Priscila Carmona

**Papel da resposta celular antígeno-específica na
tolerância operacional**

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

Programa Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Verônica Porto
Carreiro de Vasconcellos Coelho

**São Paulo
2016**

Priscila Carmona

**Papel da resposta celular antígeno-específica na
tolerância operacional**

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

Programa Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Verônica Porto
Carreiro de Vasconcellos Coelho

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carmona, Priscila

Papel da resposta celular antígeno-específica na tolerância operacional / Priscila Carmona. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Verônica Porto Carneiro de Vasconcelos Coelho.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Tolerância ao transplante 3.Rejeição de enxerto 4.Linfócitos T 5.Citocinas 6.Antígenos 7.Citomegalovírus 8.Chaperonina 60

USP/FM/DBD-282/16

Agradecimentos

À Deus, por tudo!!!!

Este trabalho foi realizado com muito amor e dedicação, portanto, agradeço imensamente pela consideração e confiança que me foi dada, obrigada pela colaboração e apoio das pessoas envolvidas como os profissionais (pesquisadores, doutores, mestres e técnicos), pacientes, amigos e família.

Agradeço as pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, Carme e Roberto, pelo incentivo, compreensão, cuidado, ajuda, auxílio (financeiro, psicológico e sentimental), amor, enfim, por estarem ao meu lado em todos os momentos. Aos meus irmãos Binho e Paulinho e minhas cunhas Jenny e Tami, por serem tão especiais, cuidarem de mim e por me darem força em todos os momentos, também à perfeita princesa mais linda do universo, a Alicia, por trazer mais brilho às nossas vidas. Á melhor amiga, minha linda e querida irmã, Pati não tenho palavras para dizer o quanto você é especial e o quanto sou grata por tudo o que você é, fez e faz por mim. Obrigada pelos choros e risos, também por ir ao lab comigo no Natal, Ano Novo, buscar amostras no Aeroporto tarde da noite me acompanhando até de madrugada, obrigada por me ouvir, me ajudar de todas as formas, tanto monetariamente, quanto psicologicamente, você é sensacional. Minha família, a mais linda e especial do universo, meu porto seguro, amo muito vocês, com todas as minhas forças e de todo meu coração!!!!

Meu amor, lindo Edu, obrigada por ser tão companheiro, amigo e incentivador, estando sempre ao meu lado me amando e cuidando de mim, Te amo muito!!!!

A minha família em geral, os Carmonas, Souzas, Miyamotos e Higashis, especialmente Vó Nilza, D. Wanda, Karla, Yuki, Eli e Su pelas orações, estudos, companheirismo e amizade.

Enfim, são tantas pessoas especiais em minha vida, que cometeria grave erro por não colocar todos os nomes aqui, além disso, os agradecimentos seriam poucos para o tanto que vocês merecem.

Muito obrigada Veronica, minha orientadora querida, que me inseriu e me guiou no complexo universo da ciência e pesquisa, me fazendo pensar (ir além do que os olhos possam ver), ter vontade de prosseguir, dando tranquilidade nos momentos de desespero, pela motivação, paciência e disponibilidade. Sem você nada disso aconteceria.

Ao Prof. Kalil por me receber tão bem no laboratório, pela oportunidade, dicas, discussões científicas e ensinamentos muito construtivos.

Aos pesquisadores Prof. Edécio Cunha-Neto e à Dra Luiza Guilherme, pela disponibilidade, sugestões e discussões intelectuais.

A Yordanka, por estar ao meu lado, pelo paper e auxílio quando estávamos sem a Ve.

Ao grupo TX, pela amizade, compreensão e auxílio, sem dúvida nos tornamos uma família: San (forte e guerreira), Janinha (paciente, encorajadora, obrigada pelas mensagens de incentivo, pelos whats de preocupação, por me ajudar nas correções, pelo carinho), Madacita (alegre e prestativa, chegar de manhazinha e te ver sempre me dava alegria), Amandinha (minha amiga verdadeira e companheira dentro e fora do lab, você foi sempre sensacional para comigo, sua linda), Dani (sempre preocupada e empolgada, a doceira mais talentosa), Jamile (nova amiga, forte e guerreira), Maluzinha, Marici,

Gege, Dashnna, todos vcs moram em meu coração, obrigada pelas discussões, por me ouvirem e cuidarem de mim nos momentos difíceis. Também, agradeço a amizade e carinho das pessoas especiais que passaram pelo grupo: Ana C., Ana P., Andy, Helen, Pri Tedesco, Marcus e Gabizinha, vcs deixaram a marquinha, são muito especiais para mim.

Aos meus amigos queridos: Moni, Fezinha (pela disponibilidade em ajudar sempre), Van, Karla, Isa, Li, Carlo, Darlan. A Rose pelos conselhos, experiências vividas, berinjelas no dueto, amizade, toques e aos nossos momentos de choros e risos que nos fizeram tão bem.

Ao pessoal dos grupos do lab – bioquímica (Déia Kuramoto (sempre que precisava vc estava disposta a ajudar), Maris, Ludy, Hamendra, Amanda), FR (Samar, Selminha, Simoninha, Karen, Raquel, Edil, Luis, Washington, Fred). Ao pessoal animado do HLA (Dr. Helcio, Dr. Nicholas, Carlos S., Gis e Rê (obrigada por me acudirem nos momentos de desespero e sempre me darem força), Ká, Lilian, Mario, Olguinha, San, Fe, Cami, Fi, Carol, Celinha, Marcelo, Ger, Déia, Clodô, Clau, Su).

A todos os alunos e amigos da pós, nossas reuniões de quinta sempre muito produtivas, obrigada também pela disponibilidade em apresentarem nas reuniões.

Aos fofos e companheiros Rainha, Laininha e Cleclé, pelos nossos almoços, conversas, amizade, palavras de conforto, docinhos, mimos, risadas e carinho. A turma da diretoria Soninha, Sr. Jair, Fe Alegria e Paulo, essa equipe forte, por serem sempre prestativos e compreensivos.

As meninas da limpeza por deixarem tudo sempre cheiroso e limpinho.

A equipe da pós, como o Prof. Esper e a Eleni (muito fofa e prestativa, obrigada por toda ajuda), por sempre nos darem suporte. A toda a galera do LIM60 e a Carol (do luminex, pela disponibilidade e compreensão sempre), pelos socorros quando precisávamos.

Ao pessoal do Projeto Imunologia nas Escolas (Paulo, Silvia, Sandra, Dani, Monica) pela força, discussões, aulas e idas na escola, foi muito bom trabalhar com vocês.

Com muito carinho, ao Dr. Pedro por cuidar dos meus olhinhos, a Dra Débora por cuidar das minhas dores e a Gabi, por me chamar nos concursos. Vocês foram e são bênçãos para mim.

Agradeço também à Faculdade de Medicina da USP (pela abertura das portas, pela educação de qualidade) à Capes (pelos dois anos de bolsa), a equipe dos outros centros de estudo por sempre fornecerem as amostras, especialmente à Amanda (da UEL), Dr. David S., e as meninas da UTR, pelo recrutamento e telefonema aos indivíduos participantes do estudo. E um super obrigado a todos os indivíduos que participaram deste projeto, nos quais utilizamos as suas células, que Deus cuide de cada um, dando forças e saúde, sem estas pessoas, nosso trabalho não seria possível.

Desculpe-me se esqueci alguém, mas agradeço de todo coração a todos do lab, e aqueles que estiveram em minha vida nestes momentos de luta, alegrias, tristeza e desespero, sofrimentos, novidades, sabendo que, apesar de tudo isso, estamos firmes e fortes prontos para o próximo desafio, com muita fé e amor!

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. Material e Métodos.....	26
3,1 Delineamento experimental.....	26
3.2 Sujeitos de pesquisa.....	27
3.3 Material coletado.....	28
3,4 Obtenção de células mononucleadas do sangue periférico.....	29
3.5 Congelamento e descongelamento de células.....	30
3.6 Marcação celular com CFSE.....	31
3.7 Seleção de peptídeos.....	32
3.8 Cultura celular com antígenos para coleta de sobrenadante para citocinas e ensaio de proliferação.....	35
3.9 Ensaio de proliferação celular de subpopulações CD4+ T regs, efetoras e de memória efetora frente aos antígenos.....	36
3.10 Marcação intracelular para Foxp3.....	38
3.11 Aquisição de estratégia de análise das diferentes subpopulações CD4+ T reg, efetora e de memória efetora.....	39
3.12 Extração de DNA e tipificação HLA.....	42
3.13 determinação da produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura frente aos diferentes antígenos, por “Luminex”.....	44
3.14 Análise dos resultados considerando respostas do tipo REGULA ou INFLAMA.....	45
3.15 Testes estatísticos.....	47

4. Resultados.....	49
4.1 Produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a estímulos com antígenos de diferentes origens: alogeneicos, derivados de um microrganismo patogênico, e autólogo.....	49
4.1.1 Produção espontânea de citocinas (REGULA e INFLAMA), nos diferentes grupos clínicos.....	50
4.1.2 Aloantígenos: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos derivados de moléculas HLA-DR alogeneicas, nos diferentes grupos clínicos.....	58
4.1.3 Antígenos de microrganismo patogênico: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos do CMV, nos diferentes grupos clínicos.....	66
4.1.4 Autoantígenos: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos da Hsp60, nos diferentes grupos clínicos.....	71
4.2 Resposta celular proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T REGULA e INFLAMA, dirigida a antígenos alogeneicos, antígenos derivados de um microrganismo patogênico e antígenos autólogos.....	89
4.2.1 Proliferação espontânea de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4+ REGULA e INFLAMA nos diferentes grupos clínicos.....	92
4.2.2 Alorreatividade: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T REGULA e INFLAMA, dirigida a peptídeos HLA-DR, nos diferentes grupos clínicos.....	96
4.2.3 Antígeno de microrganismo patogênico: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T (REGULA e INFLAMA) dirigida a peptídeos do CMV, nos diferentes grupos clínicos.....	103
4.2.4 Autorreatividade: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T (REGULA e INFLAMA), dirigida a peptídeos da Hsp60, nos diferentes grupos clínicos.....	112
5. Discussões.....	126
6. Conclusões.....	150
7. Referências bibliográficas.....	154
ANEXO 1. Tabelas dos dados clínicos e demográficos dos sujeitos de pesquisa...	172
ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	180
ANEXO 3. Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq.....	185

Lista de Figuras

Figura 1: Delineamento experimental.....	26
Figura 2: Células em proliferação.....	39
Figura 3: Estratégia de análise para a subpopulação de células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Foxp3 ⁺).....	41
Figura 4: Estratégia de análise para a subpopulação de células T efetoras (CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD127 ⁺ CD45RA ⁻ CD27 ⁻).....	41
Figura 5: Estratégia de análise para a subpopulação de células T de memória efetora (CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD27 ⁻ CD45RA ⁻).....	42
Figura 6: Produção Espontânea de citocinas – TOxRC e TOxSAU.....	53
Figura 7: Produção Espontânea de citocinas REGULA IL-4, IL-5, IL-7 e IL-10.....	55
Figura 8: Produção Espontânea de citocinas predominantemente REGULA (em azul) IL-13, sem perfil predominantemente Regula, nem Inflama, a IL-2 e citocinas predominantemente INFLAMA (vermelho) IL-1B, IL-6, IL-8 e IL-12.....	56
Figura 9: Produção Espontânea de citocinas predominantemente INFLAMA IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF, MCP-1 e MIP-1B.....	57
Figura 10: Peptídeos HLA-DR alo do doador. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TOxRC e TOxSAU.....	61
Figura 11: Efeitos de peptídeos HLA-DR-alo na produção de citocinas IL-4 e IL-10 - TOxRC.....	63
Figura 12: Efeitos de peptídeos HLA-DR-alo na produção de citocinas IL-4, G-CSF e IFN- γ - TOxRC.....	64
Figura 13: Efeitos de peptídeos HLA-DR-alo na produção de citocinas IL-4 e IL-10 - TOxSAU.....	65
Figura 14: Peptídeos CMV. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TO, RC, SAU.....	69
Figura 15: Efeitos de peptídeos CMV na produção de citocina IFN- γ – TOxRC.....	70
Figura 16: Peptídeo auto N6. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TO, RC, SAU.....	74
Figura 17: Peptídeos auto N7. Citocinas Inflama – TOxSAU e RCxSAU.....	81
Figura 18: Peptídeo auto C9. Citocinas Inflama - TO, RC, SAU.....	85
Figura 19: Produção citocinas IL-10 e MCP-1 frente ao estímulo com o peptídeo C9 - TOxRC.....	87
Figura 20: Produção de citocina IL-2 frente ao estímulo com o peptídeo C9 – TOxSAU.....	88
Figura 21: Células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ FOXP3 ⁺).....	89
Figura 22: Células T efetoras (CD4 ⁺ CD27 ⁻ CD28 ⁺ CD45RA ⁻ CD127 ⁺).....	90
Figura 23: Células T de memória efetora (CD4 ⁺ CCR7 ⁻ CD27 ⁻ CD45RA ⁻).....	90
Figura 24: Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ , e as condições com estímulo e estimulada com anti-CD3.....	91
Figura 25: Proliferação Espontânea – TOxRC e TOxSAU.....	94
Figura 26: Proliferação Espontânea das diferentes subpopulações celulares de células T CD4 ⁺	95
Figura 27: Porcentagem de células CD4 ⁺ T reguladora (CD25 ⁺ CD127 ⁻ Foxp3 ⁺). Pep DR.....	99
Figura 28: Porcentagem de células CD4 ⁺ T Efetora (CD28 ⁺ CD27 ⁻ CD45RA ⁻ CD127 ⁺). Pep DR.....	101
Figura 29: Porcentagem de células CD4 ⁺ T Memória Efetora (CD27 ⁻ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻). Pep DR.....	102
Figura 30: Peptídeo CMV. População Reguladora – TO, RC, SAU.....	106
Figura 31: Peptídeos CMV. População Efetora – TOxRC e TOxSAU.....	107

Figura 32: Porcentagem de células CD4+ T reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). Pep CMV.....	109
Figura 33: Porcentagem de células CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). Pep CMV.....	110
Figura 34: Porcentagem de células CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Pep CMV.....	111
Figura 35: Porcentagem de células CD4+ T reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). Pep N6.....	115
Figura 36: Porcentagem de células CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). Pep N6.....	116
Figura 37: Porcentagem de células CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Pep N6.....	117
Figura 38: Peptídeo auto N7. Populações Reguladora e Efetora – TO, RC, SAU.....	120
Figura 39: Porcentagem de células CD4+ de diferentes subpopulações em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo N7.....	121
Figura 40: Peptídeo alo C9. Populações Efetoras – TO, RC, SAU.....	124
Figura 41: Porcentagem de células CD4+ de diferentes subpopulações em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo C9.....	125

