	hsa-miR-627	A
002433	hsa-miR-628-5p	A
002436	hsa-miR-629	A
002088	hsa-miR-636	A
001592	hsa-miR-642	A
001604	hsa-miR-651	A
002352	hsa-miR-652	A
002292	hsa-miR-653	A
002239	hsa-miR-654-3p	A
001611	hsa-miR-654	A
001612	hsa-miR-655	A
001515	hsa-miR-660	A
002322	hsa-miR-671-3p	A
002327	hsa-miR-672	A
002021	hsa-miR-674	A
002341	hsa-miR-708	A
002324	hsa-miR-744	A
001990	hsa-miR-758	A
002354	hsa-miR-871	A
002264	hsa-miR-872	A
002356	hsa-miR-873	A
002268	hsa-miR-874	A
002204	hsa-miR-875-3p	A
002225	hsa-miR-876-3p	A
002205	hsa-miR-876-5p	A
002372	hsa-miR-885-3p	A
002296	hsa-miR-885-5p	A
002194	hsa-miR-886-3p	A
002193	hsa-miR-886-5p	A
002374	hsa-miR-887	A
002212	hsa-miR-888	A
002202	hsa-miR-889	A
002209	hsa-miR-890	A
002191	hsa-miR-891a	A
002210	hsa-miR-891b	A
002195	hsa-miR-892a	A
000469	hsa-miR-147	A
000511	hsa-miR-208	A
000514	hsa-miR-211	A
000515	hsa-miR-212	A
002095	hsa-miR-219-1-3p	A

002796	hsa-miR-1259	B
002798	hsa-miR-548P	B
002799	hsa-miR-1264	B
002801	hsa-miR-1255B	B
002803	hsa-miR-1282	B
002805	hsa-miR-1255A	B
002807	hsa-miR-1270	B
002810	hsa-miR-1197	B
002815	hsa-miR-1324	B
002816	hsa-miR-548H	B
002818	hsa-miR-1254	B
002819	hsa-miR-548K	B
002820	hsa-miR-1251	B
002822	hsa-miR-1285	B
002823	hsa-miR-1245	B
002824	hsa-miR-1292	B
002827	hsa-miR-1301	B
002829	hsa-miR-1200	B
002830	hsa-miR-1182	B
002832	hsa-miR-1288	B
002838	hsa-miR-1291	B
002840	hsa-miR-1275	B
002841	hsa-miR-1183	B
002842	hsa-miR-1184	B
002843	hsa-miR-1276	B
002844	hsa-miR-320B	B
002845	hsa-miR-1272	B
002847	hsa-miR-1180	B
002850	hsa-miR-1256	B
002851	hsa-miR-1278	B
002852	hsa-miR-1262	B
002854	hsa-miR-1243	B
002857	hsa-miR-663B	B
002860	hsa-miR-1252	B
002861	hsa-miR-1298	B
002863	hsa-miR-1290	B
002868	hsa-miR-1249	B
002870	hsa-miR-1248	B
002871	hsa-miR-1289	B
002872	hsa-miR-1204	B
002873	hsa-miR-1826	B
002874	hsa-miR-1304	B
002877	hsa-miR-1203	B
002878	hsa-miR-1206	B
002879	hsa-miR-548G	B

002390	hsa-miR-219-2-3p	A
000523	hsa-miR-220	A
002206	hsa-miR-220b	A
002211	hsa-miR-220c	A
002190	hsa-miR-298	A
000540	hsa-miR-325	A
000553	hsa-miR-346	A
002122	hsa-miR-376c	A
000574	hsa-miR-384	A
001023	hsa-miR-412	A
001029	hsa-miR-448	A
001039	hsa-miR-492	A
001050	hsa-miR-506	A
002155	hsa-miR-509-3-5p	A
001111	hsa-miR-511	A
001152	hsa-miR-517b	A
001163	hsa-miR-519c	A
001116	hsa-miR-520b	A
001119	hsa-miR-520e	A
001120	hsa-miR-520f	A
001973	U6 snRNA	A&B
001094	RNU44	A&B
001006	RNU48	A&B
000338	ath-miR159a	A&B

002880	hsa-miR-1208	B
002881	hsa-miR-548E	B
002883	hsa-miR-1274A	B
002884	hsa-miR-1274B	B
002885	hsa-miR-1267	B
002887	hsa-miR-1250	B
002888	hsa-miR-548N	B
002890	hsa-miR-1283	B
002893	hsa-miR-1247	B
002894	hsa-miR-1253	B
002895	hsa-miR-720	B
002896	hsa-miR-1260	B
002897	hsa-miR-664	B
002901	hsa-miR-1302	B
002902	hsa-miR-1300	B
002903	hsa-miR-1284	B
002904	hsa-miR-548L	B
002905	hsa-miR-1293	B
002907	hsa-miR-1825	B
002908	hsa-miR-1296	B
001973	U6 snRNA	A&B
001094	RNU44	A&B
001006	RNU48	A&B
000338	ath-miR159a	A&B