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados clínicos nos diferentes grupos de estudo.....	29
Tabela 2: Seleção dos peptídeos HLA-DR alo dos sujeitos de pesquisa dos diferentes grupos de estudo.....	33
Tabela 3: Sequências dos peptídeos HLA-DR sintéticos utilizados.....	34
Tabela 4: Sequências dos peptídeos da proteína Hsp60 humana selecionados.....	35
Tabela 5: Anticorpos utilizados (o respectivo fluoróforo e a sua titulação).....	37
Tabela 6: Fenótipo das diferentes subpopulações celulares CD4+.....	38
Tabela 7: Citocinas analisadas potencialmente reguladoras e inflamatórias.....	45
Tabela 8: Produção espontânea de citocinas nos diferentes grupos clínicos.....	51-52
Tabela 9: Efeito do aloantígeno - HLA-DR -alo na indução e/ou inibição da produção de citocinas.....	59-60
Tabela 10: (Continuação): Efeito do peptídeo de microrganismo patogênico - CMV - na indução e/ou inibição da produção de citocinas.....	67-68
Tabela 11: Efeito do autoantígeno - Pep-N6 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas.....	72-73
Tabela 12: Efeito do autoantígeno - Pep-N7 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas.....	78-79
Tabela 13: Efeito do autoantígeno - Pep-C9 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas.....	83-84
Tabela 14: Porcentagem de Proliferação Espontânea de células CD4 de diferentes fenótipos nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	92-93
Tabela 15: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo HLA-DR nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	97-98
Tabela 16: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo CMV nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	104-105
Tabela 17: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N6 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	113-114
Tabela 18: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N7 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	118-119
Tabela 19: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo C9 da Hsp60 nos diferentes grupos clínicos de estudo.....	122-123
Tabela 20: Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo TO.....	175
Tabela 21: Histórico clínico dos indivíduos do grupo TO (IS/ Infecções e Comorbidades).....	176
Tabela 22: Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo RC.....	177
Tabela 23: Histórico clínico dos indivíduos do grupo RC (IS/ Infecções e Comorbidades).....	178-179
Tabela 24: Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo EST.....	180
Tabela 25: Histórico clínico dos indivíduos do grupo EST (IS/ Infecções e Comorbidades).....	181-182

Resumo

Carmona, P. ***Papel da resposta celular antígeno-específica na tolerância operacional***. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A tolerância operacional (TO) é um raro fenômeno que ocorre em indivíduos transplantados, que permanecem com função estável do aloenxerto, sem rejeição, após a suspensão de drogas imunossupressoras, por pelo menos um ano. A compreensão de mecanismos envolvidos na tolerância operacional poderá contribuir para a elaboração de novas terapias imunorreguladoras, na clínica do transplante. Investigamos se, no estado de tolerância operacional, há um perfil funcional diferencial de resposta imune celular antígeno-específica, dirigida a três grupos de antígenos relevantes no alotransplante: aloantígenos do doador (peptídeos HLA-DR), antígenos de patógenos (peptídeos do CMV – citomegalovírus) e autoantígenos (peptídeos da Hsp60 – Proteína de choque térmico 60, com funções imunológicas, imunorreguladora (REGULA) e pró-inflamatória (INFLAMA). Analisamos a produção de citocinas (por Luminex) e a proliferação de diferentes subpopulações de células T CD4⁺ (por FACS), com funções, predominantemente, REGULA ou INFLAMA, frente aos três tipos de antígenos, comparativamente entre TO (n=6) e Rejeição Crônica (RC: n=8), indivíduos com função estável do enxerto, usando imunossupressores (EST: n=8) e indivíduos saudáveis (SAU: n=7). Em concordância com nossa hipótese, a resposta celular é modulada, de forma diferencial, na tolerância operacional, ocorrendo um desvio funcional da resposta a peptídeos HLA-DR do doador para um perfil REGULA, enquanto é preservado o perfil INFLAMA na resposta a peptídeos do patógeno (CMV). Apesar das diferenças nas respostas aos peptídeos do CMV entre TO e RC ($p=0,02$ e $p=0,02$ para citocinas e subpopulações regula e $p=0,008$ e $p=0,003$ para citocinas e subpopulações inflama), houve preservação do perfil INFLAMA na TO, em relação ao estado fisiológico, com indução/aumento das citocinas inflamatórias IL-1B, IL-17, IFN- γ , MCP-1 e MIP-1B, com algum grau de inibição de citocinas imunorreguladoras, e inibição da proliferação de células Tregs, sugerindo

serem importantes mecanismos na preservação da imunocompetência, na tolerância operacional. Na resposta celular a autoantígenos, destacamos o peptídeo N6 que induziu um perfil significativamente diferente na TO (mais REGULA), em relação à RC (mais INFLAMA) ($p=0,001$ para citocinas regula; $p=0,04$ para citocinas inflama), principalmente pelo aumento/indução da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, na TO, sugerindo que o peptídeo N6 possa ter uma contribuição nos mecanismos na TO, favorecendo a produção dessas citocinas com atividade imunorreguladora. Considerando a diferença significativa do perfil funcional de resposta aos aloantígenos do doador entre TO (REGULA) e RC (INFLAMA) ($p=0,0007$ para citocinas regula e $p < 0,0001$ para citocinas inflama), principalmente pela inibição das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1B, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, IFN- γ e MCP-1, na TO, concluímos que o desvio REGULA da via indireta de alorreconhecimento dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, com inibição dessas citocinas, tenha um papel importante nos mecanismos envolvidos na tolerância operacional. Em conclusão os mecanismos em curso na tolerância operacional, modulam a resposta celular antígeno-específica dirigida a desafios antigênicos no transplante, envolvendo o desvio REGULA da resposta a peptídeos HLA-DR do doador, a participação da autoimunidade imunorreguladora à Hsp60, ao mesmo tempo em que há preservação da resposta inflamatória a patógenos.

Descritores: Transplante de rim, Tolerância ao transplante, Rejeição de enxerto, Linfócitos T, Citocinas, Antígenos, Citomegalovírus, chaperonina 60.

Abstract

Carmona, P. ***The role of antigen-specific cellular response in operational tolerance.*** [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016

Operational tolerance (OT) is a rare phenomenon, taking place in transplanted individual who do not reject, following the complete withdrawal of immunosuppressive drugs for at least one year. Understanding the mechanisms involved in operational tolerance will contribute to opening new pathways for the development of novel immunoregulatory therapies, in transplantation. We investigated whether the state of operational tolerance displays a functionally differential profile of the antigen-specific cellular response, directed to three groups of antigens, relevant in the context of allotransplantation: donor alloantigens (HLA-DR peptides), pathogen-derived antigens (cytomegalovirus peptides - CMV) and autoantigens (peptides derived from the Hsp60 – self-antigen displaying immunoregulatory (REG) and proinflammatory (INFLAMMA) properties). We determined cytokine production (by Luminex) and the proliferative response of different CD4⁺ T cell subsets (by FACS), displaying predominantly REG or INFLAMMA activities, in response to the three types of antigens, comparing OT (n=6) with Chronic Rejection (CR: n=8), individual with stable graft function, taking conventional immunosuppression (Sta: n=8), and healthy individuals (HI: n=7). In concordance with our hypothesis, the cellular immune response is differentially modulated in operational tolerance, giving rise to an immunoregulatory deviation in the response to HLA-DR donor peptides, preserving the proinflammatory response to pathogen peptides (CMV). Despite significant differences in the responses to CMV peptides, between OT and CR (p=0.02 and p=0.02 for REG cytokines and CD4⁺ subsets; p=0.008 and p=0.003 for INFLAMMA cytokines and CD4⁺ subsets), OT is able to preserve the INFLAMMA response in relation to the physiologic state (HI). This INFLAMMA profile of the response to CMV peptides is maintained by the induction/increase of the proinflammatory cytokines, IL-1B, IL-17, IFN- γ , MCP-1 and MIP-1B, some inhibition of REG cytokines and inhibition of Treg proliferation, suggesting that these are important mechanisms in the

preservation of immunocompetence to deal with pathogens, in OT. In the cellular response to autoantigens, we highlight the N6 peptide that induced a differential profile in OT (REG profile) compared to CR (INFLAMMA profile) ($p=0.001$ for REG cytokines; $p=0.04$ for INFLAMMA cytokines), due to the induction/increase of IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, in OT, suggesting that N6 may contribute to the underlying mechanisms in OT, favoring the production of these immunoregulatory cytokines. Taken the marked differences in the response to donor alloantigens, between OT (predominantly REG) and CR (predominantly INFLAMMA) ($p=0.0007$ for REG cytokines and $p < 0.0001$ for INFLAMMA cytokines), due to the inhibition of the proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, IFN- γ and MCP-1, in OT, we conclude that the immunoregulatory deviation in the indirect pathway of allorecognition, directed to donor HLA-DR peptides, leading to the inhibition of these cytokines, has an important role in the mechanisms of tolerance. In conclusion, the ongoing immunoregulatory mechanisms in operational tolerance, modulate the antigen-specific cellular response to relevant antigenic challenges in allotransplantation, involving a REG deviation in the response to donor HLA-DR peptides, together with the participation of immunoregulatory autoimmunity to Hsp60, while preserving the proinflammatory response to pathogens.

Keywords: kidney transplantation, transplantatiion tolerance, graft rejection, T-lymphocytes, Cytokines, Antigens, Cytomegalovirus, chaperonin 60.

1. Introdução

Imunobiologia do Transplante

O transplante de órgão é uma importante modalidade terapêutica capaz de substituir tecidos ou órgãos com falência irreversível. Na clínica, dentre os vários transplantes de órgãos, o mais frequente é o transplante renal. No Brasil, no período de 2005 a 2015, cerca de 90% dos transplantes realizados foram de rim (ABTO, 2015).

Pode-se dizer que grande parte do conhecimento existente sobre a imunobiologia dos transplantes, dá-se pelos estudos envolvendo transplante renal. Grandes avanços foram dados na clínica para manter a função do enxerto a longo prazo, mas a despeito disso muitos desafios clínicos persistem, e um destes é a rejeição (Nankivell e Kuypers, 2011).

A rejeição do órgão consiste na deterioração funcional e estrutural do enxerto podendo culminar na perda completa de sua função (Lechler et al., 2003). Após o transplante, o processo cirúrgico já promove um microambiente inflamatório, logo após uma intensa atividade inflamatória é estabelecida decorrente da interação do linfócito T e seu receptor (TCR, do inglês, *T cell receptor*) com as moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade, do inglês, *major histocompatibility complex*) (Watts, 1997).

Em humanos, as moléculas MHC são chamadas de antígenos leucocitários humanos (HLA do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) que são os principais antígenos polimórficos contra os quais está dirigida, a resposta alogeneica. Os genes que fazem parte do sistema HLA em humanos localizam-

se no cromossomo 6, tendo, assim, uma variabilidade muito grande entre indivíduos. As moléculas do sistema HLA são classificadas em classe I (HLA-A, B e C) que são expressas por células nucleadas, e moléculas de classe II que são expressas, principalmente, em células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês, *Antigen Presenting Cells*), (HLA-DR, DP e DQ) (Krensky *et al.*, 1990; Mandelbrot, 2010) ou em células ativadas que expressam MHC classe II, após expostas a citocinas como o IFN- γ , como por exemplo, as células endoteliais e linfócitos T (Mandelbrot, 2010).

As moléculas HLA são os principais alvos de reconhecimento antigênico pelos linfócitos T. Assim, quando doador e receptor não apresentarem as mesmas moléculas HLA, o receptor reconhece as moléculas do doador, culminando na ativação do sistema imune, o que desencadeia respostas inflamatórias dirigidas ao enxerto (Rapaport *et al.*, 1965, Muller *et al.*, 2011), levando à rejeição do órgão transplantado, se o sistema imune não for suprimido (Klein J. *et al.*, 2000; Almoguera, B. *et al.*, 2014).

Apesar das moléculas HLA do doador, expressas na superfície celular do aloenxerto, serem os principais alvos de reconhecimento pelos linfócitos T é importante destacar que a alorreatividade também pode induzir uma resposta imune com perfil imunorregulador, como descrito para a via indireta de alorreconhecimento, por nosso grupo (Spadafora-Ferreira *et al.*, 2001) e por outros (Waaga *et al.*, 2001).

Mecanismos da rejeição

A rejeição no transplante renal é mediada por diversos mecanismos e componentes imunológicos. Ela é classificada de acordo com critérios adotados em Banff, em função de alterações histopatológicas e fatores imunológicos envolvidos (Solez et al., 2007). A rejeição pode ser classificada como aguda ou crônica, mediada por células T ou por anticorpos (Solez et al., 2007; Haas et al., 2013).

A rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre quando há anticorpos na circulação de receptores, com especificidade para antígenos expressos nas células do enxerto. A ligação desses anticorpos às células-alvo desencadeia a ativação do sistema complemento, cascata de coagulação, das cininas que levam à trombose e necrose do tecido (Magee, C. C., 2006; Wahrmann *et al.*, 2006). Há relatos de indivíduos que possuem anticorpos dirigidos ao aloenxerto, não fixadores de complemento, possuem um prognóstico semelhante aos indivíduos sem anticorpos dirigidos ao aloenxerto (Cornell et al., 2008), sugerindo que a ativação do sistema complemento determina um pior prognóstico do transplante. A rejeição aguda mediada por células T, é caracterizada por células infiltrantes no órgão, inflamação monocítica e linfocitária, ativação e proliferação de células T auxiliares o que leva à lesão tecidual e necrose (Kindt, 2007). Esse tipo de rejeição, em geral, responde bem às terapias imunossupressoras.

Mesmo com avanços laboratoriais e o desenvolvimento de novas terapias imunossupressoras, a rejeição crônica (RC) é a maior limitação para o sucesso do transplante alogeneico de órgãos (Nankivell et al., 2003). Ademais, como

citado anteriormente, em pacientes transplantados com rejeição crônica, tumores e as infecções são mais frequentes devido ao uso de imunossupressores (Toungouz et al., 2003).

No transplante renal a rejeição crônica mediada por anticorpos, pode apresentar depósitos de C4d (um produto da degradação do componente C4 da via clássica do complemento), nos capilares peritubulares e nas alças dos capilares do glomérulo, podendo ocorrer também a presença de anticorpos doador específicos no soro. Na rejeição crônica mediada por células T, há presença de fibrose intersticial, infiltrado mononuclear e atrofia tubular, infiltração com células mononucleares, inflamação intersticial, fibrose e glomerulonefrite (Solez et al., 2007).

O que diferencia a fase aguda da crônica, é a formação de fibrose levando à perda da função do órgão ou tecido (Ibrahim et al., 1995). Além disso, ambos os mecanismos celulares e humorais podem existir, ao mesmo tempo, no processo de agressão do enxerto. Os mecanismos efetores da rejeição incluem, principalmente, a citotoxicidade mediada por linfócitos T ou dependentes de anticorpos, produção de citocinas e sua ação lítica devido ao recrutamento de células inflamatórias, ativação do complemento, e reação de hipersensibilidade tardia (Cai e Terasaki, 2005; Coelho & Kalil, 2009), entre outros.

É importante lembrar que, diante de intensas respostas inflamatórias ao longo da vida, o sistema imune possui mecanismos reguladores essenciais na manutenção da homeostase do organismo (Monk *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2006). Na alorreatividade devido ao intenso estímulo inflamatório desencadeado pelo enxerto há um desequilíbrio dessas respostas reguladoras,

sendo necessário o uso de drogas imunossupressoras para manutenção da sobrevida enxerto.

As drogas imunossupressoras disponíveis, atualmente, são capazes de inibir a rejeição aguda, suprimindo a resposta mune inflamatória, entretanto, pouco controlam o desenvolvimento da rejeição crônica, além de causarem efeitos colaterais significativos como, desordens metabólicas, mielossupressão e nefro e cardiotoxicidade (Demirkiran et al., 2008), alta suscetibilidade a infecções (Fishman & Rubin, 1998), malignidades (Dantal et al., 1998; Hojo et al., 1999).

Entre as principais drogas imunossupressoras estão: a ciclosporina A e o tacrolimus que, além de agir inibindo a atividade da calcineurina, podem causar efeitos adversos como nefrotoxicidade e hipertensão arterial (Nankivell et al., 2004). O mofetil micofenolato e a azatioprina que têm ação inibidora de IMPDH (enzima inosinomonofosfato-desidrogenase), mas apresentam efeitos como mielossupressão. Os corticosteróides afetam a concentração e função de leucócitos; a rapamicina inibe a transcrição de RNA mensageiro, mas pode causar problemas de cicatrização, hiperlipidemia (Borie et al., 2004), além de afetar a qualidade de vida do indivíduo transplantado. Também são usados no transplante renal, imunobiológicos, como o ATG (globulina anti-timocitária) e o anticorpo monoclonal anti-CD3 (Mota et al., 2009). Permanece o desafio de minimizar os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras (Danger et al., 2008) e proporcionar esquemas com menores doses (Page et al., 2012).

Imunorregulação no Transplante

Após o estímulo dos linfócitos pelos antígenos do doador, as células estimuladas polarizam seu perfil para atividades pró-inflamatória ou imunorreguladora. Com a polarização do perfil celular ocorre maior ou menor produção de citocinas associadas ao perfil celular adotado. É importante destacar que os linfócitos Th diferenciam-se em subpopulações que são capazes de produzir diferentes citocinas e, exercerem funções auxiliares distintas. É importante destacar que linfócitos T com outras especificidades antigênicas, inclusive dirigida a autoantígenos, como as Hsps, são recrutados e podem participar da resposta imune ao alotransplante (Caldas et al., 2006).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos de células e que agem de maneira autócrina, parácrina e endócrina, sendo frequentemente envolvidas na propagação e controle da resposta imunológica (Tonet e Nobrega, 2008). Elas são peças chave no processo de comunicação celular, e no transplante possuem papel, por vezes, predominantemente inflamatório. Na presença das citocinas IL-2, IL-18 e TNF- α , as APCs, os linfócitos T ativados e células NK levam ao aumento de células Th1 que são células envolvidas com respostas inflamatórias exacerbadas (Cardoni et al., 2005)

Citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo: interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e quimiocinas são descritas como indutoras do aumento do processo inflamatório (Belotto, 2011) estando

relacionadas à rejeição aguda, fibrose intersticial, atrofia celular e infecções (Cardoni et al., 2005).

Foi observado em enxertos renais com rejeições agudas, maior expressão de citocinas com perfil predominantemente Inflama MCP-1/CCL2 e CCR5 (receptor celular de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) na região túbulo intersticial justacortical (Robertson, 2000; Ruster et al, em 2004), também, maior expressão de IL-6 (Oliveira, 1997) e MCP-1/CCL2 (Robertson, 2000).

Em contrapartida às pro-inflamatórias, as citocinas anti-inflamatórias são caracterizadas por atuarem na diminuição do processo inflamatório, pela inibição de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas destacam-se: a interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), assim como, o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) (Belotto, 2011).

As citocinas podem apresentar diversos papéis biológicos na biologia do transplante renal, tais como, comunicação celular, recrutamento, diferenciação e ativação de diversos subtipos celulares (Hu e Knetchle, 2006).

As células T CD4⁺ são um grupo heterogêneo, funcionalmente, que apresentam diversas populações distintas (Mosmann et al., 1986). Em estudos iniciais, foi descrito que células T *naïves* não produziam IL-4, no entanto, ao serem estimuladas pelo receptor de célula T (TCR, do inglês *Tcell receptor*) na presença de IL-4, podiam torna-se produtoras dessa citocina (Killar et al., 1987; Le Gros et al., 1990). A diferenciação de células T CD4⁺ auxiliares (Th, do inglês *T helper cells*), para um perfil Th2, pela ação de IL-4, e diferenciação de células Th1 pela ação de IL-12, parecia bem estabelecida. No entanto, observou-se que a citocina IL-12 induzia uma produção de IFN- γ , mediada pela expressão de T-bet (um fator de transcrição), levando ao aumento na produção

de IFN- γ , cuja neutralização diminui a diferenciação de células para um perfil Th1 (Szabo et al., 2000; Lighvani et al., 2001).

As células T CD4⁺ são importantes na rejeição de enxertos alogeneico (Krieger et al., 1996; Zhao et al., 2000). A participação de células T CD4⁺ é intensificada quando há disparidade no MHC de classe II entre o receptor e o doador, assim como as células T CD8⁺ participam da rejeição mediada por disparidades no MHC classe I, em relação a alorreatividade pela via direta (Rosenberg et al., 1987; Christianson et al., 1993).

As populações de células T podem ser caracterizadas em subpopulações com diferentes funções, como células T reguladoras (CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺), efetoras (CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻), células T *naive* (CD45RA⁺CD62L⁺) e de memória: memória central (CCR7⁺CD27⁺CD45RA⁻); memória efetora (CCR7⁻CD27⁻CD45RA⁻) e memória efetora altamente diferenciada - TEMRA (CD45RA⁺CD62L⁻) (Hamann et al., 1997; Sallustro et al., 1999, Fukada et al., 2002).

As células T *naive*, ao encontrar o antígeno em órgãos linfoides, podem se ativar, proliferar e gerar clones, diferenciando-se em células T efetoras (Estágio de Expansão). Após a eliminação do antígeno, há morte de aproximadamente 90% das células efetoras (Estágio de Contração ou Morte) (Kaech et al., 2002). Nesta etapa, ocorre também, diminuição dos mediadores inflamatórios, e, ocorre a transição de células T CD4 efetoras, para células T CD4 de memória (McKinstry et al., 2008).

As células restantes serão aquelas que sobreviveram a este processo (estágio de memória), de forma que, quanto maior o número de células efetoras entrando em apoptose ou morte, menor a quantidade de células T de

memória (Kaeche et al., 2002). As células T de memória podem ser ativadas por baixas quantidades do antígeno (Lanzavecchia e Sallustro, 2001).

As células T CD4⁺ efetoras têm funções específicas como secreção de citocinas e indução da diferenciação de células T CD8⁺ (capazes de eliminar células que apresentam antígeno que estimulou a expansão clonal). Sendo também responsáveis pela ativação e modulação da produção de imunoglobulinas em células B.

As células T de memória podem ser definidas como qualquer célula T que tenha entrado em contato com um antígeno estando em uma fase pós efetora (McKinstry et al., 2008), sendo normalmente encontradas por longos períodos após a exposição ao antígeno, permanecendo presentes na circulação sanguínea e no baço (Dutton et al., 1998). As células T CD4⁺ de memória, são capazes de estimular APCs, linfócitos B e células T CD8, tendo a capacidade de reconhecer um antígeno específico, iniciar uma resposta rápida e secretar citocinas pró-inflamatórias (McKinstry et al., 2008).

As subpopulações de células T de memória central, são caracterizadas por expressar CCR7 e produzir a citocina IL-12 após a reativação, atuando nos órgãos linfoides secundários, o que auxilia na geração de células efetoras. As células T de memória efetora expressam baixos níveis de CCR7 (McLeod et al., 2009), as quais estudamos neste trabalho. Portanto, as células T de memória são funcionais e fenotipicamente heterogêneas (Berard e Tough, 2002).

Além dos linfócitos com atividade inflamatória, células T reguladoras também possuem um papel importante na imunobiologia do transplante. As Treg fazem parte dos mecanismos de tolerância, e atuam suprimindo ou

controlando respostas inflamatórias, sendo assim, importantes na manutenção da homeostase imunológica (Josefowicz e Rudensky, 2012).

As Tregs são classificadas como Treg tímicas (Abbas et. al., 2008), que adquirem capacidade imunorreguladora durante o seu desenvolvimento no timo foram chamadas, inicialmente, de *Treg naturais* (Kyewski e Klein, 2006). No entanto, a nomenclatura tem sido rediscutida, argumentando-se ser mais adequado não usar o termo natural e sim usar o termo em relação à sua origem tímica (Abbas, et. al., 2008), ou Treg induzidas periféricas (iTregs), quando adquirem atividade supressora na periferia, em diferentes contextos de respostas imunes, *in vivo*.

As Tregs tímicas são CD4+, têm capacidade imunossupressora, expressam a cadeia α (alfa) do receptor de IL-2 (CD25), e o fator de transcrição Foxp3 (do inglês, *forkhead box P3*) (Kyewski e Klein, 2006; Chen et al., 2003), são, geralmente, autorreativas e são selecionadas positivamente, no timo, a despeito de apresentarem alta avidéz a antígenos próprios (Sakaguchi et al., 1995; Muller et al., 2011; Hsieh et al., 2012). A expansão de Tregs tímicas *in vivo*, parece ser importante na regulação da inflamação em diferentes contextos, inclusive no transplante (Nishimura et al., 2004). É relatado que o maior número de células Tregs e da expressão de mRNA do gene de Foxp3 estão, associados ao momento de diminuição da imunossupressão em indivíduos com função estável do enxerto, mas não em indivíduos com rejeição, sugerindo que as Tregs favorecem a indução de um perfil imunorregulador e o controle da inflamação no enxerto (Pons et al., 2008). Assim, tanto na tolerância ao próprio como no contexto de transplante, as

células Tregs tímicas e induzidas desempenham um papel importante no controle da inflamação.

As células Treg induzidas podem ter diferentes especificidades antigênicas, inclusive dirigida à proteína de choque térmico 60 (Zanin-Zhorov et al., 2006), e diferentes fenótipos, com ou sem a expressão do fator de transcrição FOXP3. Entre os diferentes fenótipos, podemos citar as Treg CD8+/CD28 negativas (Colovai et al., 2003), CD4+/LAP+ (do inglês *latency-associated peptide*) (Hall, 2010), Tregs Th1 (Sakaguchi et al., 2008) e Tregs Th2. Sabe-se que a citocina IL-2 contribui para a sobrevivência das células T efetoras na periferia, porém a utilização de anticorpos bloqueadores neutralizantes anti-IL-2, *in vitro*, anula a função supressora das células Tregs, indicando que a IL-2 é também importante para as Tregs (Lafaille, et al., 2002; Thornton et al., 2004).

As células Tregs têm a habilidade de suprimir inflamação tecido-específica, em resposta a antígenos expressos diretamente em tecidos inflamados (Cohen, 2000), e sua ativação, geração e indução podem ser desencadeadas no início da resposta imune celular (O’Gorman et al., 2009). Estas células também exercem atividade imunorreguladora por diversos mecanismos: inibem a proliferação de células T efetoras, principalmente pela secreção de IL-10, mas podem também produzir TGF- β (fator de crescimento transformador β , do inglês, *Transforming growth factor* β) (Chen et al., 1994; Sakaguchii et al., 1995), por mecanismos de interações célula-célula, entre outros.

A participação de células Treg no contexto do transplante, na indução de tolerância, se restringem a modelos experimentais. Por exemplo, em

transplante de pele, foi observado que células Tregs antígeno-específicas *in vivo*, podem mediar uma imunossupressão protegendo o enxerto (Nishimura et al., 2004), por outro lado, podem ser induzidas, *in vitro*, por diferentes protocolos experimentais, visando o seu uso em terapia celular em diversas condições patológicas, para o controle de inflamação.

Em estudos do nosso grupo, foram encontrados baixos números da população de células Treg $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ em indivíduos transplantados com rejeição crônica (Moraes-Vieira et al., 2010), sugerindo que a sua deficiência esteja envolvida no processo de RC.

Células Tregs são essenciais para tolerância ao próprio (Sakaguchi, 2004) e na tolerância alogeneica (Braudeau *et al.*, 2007; San Segundo *et al.*, 2010) no contexto do transplante, sendo inibidas pelas citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-27, secretadas por células Th1 e Th2, atuando como mediadoras do recrutamento de neutrófilos para locais da inflamação (Ivanov, et al., 2007; MacGeachy e Cua, 2008).

Tolerância Imunológica

O sistema imune é fundamental no equilíbrio biológico do organismo, atuando como uma rede complexa integrada, capaz de interagir com componentes celulares e moleculares próprios (autoantígenos), e antígenos exógenos. Sua ação envolve a captação de sinais do microambiente que modulam a resposta imune, mantendo o estado de tolerância imunológica ao próprio, ao mesmo tempo em que é capaz de eliminar microrganismos

patogênicos e células tumorais prejudiciais ao organismo. (Kyewski e Klein, 2006).

A tolerância ao próprio é um estado de não agressão ao próprio organismo e é, atualmente, classificada de duas formas: central (que ocorre nos órgãos linfóides primários: no timo, para os linfócitos T, e na medula óssea, para os linfócitos B), e a periférica (que ocorre nos órgãos linfóides periféricos: linfonodos e baço) (Kyewski e Klein, 2006; Kindt et al., 2007).

Os precursores de linfócitos T chegam ao timo, passam por um processo de amadurecimento e sofrem seleção positiva ou negativa (Anderton et al., 2001; Savage e Davis, 2001). Na seleção positiva, os timócitos se ligam com intensidade intermediária a antígenos próprios apresentados pelas moléculas MHC, são selecionados positivamente, amadurecem e saem para a periferia povoando os órgãos linfóides periféricos (Liu, 2006). Na seleção negativa, ocorre forte ligação aos antígenos próprios apresentados pela molécula MHC, e os timócitos morrem por apoptose, ou por negligência, quando não se ligam a antígeno algum (Anderton et al., 2001; Savage e Davis, 2001; Hsieh et al., 2012; Rouhani et al., 2014). A seleção tímica parece desempenhar um importante papel na autotolerância exercida pelos linfócitos T, tanto por diminuir a possibilidade de maturação de timócitos autorreativos de alta avides, que podem ser ativados e se tornar agressivos na periferia, como pela seleção de células Tregs (Cohen, 1992; Cohen, 2007; Muller et al., 2011).

O fator de transcrição AIRE (*do inglês, autoimmune regulator ou regulador autoimune*), expresso nas células epiteliais da medula do timo, é determinante na expressão de antígenos próprios tecido-específicos no timo (Ruan et al., 2007). Na tolerância central, o fator de transcrição AIRE parece

desempenhar um papel importante na tolerância ao próprio, e acredita-se que o processo de tolerância central seja importante para a manutenção da homeostase e da tolerância ao próprio.

Esta expressão parece ser fundamental para a manutenção da homeostase, uma vez que mutações que levam à não expressão deste gene (AIRE), induzem o desenvolvimento de doenças autoimunes (Liston e Goodnow, 2005). Sua importância parece ser devida tanto à eliminação de clones T e B fortemente autorreativos, e potencialmente patogênicos, como à seleção positiva de células Tregs autorreativas (Anderson et al., 2002; Anderson et al., 2005).

Acredita-se que a tolerância periférica seja mediada por um processo de contínuo reconhecimento de antígenos próprios. Na periferia, a regulação da atividade efetora de linfócitos pode ocorrer por diversos mecanismos como: (i) incapacidade de proliferação e produção de IL-2 por linfócitos (Knoechel et al., 2006); (ii) não ativação de linfócitos, pela falta de sinais coestimulatórios, após o encontro do linfócito com o antígeno, ou ativação do sinal supressor pela molécula CTLA-4 (Anderton et al., 2001; Zheng et al., 2007); (iii) apoptose pela repetida estimulação antigênica dos linfócitos T (Anderson et al., 2005); culminando na eliminação de células autorreativas efectoras (Wells et al., 2001); (iv) ignorância das células T pela não ligação do linfócito a qualquer antígeno (Miller e Heath, 1993); (v) pela indução e atuação de células T reguladoras (Tregs) (Chen et al., 2004; Carrier et al., 2007a; Carrier et al., 2007b; Li et al., 2015), células T CD8⁺ de memória (Rao et al., 2010) e células B reguladoras, cuja atividade parece estar relacionada com a produção de IL-10 (Iwata et al., 2011; Rosser et al., 2015); (vi) pela participação de células

dendriticas (DC) tolerogênicas (Harry et al., 2010); (vii) pelo desvio da resposta imune celular de Th1 para Th2 e, provavelmente também (Li., 2014), (viii) pela participação de anticorpos com propriedades imunorreguladoras.

Outros contextos de regulação que se tornaram clássicos na imunologia, mostram a importância dos processos biológicos que ocorrem na vida intra-uterina para a tolerância imunológica alogeneica na relação materno-fetal.

Acredita-se que múltiplos caminhos da tolerância alogeneica tenham sido selecionadas ao longo da evolução, sendo ela fundamental na perpetuação da espécie em todos os animais com reprodução sexuada e fecundação interna. Assim, a tolerância imunológica materno-fetal que é alogênica, pode ser muito importante para se compreender a tolerância imunológica no transplante alogeneico (Erlebach, 2013), pois, embora haja uma resposta inflamatória dirigida ao feto, há predominância de uma resposta imunorreguladora (Caetano, 2009). Apesar de não se ter uma compreensão dos mecanismos que protegem o feto, supõe-se que o trofoblasto (que não apresenta a molécula HLA-DR) e a expressão de HLA-G possuam função importante neste estado de tolerância imunológica, pois fazem interface entre as células maternas e fetais (Hviid TV, 2006).

Acredita-se, hoje, que diferentes tipos celulares e vários mecanismos imunorreguladores ativados, individualmente ou em conjunto, frente às diversas experiências imunológicas vividas pelo indivíduo, ao longo da vida, sejam cruciais na manutenção do equilíbrio biológico. Diversos desses mecanismos imunorreguladores têm sido descritos como atuantes na imunobiologia do transplante.

Proteína de Choque Térmico – Hsp60

Na Teoria da Seleção Clonal, postulou-se que os clones de linfócitos T autorreativos seriam eliminados no timo, sendo liberados para a periferia, somente aqueles não reativos ao próprio (Burnet, 1959). Essa teoria trouxe uma importante contribuição para a compreensão sobre o funcionamento do sistema imune e durante várias décadas era a visão mais aceita do sistema imune. Hoje, sabe-se que as células autorreativas fazem parte do repertório fisiológico do sistema imune (Cohen, 2000, Luna et al., 2007; Lio e Hsieh, 2010), podendo resultar em respostas imunes tanto pró-inflamatórias como ter atividade imunorreguladora. As Tregs tímicas são exemplos de células autorreativas com atividade regula inflama. Esses dados têm dado suporte para a o conceito de autoimunidade benéfica e imunorreguladora, em contraposição ao conceito dominante nos anos 50' de que a autoimunidade ocorria apenas na doença.

As Hsps (do inglês, *Heat Shock Proteins* ou proteínas de choque térmico) (Wheeler et. al., 1995; Pockley et al., 2005; Zanin-Zhorov et al., 2003), descobertas por Ferruccio Ritossa e colaboradores (Ritossa, 1962), são proteínas chaperonas amplamente distribuídas na natureza, e compreendem uma família de moléculas altamente conservadas, presentes em todas as células eucarióticas e procarióticas (Hightower e Guidon, 1989). As Hsps foram descritas, primeiramente, em larvas de *Drosophila melanogaster* onde os genes se alteravam durante a incubação em resposta ao aumento da

temperatura (Ritossa, 1964). São moléculas conservadas evolutivamente, apresentando importância em todas as células vivas (Van Eden *et al.*, 2005).

As Hsps são classificadas de acordo com o peso molecular (Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp65, Hsp70, Hsp90, além das Hsps pequenas). Expressas, constitutivamente, em todos os seres vivos, são moléculas conservadas filogeneticamente e têm sido apontadas como alvo de reconhecimento cruzado após a resposta a antígenos de microrganismos nas infecções, induzindo autoimunidade patológica (Lamb *et. al.*, 1989).

As Hsps aumentam em diversas situações de estresse metabólico, como em células com deficiência nutricional, estresse oxidativo, aumento da temperatura, tratamento com drogas anti-inflamatórias, exposição a mediadores de inflamação e infecção viral (Morimoto e Santoro, 1998). Além disso, respostas Hsp-específicas favorecem a proteção contra infecções microbianas (Zügel e Kaufmann, 1999).

Na “Teoria do perigo”, proposta por Matzinger e Fuchs, destacam-se também respostas imunes dirigidas a antígenos não necessariamente infecciosos, mas sinalizadores de “perigo” como as proteínas de estresse, que desencadeiam respostas imunes inflamatórias (Fuchs e Matzinger, 1996; Matzinger *et. al.*, 2002). Esta teoria foi objeto de intenso debate na comunidade científica. Sabe-se, porém, que as proteínas de estresse nem sempre desencadeiam uma resposta imune inflamatória e podem também estar envolvidas na imunorregulação (Cohen, 2007).

Há dados na literatura apontando que as Hsps podem ativar linfócitos T via receptor TLR2 (do inglês, *Toll-like receptor 2*), portanto, na presença de alta concentração de Hsp60, o TLR2 aumenta a adesão celular de células T (Zanin-

Zhorov et al., 2003). Em experimentos com camundongos transplantados, foi mostrado que a alta expressão de Hsp60 no camundongo receptor selvagem leva a um retardo na rejeição do aloenxerto de pele e o desvio de resposta Th1 para Th2, podendo regular a resposta imune ao aloenxerto (Birk et al., 1999). Há trabalhos mostrando que indivíduos apresentando casos graves de esclerose múltipla apresentam altos níveis de autoanticorpos contra a hsp60, em comparação a indivíduos saudáveis (Quintana *et al.*, 2008).

A interação da Hsp60 com células do sistema imune pode induzir respostas pró inflamatórias e imunorreguladoras (REGULA/INFLAMA), nosso grupo tem investigado a resposta imune à Hsp60 no contexto do transplante. Temos dados mostrando ocorrer uma resposta imune celular dirigida à proteína Hsp, em condições inflamatórias, na resposta ao aloenxerto (Caldas et al., 2004), e no período tardio pós alotransplante em momentos de estabilidade do enxerto (Caldas et al., 2006).

Também, foi observado que indivíduos sadios têm resposta proliferativa de linfócitos T à Hsp60 (Granja, 2000), e que PBMCS estimuladas com HSP60, em humanos, produzem citocinas IL-10 (Caldas, 2005). Dados do nosso grupo, mostram também que autoanticorpos anti-Hsp60 humana estão distribuídos na população (Victoria *et al.*, 2007) indicando uma resposta humoral fisiológica, relacionada com a manutenção da homeostase.

As Hsps podem estar envolvidas na tolerância ao aloenxerto, em modelos experimentais, sendo alvo de reconhecimento pelos linfócitos T presentes no enxerto, além das moléculas MHC (Pockley, 2001). No contexto do transplante renal humano, nosso grupo sugeriu um papel imunorregulador para a Hsp60, com base nas observações de que populações de linfócitos T

periféricos e infiltrantes do enxerto podem produzir IL-10, *in vitro*, em resposta ao estímulo com a proteína Hsp60 (Caldas et al., 2006). Além disso, também foi observado um perfil Th2 com produção de IL-4, associado a períodos tardios do pós transplante, sem rejeição, sugerindo como o repertório T reativo à Hsp60 estaria envolvido na regulação da resposta imune, no transplante humano (Granja et al., 2004).

Considerando que o equilíbrio REGULA/INFLAMA é essencial na manutenção do equilíbrio biológico, favorecendo uma resposta efetora ou controlando a inflamação (Coelho e Faria, 2011), em diferentes contextos, analisaremos se os peptídeos da Hsp60 podem também participar da imunobiologia da tolerância operacional, resultando em autorreatividade celular com um perfil diferencial imunorregulador.

Tolerância operacional

A indução de tolerância ao aloenxerto, tem sido bem sucedida com uso de diversas estratégias experimentais. Mas ainda é um desafio na clínica. Nos modelos experimentais já foram utilizadas diferentes estratégias, como: injeção intratímica de antígenos do doador (Turvey *et al*, 1999; Jones *et al*, 1998), inibição da ativação de células T pelo bloqueio da coestimulação por meio de proteínas de fusão (Vogel *et al.*, 2013), transplante de medula óssea (Sharabi *et al.*, 1989; Pilat *et al*, 2015). Alguns destes protocolos já foram testados em humanos, como o transplante de medula óssea (van Rood *et al.*, 2002). Atualmente, existem ensaios clínicos em andamento testando-se terapia celular no transplante (Jeroen *et al.*, 2015).

No entanto, há hoje na clínica, um grupo especial de indivíduos chamados de tolerantes operacionais, que apresentam função estável do enxerto, mesmo após a suspensão de imunossupressores por um período maior ou igual há um ano. Portanto, o estado de tolerância operacional (TO) é definido como um estado de estabilidade do órgão transplantado no qual o indivíduo apresenta um sistema imunológico imunocompetente, com características funcionais normais, sem haver sinais de rejeição (Ashton-Chess et al., 2006; Brouard et al., 2008; Hernandez-Fuentes e Lechler, 2010; Brouard et al, 2012).

Apesar de parecer mais frequente nos transplantes hepáticos (Thomson et al., 2001; Mazariegos et al., 2005; Demetris et al., 2009), a tolerância operacional, tem sido descrita no transplante renal (Strober et al., 2000; Brouard et al., 2005; revisado por Ashton-Chess et al., 2006).

As experiências imunológicas vivenciadas por cada indivíduo levam à formação de um repertório de células reativas que podem favorecer o desenvolvimento do estado de tolerância. É importante uma visão global dos diversos caminhos imunológicos que possa envolver este estado de tolerância.

Apesar de um número crescente de publicações sobre pacientes tolerantes operacionais, ainda não são bem conhecidos os mecanismos envolvidos neste estado, e muito tem sido investigado por diferentes grupos (Hernandez-Fuentes e Lechler, 2010; Roedder et al, 2012, Brouard et al, 2012; Chowdhury et al, 2013). Determinar os principais mecanismos envolvidos no estado de TO, assim como biomarcadores confiáveis para o seu diagnóstico, pode trazer uma contribuição importante para a identificação de pacientes que podem, eventualmente, evoluir de forma favorável, como os TO, e mesmo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas imunorreguladoras.

Na análise de células T, observou-se baixo acúmulo de transcritos de citocinas tanto Th1, quanto Th2, podendo ser sugerido um estado de hiporresponsividade (Brouard et al., 2005). Também, na análise de células T periféricas, com o fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, observou-se semelhança entre tolerantes operacionais e saudáveis, diferentemente dos indivíduos com rejeição crônica, que apresentaram números inferiores (Braudeau et al., 2007), a análise da resposta inata no sangue periférico e no enxerto, observou que indivíduos tolerantes apresentavam baixa expressão de TLR4 em comparação com rejeição crônica (Braudeau et al., 2008).

No contexto do transplante renal, alguns perfis de diferenças foram relatados na literatura, como o aumento da expressão gênica de moléculas relacionadas à via TGF- β (Brouard et al., 2007), o repertório diferencial de TCR (Miqueu et al., 2010), ausência de anticorpos anti-doador HLA específicos (Sagoo et al., 2010) e números de células T reguladoras Foxp3 preservados (Louis et al., 2006; Pons et al., 2008).

Na análise de células B em TO, no transplante renal, verificou-se a expressão diferencial de genes específicos de células B (Sagoo et al., 2010; Newell et al., 2010; Lozano et al., 2011), com maiores porcentagens e números absolutos de células B da periferia (Newell et al., 2010; Louis et al., 2006; Pallier et al., 2010) e ausência de anticorpos anti-HLA doador-específico no soro (Sagoo et al., 2010). Também foi observado que, em indivíduos tolerantes, as células B estimuladas apresentaram maior razão TGF- β /IFN- γ (Sagoo et al., 2010).

Nosso grupo também tem estudado potenciais mecanismos envolvidos na tolerância operacional no transplante renal. Nossos principais dados mostram

que o grupo tolerante operacional apresenta diversas similaridades aos indivíduos saudáveis, em relação aos números de células B reguladoras (Bregs) (Silva et al., 2012) e Treg (Moraes-Vieira et al., 2012), enquanto os grupos de rejeição crônica e estável, apresentam menores números dessas subpopulações imunorreguladoras, sugerindo que a sua preservação é importante nos mecanismos de TO.

Os dados do nosso grupo também apontam que o fator GATA3 desempenha um papel importante na indução/manutenção do estado de tolerância operacional, sugerindo que um desvio para a resposta imune do tipo Th2 possa ter uma importância na manutenção de um estado com características imunorreguladoras nos TO (Moraes-Vieira, 2012). A respeito do papel das células Th2 no transplante, há trabalhos que falam desse subtipo celular como tendo papel imunorregulador (Waaga et al., 2001), outros, destacam seu papel no processo de rejeição (Pirenne et al., 2005). Entretanto, de acordo com estudos do nosso grupo, os indivíduos TO, com função estável do enxerto e TO, parecem possuir um perfil diferenciado com aumento significativo da expressão de GATA-3 (Moraes-Vieira, 2012).

Diversos pesquisadores têm comparado parâmetros imunológicos relacionados com a atividade das células T na tolerância operacional (Louis et al, 2006; Braudeau et al, 2007; Pons et al, 2008), no transplante renal e de transplante de fígado (Martínez-Llordella et al, 2007; Sánchez-Fueyo, 2010), e têm apontado diferenças imunológicas específicas de cada órgão em estado de tolerância operacional (Heidt e Wood, 2012). Foi visto que, pacientes em estado de tolerância operacional, podem apresentar aumento da produção de citocinas potencialmente reguladoras, como IL-10 e TGF- β (Alberú et al., 2004),

mas não foi observada diferença no número absoluto de células T regs entre indivíduos transplantados hepáticos em estado de tolerância operacional e indivíduos saudáveis (Li et al., 2004).

Sabendo que os indivíduos tolerantes operacionais alcançaram um estado de equilíbrio com o enxerto, nos perguntamos se, neste estado imunorregulador, a resposta celular antígeno-específica dirigida a três grupos de antígenos: aloantígenos relevantes no transplante (peptídeos da molécula HLA-DR), autoantígenos da Hsp60 que podem ter atividade pró-inflamatória e imunorreguladora, e antígenos do CMV, importantes microrganismos nas infecções no transplante ocorreu de forma diferencial. Apesar de os pacientes em TO não apresentarem maior prevalência de infecções do que a população em geral, há poucas informações sobre a resposta imune celular antígeno-específica na TO, tanto em relação à via indireta de alorreconhecimento, como em relação à autorreatividade pró-inflamatória e imunorreguladora (Shiu et al., 2015).

Este estudo contribuirá para o avanço do conhecimento sobre a imunobiologia da TO no transplante renal e a modulação da resposta celular antígeno específica. Partimos da hipótese de que o indivíduo tolerante operacional tenha ativado mecanismos imunorreguladores e desenvolvido um perfil imunológico diferencial em relação à resposta imune celular antígeno-específica.

Dada a importância funcional de citocinas e de algumas subpopulações na resposta imune no desfecho do órgão transplantado, analisamos diferentes subpopulações de células T (linfócitos TCD4⁺ de memória efetora, efetoras e reguladoras), frente os citados estímulos antigênicos, em indivíduos

transplantados renais em TO, comparativamente com indivíduos em diferentes estados clínicos e indivíduos saudáveis. Com essas análises esperamos identificar parâmetros diferenciais com relação à resposta celular em indivíduos tolerantes operacionais. Podendo contribuir para maior compreensão deste estado imunológico com relação à evolução clínica do órgão transplantado, principalmente em relação às condições contrastantes: a tolerância operacional e a rejeição crônica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar se o estado de tolerância operacional envolve a modulação funcional diferencial da resposta celular antígeno-específica em relação a três grupos de antígenos relevantes no transplante: antígenos do doador, antígenos de patógenos e autoantígenos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar no estado de tolerância operacional, comparativamente a diferentes grupos clínicos e indivíduos saudáveis,

1. O perfil de produção de citocinas predominantemente imunorreguladoras (REGULA) ou pró-inflamatórias (INFLAMA) na resposta de células mononucleadas do sangue periférico dirigida aos três grupos antigênicos.
2. A resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T predominantemente REGULA ou INFLAMA dirigida aos três grupos antigênicos.

3. Material e Métodos

3.1 Delineamento Experimental

Figura 1. Delineamento experimental. **TO:** Tolerante operacional; **RC:** Rejeição Crônica; **EST:** Estável; **SAU:** Saudável; **PBMC:** Células Mononucleadas do Sangue Periférico; **CMV:** Citomegalovírus; **CFSE:** do inglês, *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*; **HSP:** Proteína do choque térmico. **REGULA:** aumento da expressão de citocinas ou de subpopulação celular predominantemente reguladoras ou diminuição da expressão de citocinas ou de subpopulação celular pró-inflamatória; **INFLAMA:** aumento da expressão de citocinas ou de subpopulação celular predominantemente inflamatórias ou diminuição da expressão de citocinas ou de subpopulação celular reguladora.

3.2 Sujeitos de pesquisa

Este projeto faz parte do Estudo Multicêntrico em tolerância operacional no Brasil, dentro do projeto coordenado pela Dra. Verônica Coelho: *“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”*, vinculado ao Instituto de Investigação Imunológica (iii) – Instituto do Milênio, CNPq (573879/2008-7), coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Kalil.

Neste estudo, os sujeitos de pesquisa são provenientes dos seguintes centros brasileiros integrantes: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Hospital São Lucas (Rio Grande do Sul, PUC-RS), Hospital Beneficência Portuguesa (SP) e Hospital de Londrina (PR). O Estudo Multicêntrico está em andamento desde 2005, e o material biológico foi coletado de todos os grupos após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2), também para os novos pacientes recrutados. Este projeto específico foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAPPesq no 0476/08).

A análise foi realizada em três grupos clínicos diferentes, seguindo o desenho experimental representado na figura 1:

Grupo TO- tolerante operacional: pacientes estáveis, com mais de um ano de transplante sem o uso de drogas imunossupressoras (≥ 1 ano).

Grupo RC- rejeição crônica: indivíduos com mais de um ano de transplante com diagnóstico de rejeição crônica, diagnosticado por biópsia.

Grupo EST- função estável do enxerto: transplantados com mais de um ano de transplante, com doses habituais de imunossupressores.

Grupo SAU- indivíduos saudáveis. Doadores ou não de órgãos.

A seleção dos pacientes é feita pelos seguintes critérios: Função estável: Limite de clearance de creatinina ≥ 45 ml/min, não apresentando variação negativa de clearance $> 10\%$ nos últimos 6 meses. Rejeição crônica: é medida clinicamente pelo aumento do nível de creatinina (superior a 2,0 mg/dl) no período de 4 a 6 meses, na ausência de fatores como nefrotoxicidade por drogas ou doenças e comprovada por biópsia renal, sendo verificada histologicamente por alterações vasculares caracterizadas por fibrose intimal e intersticial, atrofia difusa dos glomérulos, tubular, avançando para insuficiência renal crônica. Tolerância operacional: não utilização de imunossupressores por um período igual ou maior a 1 ano.

Neste estudo, analisamos ao todo, 6 indivíduos tolerantes operacionais (TO), 8 com rejeição crônica (RC), 8 estáveis com doses habituais de imunossupressores (EST) e 7 indivíduos saudáveis SAU), em um total de 29 sujeitos de pesquisa. Todos os indivíduos estudados possuem dados clínicos (Tabela 1) e demográficos (ANEXO 1). Para alguns ensaios, nem todos os indivíduos puderam ser estudados, por limitação de material, apontamos esta informação nos resultados.

3.3 Material coletado: Para a realização dos experimentos, foram feitas coletas de 40 ml de sangue em tubos com heparina.

Tabela 1. Dados clínicos nos diferentes grupos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	Origem do enxerto	Nº Total Disparidades HLA	Tipificação HLA-DR		Infecções (pós TX ou pós TO ou pós IE)	Sorologia CMV
				Receptor	Doador		
TO N=6	Ltx03	Fal	3	DR-1, DR-7	DR-1, DR-4	Não	CMV+
	Ltx10	VA (irmã)	1	DR-3, DR-17	DR-4 , DR-17	Não	CMV+
	Ltx16	VA (irmã)	0	DR-13, DR-16	DR-13, DR-16	Não	CMV+
	Ltx62	VA	3	DR-4, DR-0	DR-4, DR-0	Não	CMV+
	Ltx90	VA	0	DR-1, DR-3	DR-1, DR-3	Não	CMV+
	Ltx91	VA	0	DR-3, DR-13	DR-3, DR-13	Não	CMV+
RC N=8	Ltx04	Fal	6	DR-3, DR-13	DR-12, DR-8	HZ	CMV+
	Ltx05	Fal	6	DR-4, DR-0	DR-17, DR-9	HCV; HS; CDD; AMID, rCMV; PNMN	CMV+
	Ltx13	VA (pai)	2	DR-4, DR-13	DR-15, DR-13	rCMV; HPV; PNMN; HS; IU; TBC; ERI	CMV+
	Ltx24	Fal	5	DR-10, DR-16	DR-4 , DR-10	rCMV; H1N1	CMV+
	Ltx26	VNA	5	DR-14, DR-8	DR-7, DR-17	HZ; PANCag; PNMN	CMV+
	Ltx79	VNA	3	DR-4, DR-0	DR-15 , DR-0	POLIV, TBC, HZ	CMV+
	Ltx80	VA (mãe)	0	DR-7, DR-0	DR-7, DR-0	PNMN; CS; POLIV; HZ	CMV+
	Ltx87	VA (mãe)	0	DR-7, DR-0	DR-7, DR-0	CMV; EBV; RUB, HAV; PNMN; IU	CMV+
EST N=8	Ltx11	Fal	6	DR-15, DR-3	DR-1, DR-7	rCMV; HbsAg	CMV+
	Ltx12	Fal	6	DR-11, DR-13	DR-1, DR-7	CDD; rCMV	CMV+
	Ltx14	Fal	3	DR-8, DR-14	DR-14, DR-17	Sem intercorrências	CMV+
	Ltx19	Fal	3	DR-0, DR-13	DR-13, DR-4	HS	CMV+
	Ltx22	Fal	3	DR-13, DR-15	DR-4 , DR-13	Nd	CMV+
	Ltx31	VA (irmã)	3	DR-3, DR-11	DR-11, DR-18	CDD	CMV+
	Ltx33	Fal	5	DR-11, DR-14	DR-1 , DR-14	Nd	CMV+
	Ltx71	Fal	2	DR-4, DR-13	DR-13, DR-13	rCMV	CMV+
SAU N=7	Ltx18	-----	-----	DR-14, DR-17	-----	Não	CMV+
	Ltx36	-----	-----	DR-1, DR-14	-----	Não	CMV+
	Ltx37	-----	-----	DR-12, DR-8	-----	Não	CMV+
	Ltx40	-----	-----	DR-4, DR-13	-----	Não	CMV+
	Ltx41	-----	-----	DR-17, DR-11	-----	Não	CMV+
	Ltx44	-----	-----	DR-4, DR-13	-----	Não	CMV+
	Ltx84	-----	-----	DR-4, DR-0	-----	Não	CMV+

TO: tolerância operacional. RC: rejeição crônica. EST: estável. SAU: saudável. Fal: falecido. VA: vivo aparentado. VNA: vivo não aparentado. HLA: *human leukocyte antigen* (anígeno leucocitário humano). CMV: citomegalovírus. IE: inclusão no estudo. HCV: vírus da hepatite C. HS: herpes simples. HZ: herpes zoster. CDD: candidíase. rCMV: recidiva de CMV. PNMN: pneumonia. HPV: vírus do papiloma humano. IU: infecção urinária. TBC: tuberculose. ERI: erisipela. PANCag: pancreatite aguda. POLIV: polioma vírus. HBs: hepatite B. HAV: vírus da hepatite A. CS: choque séptico. AMID: amidalite. RUB: rubéola.

3.4 Obtenção de células mononucleadas do sangue periférico: Na separação de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*), as amostras de sangue foram diluídas em solução salina isotônica e separadas em gradiente de *Ficoll-Hypaque* (densidade 1.077 g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após centrifugação por 30 minutos (min) a 800xg, a interface que contém células mononucleadas foi coletada, ressuspensa em salina, e centrifugada por mais 10 min a 700xg.

O sedimento celular foi lavado por duas vezes, e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 40 µg/ml de gentamicina (HC-USP, SP, Brasil), 1% de ciprofloxacina (HC-USP, SP, Brasil) e, posteriormente, centrifugadas por 8 min a 600xg. Logo após, ressuspensamos as células em 3 ml de meio RPMI. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade foi verificada com o corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA). Posteriormente, as células foram congeladas (conforme descrito abaixo).

3.5 Congelamento e descongelamento de células: Para o congelamento, a suspensão de células mononucleadas que estava em 3ml de meio RPMI, foi centrifugada a 600xg por 8 min e ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino inativado (Hyclone, South, Logan, UT, USA), e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Utilizamos alíquotas de 1ml de solução de congelamento para cada criotubo (10 a 15×10^6 células/ml). As células foram levadas para o freezer – 80°C e, posteriormente, armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da utilização. Para o descongelamento, após serem retirados do nitrogênio líquido, os criotubos foram colocados rapidamente em banho-maria a 37°C por 1 min. A suspensão de células foi transferida para um tubo contendo 10 ml de meio RPMI (Gibco, Rockville, MD, USA), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 40µg/ml de gentamicina (HC-USP, SP, Brasil), 1% de ciprofloxacina (HC-USP, SP, Brasil) e 10% de soro fetal bovino inativado (SBFi, Hyclone, South, Logan, UT, USA) e centrifugada por 8 min a 600xg por duas vezes. Logo após, foi verificada a viabilidade celular com o corante vital Azul de Tripan.

3.6 Marcação celular com CFSE: para o ensaio de proliferação, as PBMCs serão inicialmente marcadas com CFSE (do inglês, *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) (Molecular Probes, Eugene, OR). O CFSE (Life Technologies) difunde-se para dentro da célula e emite a fluorescência que permanece nas células, e, a cada ciclo de divisão celular, a intensidade da fluorescência diminui. Após descongelamento das PBMCs, elas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, *overnight* a fim de estabilizar as funções celulares. Após este tempo, deixamos as células em temperatura ambiente (TA) por 1h. Procedemos a centrifugação por 8 min a 600xg, ressuspendemos as células em 3ml de meio RPMI e realizamos a contagem das células em câmara de Neubauer, coradas com azul de tripan, para calcular a viabilidade

celular. Separamos uma alíquota como controle negativo (de células sem marcação), e partimos para a marcação com o CFSE. Apagamos as luzes, devido ao fato do CFSE ser sensível a luz. Para a marcação, partimos da concentração de 20×10^6 células diluídas em 2ml de PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline* – Life Technologies) contendo 2% de FCS inativado (*SBFi*, *Hyclone*, South, Logan, UT, USA). Portanto, utilizamos a concentração final de $3,5 \mu\text{M}$ de CFSE, as células foram incubadas em banho-maria a 37°C por 10 min, sendo, o falcon agitado a cada 3min, garantindo assim, a homogeneização do CFSE e sua mistura às células. Em seguida, o processo de marcação foi interrompido adicionando-se RPMI (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) gelado contendo 10% de FCS, e as células ficaram por 3min em gelo. Centrifugamos as células por 6min a $500 \times g$, descartamos o sobrenadante e acrescentamos 5ml de meio RPMI, e assim, repetimos a centrifugação por 3 vezes. Procedemos a contagem das células em câmara de Neubauer com corante vital Azul de Tripán. As células marcadas foram cultivadas com os antígenos previamente titulados e para ensaios funcionais de proliferação para posterior avaliação de proliferação por citometria de fluxo.

3.7 Seleção dos peptídeos: para selecionar os alopeptídeos, escolhemos uma das moléculas HLA-DR baseada na disparidade do doador com seu respectivo receptor (Tabela 2). Todos os sujeitos de pesquisa foram devidamente tipificados para HLA-DR de acordo com o protocolo (descrito em 3.12). Os peptídeos HLA-DR utilizados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Seleção dos peptídeos HLA-DR alo dos sujeitos de pesquisa dos diferentes grupos de estudo.

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	Receptor	Doador	HLA-DR Selecionado
TO N=6	Ltx03	DR-1, DR-7	DR-1, DR-4	DR-4
	Ltx10	DR-3, DR-17	DR-4 , DR-17	DR-4
	Ltx16	DR-13, DR-16	DR-13, DR-16	DR-13
	Ltx62	DR-4, DR-0	DR-4, DR-0	DR-4
	Ltx90	DR-1, DR-3	DR-1, DR-3	DR-1
	Ltx91	DR-3, DR-13	DR-3, DR-13	DR-13
RC N=8	Ltx04	DR-3, DR-13	DR-12, DR-8	DR-8
	Ltx05	DR-4, DR-0	DR-17, DR-9	DR-17
	Ltx13	DR-4, DR-13	DR-15 , DR-13	DR-15
	Ltx24	DR-10, DR-16	DR-4 , DR-10	DR-4
	Ltx26	DR-14, DR-8	DR-7, DR-17	DR-17
	Ltx79	DR-4, DR-0	DR-15 , DR-0	DR-15
	Ltx80	DR-7, DR-0	DR-7, DR-0	DR-7
	Ltx87	DR-7, DR-0	DR-7, DR-0	DR-7
EST N=8	Ltx11	DR-15, DR-3	DR-1, DR-7	DR-7
	Ltx12	DR-11, DR-13	DR-1, DR-7	DR-7
	Ltx14	DR-8, DR-14	DR-14, DR-17	DR-17
	Ltx19	DR-0, DR-13	DR-13, DR-4	DR-4
	Ltx22	DR-13, DR-15	DR-4 , DR-13	DR-4
	Ltx31	DR-3, DR-11	DR-11, DR-18	DR-18
	Ltx33	DR-11, DR-14	DR-1 , DR-14	DR-1
	Ltx71	DR-4, DR-13	DR-13, DR-13	DR-13
SAU N=7	Ltx18	DR-14, DR-17	-----	DR-4
	Ltx36	DR-1, DR-14	-----	DR-16
	Ltx37	DR-12, DR-8	-----	DR-16
	Ltx40	DR-4, DR-13	-----	DR-7
	Ltx41	DR-17, DR-11	-----	DR-8
	Ltx44	DR-4, DR-13	-----	DR-16
	Ltx84	DR-4, DR-0	-----	DR-7

Os peptídeos sintéticos alogeneicos foram derivados de moléculas HLA-DR alogeneicas, correspondentes a uma disparidade presente no doador (para os indivíduos transplantados) ou, simplesmente, derivados de uma molécula HLA-DR não presente no sujeito de pesquisa estudado (para os indivíduos saudáveis). Deste modo, utilizamos diferentes peptídeos HLA-DR para os diferentes sujeitos de pesquisa (Tabela 2).

Os alopeptídeos HLA-DR foram selecionados baseados nas disparidades doador/receptor e analisando a sua potencial antigenicidade

usando-se o programa de predição IEDB (Immune Epitope Database And Analysis Resource - <http://www.iedb.org/#>). Estes peptídeos, foram sintetizados pela empresa GLS Ltd (GL Biochem (Shanghai) Ltd) com uma pureza de 90%. Os peptídeos foram preparados a uma concentração de 1mg/ml, em DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Fizemos alíquotas de 100µl e armazenamos no freezer -20°C até o momento de uso. Utilizamos a concentração de 2,5 µg/ml do peptídeo HLA-DR.

Tabela 3. Sequências dos peptídeos HLA-DR sintéticos utilizados

Nomenclatura	Sequência do Peptídeo sintético	Molécula HLA-DR
SHLA-1	DWTFQTLVMLETVPRSGEVYT	DR-1, DR-4[1], DR-8, DR15[1]
SHLA-2	GLLFLGAGLFIYFRNQKGHSG	DR-16
SHLA-3	LFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGF	DR-4[2], DR-17[1]
SHLA-5	FNGTERVRFLDRYFHNQEEENV	DR-17[2]
SHLA-6	FNGTERVQFLERLFYNQEEFV	DR-7[1]
SHLA-7	ALTVTLMVLSSPLALAGDTQPR	DR-4[3], DR-7[2]
SHLA-8	VLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSECH	DR-15[2]
SHLA-9	ECHFFNGTERVRFLDRYFHNQ	DR-13[1]
SHLA-10	ALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQV	DR-8
SHLA-11	KHECHFFNGTERVRFLDRYFYHQE	DR-4[4]
SHLA-12	WTFQTLVMLETVPRSGEVYTC	DR-13[2], DR-18

Para os peptídeos do antígeno CMV, utilizamos um pool de peptídeos PepTivator CMVpp65 (Miltenyi Biotec), constituído de 15 peptídeos com 11 aminoácidos sobrepostos, abrangendo a sequência completa da proteína pp65 do citomegalovírus humano, sendo um alvo imunodominante de células T. Foi preparada uma solução estoque de 30nmol/ml correspondente a 0,6µg/ml, alíquota em volume de 100µl e armazenada a -80°C.

Como autoantígenos, utilizamos os peptídeos de Hsp60 denominados (N6, N7 e C9) (Tabela 4) que foram selecionados baseados no perfil REGULA/INFLAMA, de dados anteriores do nosso grupo mostrando que os peptídeos N6 e N7, localizados na região N-terminal da HSP60, foram os

peptídeos que mostraram predomínio de modificações do perfil REGULA, e o peptídeo C9 da região C-terminal da HSP60, o que apresentou as maiores frequências de efeitos INFLAMA.

Tabela 4. Sequências dos peptídeos da proteína Hsp60 humana selecionados

Peptídeo	Sequência
N-terminal	
N6	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
N7	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
C-terminal	
C9	LTAEVWVTEIPKEEKDPGM

Assim como os peptídeos HLA-DR, estes também foram sintetizados pela empresa GLS Ltd (GL Biochem (Shanghai) Ltd) com uma pureza de 90%, diluídos a uma concentração de 1mg/ml e armazenados como explicado anteriormente, para os peptídeos HLA-DR.

3.8 Cultura celular com antígenos para coleta de sobrenadante para citocinas e ensaio de proliferação: Para os ensaios de proliferação celular, utilizamos placas de 48 poços semeadas com $0,5 \times 10^6$ células, previamente marcadas com CFSE em 0,5ml de meio RPMI completo (meio RPMI 1640, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 μ g/ml de gentamicina e 1% de ciprofloxacina) por poço. Uma alíquota sem marcar foi separada e usada como controle. Após a marcação com CFSE, as PBMCs foram estimuladas com 1 μ g/ml do anticorpo anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag BV, Tilburg, The Netherlands), como controle positivo, e com os diferentes antígenos, individualmente. Os alopeptídeos da molécula HLA-DR, foram acrescentados a

uma concentração de 50µg /ml, os peptídeos do CMV na concentração de 2,5µg/ml e os peptídeos de Hsp60 N6, N7 e C9 foram acrescentados a uma concentração de 20µg/ml, em função de padronizações anteriores. As condições de cultura foram as seguintes: 1) PBMCs sem marcar (Só Célula – sem estímulo); 2) PBMCs marcadas com CFSE (células sem estímulo); 3) Controle Positivo – PBMCs marcadas com CFSE + anti-CD3 1µg/ml; 4) PBMCs marcadas com CFSE com o estímulo antigênico (um peptídeo de diferentes antígenos). As culturas foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂, durante 7 dias para avaliação da proliferação. Após 48 horas de cultura, o volume de 70µl de sobrenadante foi coletado e congelado imediatamente a – 80°C, permanecendo lá, até a realização da dosagem de citocinas por Luminex. A cada 2 dias, foram acrescentados 200µl de meio RPMI às células. Após 7 dias em cultura, foi avaliada a proliferação de diferentes populações celulares por citometria de fluxo.

3.9 Ensaio de proliferação celular de subpopulações CD4⁺ T regs, efetoras e de memória efetora, frente aos antígenos: Alo, de CMV e Auto, por citometria de fluxo: Após 7 dias em cultura, as células da cultura, previamente marcadas com CFSE, foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços, centrifugamos por 8 min a 600xg, descartamos o sobrenadante, acrescentamos 150µl de tampão de lavagem de citometria (PBS-1x + 2% Soro Fetal Bovino + 0,02% Azida Sódica) e centrifugamos mais uma vez por 8 min a 600xg para uso na reação de imunofluorescência e marcação das subpopulações de células T CD4⁺: reguladoras (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺),

efetoras ($CD4^+CD28^+CD127^+CD45RA^-CD27^-$) e de memória efetora ($CD4^+CCR7^-CD27^-CD45RA^-$), com anticorpos previamente titulados (Tabela 5).

Tabela 5. Anticorpos utilizados (o respectivo fluoróforo e a sua titulação).

Especificidade	Fluoróforo	Título	Marca
CD45RA	PE-Cy5	1:20	BD
CD25	PE-Cy7	1:20	BD
CD27	V500	1:20	BD
CD127	PE	1:50	BD
CD127	PE-Cy TM 7	1:20	BD
CCR7	PE	1:20	BD
CD28	APC-H7	1:20	BD
CD4	APC	1:50	BD
CD4	APC-H7	1:100	BD
CD8	APC	1:50	BD
Foxp3	PerCP-Cy5.5	1:10	Ebioscience

Além dos anticorpos listados na tabela 5 para caracterização imunofenotípica das três subpopulações celulares e o efeito dos antígenos na sua atividade proliferativa, utilizamos o corante de viabilidade **FVS-450** (BD Horizon Fixable Viability Stain 450), para analisar apenas as células viáveis.

Os anticorpos utilizados são conjugados com FITC (isoticianato de fluoresceína, do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), PE (ficoeritrina, do inglês, *phycoerythrin*), APC (aloficocianina, do inglês, *allophycocyanin*), PE-Cy5 (ficoeritrina Cy5, do inglês, *phycoerythrin-Cy5*), BV500 ou AmCyan (proteína fluorescente anemonia majano ciano, do inglês, *anemonia majano cyan fluorescent protein*) ou APC-Cy7 (aloficocianina-7, do inglês, *allophycocyanin-Cy7*). Exceto para o Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, USA), todos os anticorpos utilizados são da BD (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Adicionamos 20µl do pool de anticorpos previamente titulados em cada poço e incubamos por 30 min, a 4°C, no escuro. Em seguida, acrescentamos

150µl de tampão Facs de lavagem a cada poço, centrifugamos por 8 min a 600xg, descartamos o sobrenadante e repetimos este procedimento por duas vezes. Após a marcação intracelular para Foxp3 (descrita abaixo), retiramos as células dos poços e colocamos em Tubos Facs, acrescentamos 300µl de Tampão Facs de Lavagem e deixamos a 4°C até o momento da leitura no citômetro.

Tabela 6. Fenótipo das diferentes subpopulações celulares CD4+

	V450	FITC	PE	PERCP	APC	APCCY7	PECY7	PECY5	V500
REGULADORA	FVS	CFSE	CD127 ⁻	Foxp3 ⁺		CD4 ⁺	CD25 ⁺		
EFETORA	FVS	CFSE			CD4 ⁺	CD28 ⁺	CD127 ⁺	CD45RA ⁻	CD27 ⁻
M. EFETORA	FVS	CFSE	CCR7 ⁻			CD4 ⁺		CD45RA ⁻	CD27 ⁻

3.10 Marcação intracelular para Foxp3: Primeiramente, centrifugamos as células que estavam nos tubos Facs com Tampão, mais uma vez, por 8 min a 600 x g, descartamos o sobrenadante, utilizamos o vórtex para ressuspender as células, e procedemos a fixação celular, adicionando 100µl do Tampão de Fixação (IC Fixation Buffer – eBioscience, Cat. nº. 00-8222). Incubamos as células no escuro a 4°C por 1 hora, em seguida, adicionamos 1ml de Tampão de Permeabilização-1x (Permeabilization Buffer 10x – eBioscience, Cat. No. 00-8333), centrifugamos por 8 min a 600 x g, descartamos o sobrenadante, acrescentamos 200µl do Tampão de Permeabilização-1x e realizamos esta lavagem por duas vezes. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, ressuspendemos o pellet celular em 100µl de Tampão de Permeabilização-1x, acrescentamos o anticorpo intracelular (anti-Foxp3) e incubamos no escuro, a 4°C por 30min. Em seguida, adicionamos o Tampão de Permeabilização-1x, centrifugamos por 8 min a 600 x g, descartamos o

sobrenadante, procedemos a lavagem duas vezes. Depois, acrescentamos 300µl de Tampão Facs de lavagem e deixamos a 4°C, até o momento da leitura no citômetro.

3.11 Aquisição e estratégia de análise das diferentes subpopulações

CD4+ T reg, efetora e de memória efetora: As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FacsCantoll (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA), pelo programa FACS DIVA Software (BD, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Primeiramente, realizamos a compensação por meio de beads a fim de selecionar positividade e negatividade para cada fluorescência. Adquirimos 100,000 eventos na região selecionada para linfócitos em função do tamanho e da granulosidade (SSC x FSC). A discriminação das células que proliferaram foi realizada dentro da região FITC+, tomando como ponto de corte as células sem marcação para CFSE. As células que proliferaram, perdem intensidade de fluorescência, ocorrendo um deslocamento para esquerda da população marcada com FITC (Figura 2).

Figura 2: Células em proliferação. Após serem marcadas com CFSE, as células em cultura, perdem a intensidade de fluorescência (deslocando-se para esquerda), indicando que proliferaram.

A análise, foi realizada no programa FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR) no qual selecionamos a região de linfócitos (Linfo), selecionando somente as células vivas (à esquerda do gráfico) e, dentro das células vivas, selecionamos CFSE para verificar proliferação. Também, a partir de células vivas, selecionamos a região CD4⁺ e, a partir daí selecionamos cada conjunto marcadores específicos para cada subpopulação. Usamos o programa de análise FlowJo, e a análise por *boolean gate*, que permite a análise de todas as combinações possíveis, entre os parâmetros avaliados. Assim, escolhemos o fenótipo desejado, para células T reguladoras (CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺) (Figura 3), células T efetoras (CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻) (Figura 4) e células T de memória efetora (CCR7⁻CD27⁻CD45RA⁻) (Figura 5), portanto, verificamos a proliferação dentro de cada uma destas subpopulações. Para a porcentagem de proliferação ou inibição da proliferação frente aos antígenos, consideramos a condição sem antígeno e calculamos da seguinte maneira: %Prolif de células que proliferaram frente ao estímulo, menos a % de células que proliferaram sem o estímulo, a porcentagem de células marcadas sem estímulo corresponde à proliferação espontânea.

Células T CD4⁺ Reguladoras – CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ FOXP3⁺

Figura 3. Estratégia de análise para a subpopulação de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺). Primeiramente, foram delimitadas as áreas das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A) e, em seguida delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados as células vivas, e a partir daí, selecionamos a região de CD4⁺ e, finalmente, delimita-se a região da subpopulação de células Treg. Em seguida, verificamos a % de proliferação induzida ou inibida pelos antígenos da população (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺) por análise *Boolean*.

Células T CD4⁺ Efetoras – CD4⁺CD27⁻ CD28⁺ CD45RA⁻ CD127⁺

Figura 4. Estratégia de análise para a subpopulação de células T efetoras (CD4⁺CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻). Primeiramente, foram delimitadas as áreas das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A) e, em seguida delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados as células vivas, e a partir daí, selecionamos a região de CD4⁺ e, finalmente, delimita-se a região da subpopulação de células T efetoras. Em seguida, verificamos a % de proliferação induzida ou inibida pelos antígenos da população (CD4⁺CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻) por análise *Boolean*.

Figura 5. Estratégia de análise para a subpopulação de células T de memória efetora ($CD4^+ CCR7^- CD27^- CD45RA^-$). Primeiramente, foram delimitadas as áreas das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A) e, em seguida delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados as células vivas, e a partir daí, selecionamos a região de CD4⁺ e, finalmente, delimita-se a região da subpopulação de células T de memória efetora. Em seguida, verificamos a % de proliferação induzida ou inibida pelos antígenos da população ($CD4^+ CCR7^- CD27^- CD45RA^-$) por análise *Boolean*.

3.12 Extração de DNA e tipificação HLA: Usamos PBMC ($0,2 \times 10^6$ células) ressuspensas em 200µl de PBS. Utilizamos o kit LABType® (One Lambda, California, USA). Em um tubo de 1,5ml foram adicionados 20µl de proteinase e 200µl de Buffer AL, e imediatamente, as células foram misturadas, com vórtex, para obtermos uma solução homogênea. Incubamos a 56°C, durante 10min, para promover a digestão das proteínas. Logo após, adicionamos 200µl de etanol a 96-100% ao lisado, misturamos bem e, depois, transferimos para uma coluna. Centrifugamos a coluna a 5900xg durante 1min à TA. Descartamos o tubo de coleta e colocamos a coluna em um tubo de coleta limpo, adicionamos 500µl de Buffer AW1, centrifugamos a coluna, mais uma vez, a 5900xg durante 1min à TA, descartamos o tubo de coleta e colocamos a coluna em um tubo de coleta limpo. Adicionamos 500µL de Buffer AW2, centrifugamos a coluna a uma

velocidade máxima – 16100xg por 3min à TA, descartamos o centrifugado e repetimos a centrifugação. Colocamos a coluna em um tubo de microcentrífuga de 1,5ml, estéril, adicionamos 200µl de Buffer AE e incubamos à TA durante 5min. Centrifugamos coluna 5900xg durante 1min à TA. Removemos e descartamos a coluna, e homogeneizamos a amostra de DNA extraída e eluída. Após este procedimento, realizamos a tipificação HLA, em uma placa de PCR limpa com 96 poços. Aliquotamos 2,5µl de Tampão de Desnaturação por poço, e acrescentamos 5µl por poço do DNA amplificado. Misturamos bem até a mistura ficar cor-de-rosa claro. Incubamos à TA, durante 10min, e acrescentamos 5µl de tampão de neutralização por poço, misturamos até a mistura ficar transparente, e, colocamos a placa no banho de gelo. Após, aliquotamos 38µl da Mistura de Hibridação, por poço, em todo o DNA neutralizado, e incubamos a placa em um bloco no termociclador a 60°C, durante 15min. Retiramos a placa e acrescentamos 100µl de Tampão de lavagem a cada poço, agitamos no vórtex, misturando a 1000xg durante 5min, retiramos o sobrenadante, deixando aproximadamente 10µl, realizando um total de 3 lavagens. Depois de remover o sobrenadante, acrescentamos 0,25µl de SAPE (estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina) – 1x por poço, colocamos na placa uma película para selagem de placas e submetemos ao agitador vórtex, misturando muito bem à baixa velocidade. Logo após, incubamos a 60°C no termociclador, durante 5min, retiramos a placa e acrescentamos 100µl de Tampão de Lavagem a cada poço. Colocamos na placa uma fina camada para selagem de placas nova e submetemos ao agitador vórtex misturando a 1000xg durante 5min. Depois, removemos o sobrenadante, acrescentamos o Tampão de lavagem até obter um volume final

de 80µl. Misturamos por pipetagem e transferir todas as amostras para uma microplaca de 96 poços para aquisição de dado. As reações foram lidas no citômetro de fluxo LABScan TM 200 (tecnologia Luminex) que é capaz de reconhecer a fluorescência da microesfera e da SAPE ligada à sonda. Um laser reconhece a cor da microesfera e outro laser reconhece a marcação com SAPE, determinando a positividade da reação. Os dados gerados pelo equipamento foram analisados no software HLA Fusion v. 3.0 para a determinação dos alelos.

3.13 Determinação da produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura frente aos diferentes antígenos, por “Luminex”: Após a estimulação das PBMCs com os diferentes peptídeos, o sobrenadante foi coletado (no tempo de 48h) e usado comparativamente nas condições com e sem estímulo antigênico, determinando a presença de citocinas secretadas pelas células presentes na cultura. A detecção foi realizada utilizando a técnica LUMINEX e o kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-Plex Panel The Bio –Plex Pro™ human*, da BioRad. Esse kit permite a quantificação de 17 citocinas que classificamos como predominantemente REGULA (imunorreguladora) ou INFLAMA (pró-inflamatória) (Tabela 7), em aproximadamente 4 horas. Para a realização do teste, utilizamos 50µl de sobrenadante de cultura. A concentração das citocinas de cada amostra foi calculada a partir da curva-padrão de cada citocina e os valores foram expressos em pg/ml. Os limites de detecção superiores e inferiores são denominados OOR (Fora do alcance, em inglês, *Out of Range*). Foram considerados válidos os valores acima do limite inferior de detecção e abaixo do limite superior de detecção. Os limites de quantificação de cada

citocina foram: IL-4 (OOR >0.82 e <3676.08); IL-5 (OOR >2.18 e <8953;), IL-7 (OOR >1.73 e <28975), IL-10 (OOR >2.46 e <27189.47), IL-13 (OOR >0.86 e <14996.07), IL-2 (OOR >8.3 e <10015.26), IL-1B (OOR >2.02 e <29090.07); IL-6 (OOR >6.32 e <23599,9), IL-8 (OOR >1.42 e <26599.9), IL-12 (OOR >2.76 e <43369.64), IL-17 (OOR >9.755 e <20735), G-CSF (OOR >0.72 e <2425.89), GM-CSF (OOR >197.63 e <49082), IFN- γ (OOR >41.1 e <39741.12), TNF- α (OOR >1.97 e <30517.8), MCP-1 (OOR >18,78 e <5861.92) e MIP-1B (OOR >5.88 e <21761.9). Os valores de pg/ml acima dos limites de detecção foram uniformizados utilizando-se o maior valor válido do limite de detecção para cada citocina. Assim, quando os valores em pg/ml eram menores do que o limite de detecção, uniformizamos colocando o menor valor válido, respeitando os valores de cada citocina. Para análise da quantidade de citocinas induzidas/aumentadas ou inibidas, na presença dos antígenos, foram descontados dos valores detectados na presença do antígeno da condição sem antígenos (produção espontânea de citocinas).

Tabela 7. Citocinas analisadas potencialmente reguladoras e inflamatórias

REGULADORA	PRÓ-INFLAMATÓRIA	REG/INF
Interleucina 4 - IL-4	Interleucina 1 beta - IL-1 β	Interleucina 2 - IL-2
Interleucina 5 - IL-5	Interleucina 6 - IL-6	
Interleucina 7 - IL-7	Interleucina 8 - IL-8	
Interleucina 10 - IL-10	Interleucina 12 - IL-12	
Interleucina 13 - IL-13	Interleucina 17 - IL-17	
	Fator estimulador de colônias de granulócitos - G-CSF	
	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos - GM-CSF	
	Interferon gama - IFN- γ	
	Fator de necrose tumoral alfa - TNF- α	
	Proteína quimiotática de monócitos - MCP-1	
	Proteína inflamatória macrofágica 1 beta - MIP-1 β	

3.14. Análise dos resultados considerando respostas do tipo

REGULA ou INFLAMA: Para análise da produção de citocinas e proliferação

das diferentes subpopulações celulares de PBMCs estimuladas com diferentes antígenos: aloantígenos HLA-DR do doador, antígenos do CMV e autoantígenos derivados da HSP 60, utilizamos os testes estatísticos descritos em 3.15. Fizemos dois tipos de análises: **a)** perfil de frequência de respostas e **b)** análise quantitativa dos níveis de citocinas e/ou das porcentagens de células em proliferação. Nessas análises foram utilizados os valores de quantidades de citocinas (expressos em pg/ml) e as porcentagens de proliferação para cada subpopulação celular estudada. Os valores foram calculados descontando-se o valor da citocina produzida ou da subpopulação em proliferação que foram estimuladas com o respectivo antígeno, do valor encontrado na condição sem estímulo (produção ou proliferação espontânea), para cada indivíduo.

Consideramos os efeitos dos peptídeos: **a)** induzir citocinas ou proliferação da subpopulação: quando não havia produção/proliferação espontânea e o peptídeo levou à produção ≥ 1 pg/ml (para citocina) ou $\geq 1\%$ (para subpopulação); **b)** aumentar a produção de citocinas ou proliferação da subpopulação: quando havia produção/proliferação espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina, ≥ 1 pg/ml (para citocina) ou da subpopulação, $\geq 1\%$ (para subpopulação); **c)** inibir a produção de citocinas ou proliferação da subpopulação: quando havia produção/proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos ≥ 1 pg/ml (para citocina) ou $\geq 1\%$ (para subpopulação); **d)** sem efeito: não modificou a produção de citocinas ou proliferação da subpopulação, em relação à condição sem estímulo (espontânea).

Quanto à classificação dos efeitos do antígeno ou tipo de resposta frente aos antígenos, na produção de citocinas consideramos: **1)** efeito REGULA:

indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA. **2)** efeito INFLAMA: aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Na classificação dos efeitos do antígeno na proliferação das subpopulações consideramos **1)** efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação T reguladora ou inibição das subpopulações efetora e de memória efetora. **2)** efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação das subpopulações efetora e memória efetora ou inibição da proliferação da subpopulação T reguladora. A razão Regula/Inflama corresponde à divisão da porcentagem do efeito Regula pela porcentagem do efeito Inflama. Foram comparadas as frequências de ocorrência dos efeitos REGULA, INFLAMA ou da ausência de tanto para a produção de citocinas como para a proliferação celular.

Para o perfil global, o cálculo foi realizado dividindo-se o número de eventos REGULA e INFLAMA, pelo número total de condições por cada grupo clínico. Nas tabelas dos resultados, marcamos de azul as respostas REGULA, em vermelho, as respostas INFLAMA e sem cor, não houve resposta.

Foram considerados como perfil predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e predominantemente INFLAMA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\leq 0,7$.

3.15. Testes estatísticos: Foram utilizados os testes não paramétricos, o Kruskal-walls (no qual utilizamos os valores de pg/ml para as citocinas e a porcentagem de células em proliferação para as subpopulações) comparando

os diferentes grupos clínicos, e para a análise dois a dois (entre os grupos) utilizamos o teste não paramétrico Mann Whitney, também considerando os valores de pg/ml para as citocinas e a porcentagem de células em proliferação para as subpopulações. O teste Qui-quadrado ou o Teste de Fisher foram usados para a comparação das frequências do perfil de respostas do tipo REGULA ou INFLAMA, seja para produção de citocinas, seja para proliferação das subpopulações. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa GraphPad Prism 6.0 (Graphad Software Inc., CA, EUA).

4. Resultados

4.1 Produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a estímulos com antígenos de diferentes origens: alogênicos, derivados de um microrganismo patogênico, e autólogos

Analizamos os efeitos de estímulos antigênicos de três diferentes origens - alogênicos, derivada de um microrganismo patogênico (CMV), e autóloga - em relação à produção de citocinas que apresentam perfil, predominantemente, imunorregulador (REGULA; IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13) ou pró-inflamatório (INFLAMA; IL-1B, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1B), e a citocina IL-2 que tem importância tanto na atividade REGULA quanto INFLAMA, comparando os diferentes grupos clínicos (Tolerância operacional: TO (n=06), Rejeição crônica: RC (n=07), Estáveis: EST (n=04) e Saudáveis: SAU (n=07)). Avaliamos a produção dessas citocinas nos sobrenadantes de cultura de PBMC, comparando as condições com e sem os estímulos antigênicos. Portanto, analisamos a produção de citocinas induzida e ou modificada sob efeito dos diferentes antígenos, assim como a produção espontânea, das diferentes citocinas REGULA e INFLAMA nos diferentes grupos clínicos.

Classificamos de efeito com perfil REGULA, quando observamos indução ou aumento da produção de citocinas REGULA ou diminuição de citocinas INFLAMA. O efeito com perfil INFLAMA foi justamente o oposto, indução ou aumento de citocinas INFLAMA, ou diminuição das REGULA; variação de $\geq 1\text{pg/ml}$).

4.1.1 Produção espontânea de citocinas (REGULA e INFLAMA), nos diferentes grupos clínicos

Observamos produção espontânea (Tabela 8) de, praticamente, todas as citocinas, com perfil predominantemente REGULA, assim como daquelas predominantemente INFLAMA, em todos os grupos clínicos de estudo (valores dentro dos limites de detecção para cada citocina). A frequência global de produção espontânea de citocinas do perfil REGULA foi maior para o grupo EST, e menor para o grupo RC (TO: 66,6%; RC: 37,1%; EST: 70%; SAU: 51,4%) (Tabela 8). Por outro lado, a frequência de produção espontânea de citocinas do perfil INFLAMA, foi menor para o grupo RC (TO: 83,3%; RC: 70,1%; EST: 84%; SAU: 85,7%). As razões REGULA/INFLAMA para a produção espontânea de todas as citocinas, foram maiores para os grupos TO e EST (TO: 0,8; RC: 0,5; EST: 0,8; SAU: 0,6). Assim, em relação à produção do conjunto das citocinas estudadas, a produção espontânea apresentou um perfil mais INFLAMA nos grupos de RC e de SAU, e mais equilibrado REGULA e INFLAMA na TO e no grupo de EST. Para determinar o efeito de cada estímulo antigênico, comparamos a produção de cada citocina na presença do antígeno em relação à produção espontânea (sem estímulo antigênico).

Consideramos a comparação entre a TO e RC importante para a identificação de diferenças que podem ter relevância em relação a potenciais mecanismos, tanto na TO como na RC. O perfil global das frequências de produção espontânea, do conjunto das citocinas, entre os grupos TO e RC, foi significativamente diferente ($p < 0,0001$, Qui-quadrado) (Figura 6).

Tabela 8. Produção espontânea de citocinas nos diferentes grupos clínicos

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	5,0	241,7	3,4	508,5	103,7	4201,8	36,7	305,0	12694,4	48,4	97,8	17,5	197,0	1213,1	577,9	1975,9	3032,0	REGULA: 66,6% INFLAMA: 83,3% RAZÃO REG/INF: 0,8
	Ltx10	2,4	2,5	2,5	9,1	7,7	4156,9	59,5	1884,2	9970,9	15,4	29,5	36,6	197,0	264,8	34,7	2129,7	576,7	
	Ltx16	1,1	2,0	1,7	2,4	0,8	8,0	11,5	134,2	2232,2	2,7	9,7	16,1	197,0	41,0	6,5	2352,3	292,1	
	Ltx62	2,5	3,8	2,5	49,2	9,1	2644,4	57,8	929,0	1346,3	24,5	44,3	48,6	197,0	340,1	40,4	1268,2	704,9	
	Ltx90	5,4	2,0	1,7	32,1	1,0	25,5	279,0	20482,0	7646,6	15,2	54,9	450,6	251,4	270,7	43,9	1790,6	21761,9 *	
	Ltx91	0,9	2,0	1,7	2,4	0,1	8,0	2,4	11,3	2049,7	2,7	9,7	12,0	197,0	41,0	4,7	1607,5	167,4	
	Media	2,9	42,3	2,2	100,6	20,4	1840,8	74,5	3957,6	5990,0	18,2	41,0	96,9	206,1	361,8	118,0	1854,0	954,6	
	Mediana	2,4	2,2	2,1	20,6	4,3	1334,9	47,2	617,0	4939,4	15,3	36,9	27,1	197,0	267,7	37,5	1883,2	576,7	
	% Positividade / Citocina	100,0%	50,0%	50,0%	66,6%	66,6%	66,6%	100,0%	100,0%	100,0%	66,6%	66,6%	100,0%	16,6%	66,6%	100%	100,0%	100,0%	
RC	Ltx04	0,8	2,0	1,7	2,4	0,8	8,0	2,0	6,0	9,1	2,7	9,7	0,7	197,0	41,0	1,9	43,0	5,8	REGULA: 37,1% INFLAMA: 70,1% RAZÃO REG/INF: 0,5
	Ltx05	2,0	2,0	1,9	8,4	2,1	2959,0	25,9	261,8	1778,7	45,6	39,2	11,2	197,0	185,6	18,5	1360,6	771,0	
	Ltx06	3,2	2,0	2,3	94,1	2,5	5174,3	49,2	2837,6	18322,0	35,6	85,0	53,0	197,0	385,2	41,2	2879,1	1718,1	
	Ltx07	3,0	2,0	1,7	3,9	0,8	12,3	51,9	2365,9	3228,4	5,5	27,1	55,0	197,0	115,2	19,5	1399,0	1448,7	
	Ltx08	1,2	2,0	1,7	2,6	0,8	8,0	21,7	163,9	2424,1	2,7	10,7	19,0	197,0	51,7	9,2	99,2	165,1	
	Ltx09	0,8	2,0	1,7	2,4	0,8	8,0	17,5	77,5	2612,2	2,7	9,7	5,6	197,0	41,0	1,9	28,6	50,7	
	Media	1,7	2,0	1,8	16,7	1,2	1168,2	25,2	832,7	4409,9	13,9	27,3	22,2	197,0	122,9	13,5	1039,2	598,0	
	Mediana	1,2	2,0	1,7	2,9	0,8	8,0	21,7	163,9	2494,6	2,7	10,7	11,2	197,0	51,7	9,2	1360,6	165,1	
	% Positividade / Citocina	57,1%	0,0%	28,5%	71,4%	28,5%	42,8%	85,7%	85,7%	100,0%	42,8%	57,1%	85,7%	0,0%	57,1%	71,4%	100,0%	85,7%	

Os valores expressos em pg/ml correspondem aos valores brutos da produção espontânea de citocinas pelas PBMC dos respectivos sujeitos de pesquisa de cada grupo clínico, nos sobrenadantes de cultura sem estímulo, após 48 horas, por Luminex. Para os valores detectados abaixo ou acima dos limites inferior e superior, respectivamente, substituímos os números pelos valores exatos dos limites de detecção, de cada citocina, visando normalizar os cálculos posteriores com os estímulos antigênicos. Os valores acima do limite superior de detecção foram discriminados com um*. As citocinas em azul foram consideradas, predominantemente, **REGULA**. As citocinas em vermelho, predominantemente, **INFLAMA**. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente **REGULA** ou **INFLAMA**. Os valores sombreados na cor azul indicam produção com perfil **REGULA**. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam perfil **INFLAMA**. Sem sombreamento de cor indica sem produção de citocinas ou sem perfil predominante **REGULA** ou **INFLAMA** (valores em verde). Calculamos a porcentagem de produção de citocinas com perfil **REGULA** ou **INFLAMA**, para cada citocina, por grupo clínico. Na última coluna calculamos a porcentagem global de produção de citocinas do perfil **REGULA** e **INFLAMA** para cada grupo clínico, e a respectiva razão de frequência **REGULA/INFLAMA**. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0.82 e < 3676.08); IL-5 (OOR > 2.18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1.73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2.46 e < 27189.47); IL-13 (OOR > 0.86 e < 14996.07); IL-2 (OOR > 8.3 e < 10015.26); IL-1B (OOR > 2.02 e < 29090.07); IL-6 (OOR > 6.32 e < 23,599.9); IL-8 (OOR > 1.42 e < 26599.9); IL-12 (OOR > 2.76 e < 43369.64); IL-17 (OOR > 9.755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0.72 e < 2425.89); GM-CSF (OOR > 197.63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41.1 e < 39741.12); TNF-α (OOR > 1.97 e < 30517.8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861.92) e MIP-1B (OOR > 5.88 e < 21761.9). Perfil global (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0001 e TOxSAU Qui-quadrado: 0,002).

Tabela 8 (continuação). Produção espontânea de citocinas nos diferentes grupos clínicos

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	2,0	2,0	1,9	2,7	3,2	4814,3	25,2	1047,6	2930,8	17,0	27,0	19,6	197,0	231,7	22,2	515,2	396,1	REGULA: 70% INFLAMA: 84% RAZÃO REG/INF: 0,8
	Ltx12	2,2	11,3	9,3	2,4	0,8	1744,5	39,3	6,0	2623,0	627,5	64,0	16,7	1049,1	469,3	1,9	30,6	42,7	
	Ltx14	3,9	2,7	2,4	22,6	5,3	2470,4	49,8	651,1	18322,0	16,2	14,7	25,6	197,0	41,0	15,7	3504,8	5,8	
	Ltx22	2,6	2,0	1,7	7,5	0,8	16,9	75,6	5193,3	5860,9	7,9	43,0	90,9	197,0	148,8	27,8	1487,4	1351,2	
	Media	2,7	4,5	3,8	8,8	2,5	2261,5	47,5	1724,5	7434,2	167,2	37,2	38,2	410,0	222,7	16,9	1384,5	449,0	
	Mediana	2,4	2,3	2,1	5,1	2,0	2107,5	44,5	849,3	4395,9	16,6	35,0	22,6	197,0	190,2	19,0	1001,3	219,4	
	% Positividade / Citocina	100,0%	50,0%	75,0%	75,0%	50,0%	100,0%	100,0%	75,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	25,0%	75,0%	75,0%	100,0%	75,0%	
SAU	Ltx18	1,8	2,0	1,7	26,8	0,8	11,7	55,8	2598,8	5461,1	7,0	24,5	184,9	197,0	89,0	13,4	1048,8	1454,6	REGULA: 51,4% INFLAMA: 85,7% RAZÃO REG/INF: 0,6
	Ltx36	2,1	2,0	2,2	19,6	3,8	6487,9	14,9	248,7	4101,5	12,7	21,3	13,5	197,0	206,1	23,8	2004,3	533,3	
	Ltx37	2,0	2,0	1,7	2,7	0,8	10,4	32,8	2069,4	2872,8	5,5	19,6	43,5	197,0	76,9	12,2	1211,5	1392,1	
	Ltx40	3,9	2,0	1,7	69,3	0,8	13,3	236,9	11610,4	4731,2	10,0	38,9	432,1	197,0	180,6	43,2	1967,5	21761,9 *	
	Ltx41	2,0	2,0	2,6	16,6	2,7	4963,5	24,7	870,1	3932,0	13,6	39,5	20,6	197,0	212,8	21,7	1448,9	549,5	
	Ltx44	0,8	2,0	1,7	2,4	0,8	8,0	2,0	12,5	1241,2	2,7	9,7	5,6	197,0	41,0	12,3	45,5	503,6	
	Ltx84	2,0	2,0	2,6	9,6	5,9	4018,3	28,7	472,6	1757,0	24,5	32,7	17,0	197,0	246,6	24,0	1006,2	359,4	
	Media	2,1	2,0	2,0	21,0	2,2	2216,2	56,5	2554,7	3442,4	10,9	26,6	102,4	197,0	150,4	21,5	1247,5	798,8	
	Mediana	2,0	2,0	1,7	16,6	0,8	13,3	28,7	870,1	3932,0	10,0	24,5	20,6	197,0	180,6	21,7	1211,5	541,4	
	% Positividade / Citocina	85,7%	0,0%	42,8%	85,7%	42,8%	85,7%	85,7%	100,0%	100,0%	85,7%	85,7%	100,0%	0,0%	85,7%	100,0%	100,0%	100,0%	

Os valores expressos em pg/ml correspondem aos valores brutos da produção espontânea de citocinas pelas PBMC dos respectivos sujeitos de pesquisa de cada grupo clínico, nos sobrenadantes de cultura sem estímulo, após 48 horas, por Luminex. Para os valores detectados abaixo ou acima dos limites inferior e superior, respectivamente, substituímos os números pelos valores exatos dos limites de detecção, de cada citocina, visando normalizar os cálculos posteriores com os estímulos antigênicos. Os valores acima do limite superior de detecção foram discriminados com um*. As citocinas em azul foram consideradas, predominantemente, **REGULA**. As citocinas em vermelho, predominantemente, **INFLAMA**. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente **REGULA** ou **INFLAMA**. Os valores sombreados na cor azul indicam produção com perfil **REGULA**. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam perfil **INFLAMA**. Sem sombreamento de cor indica sem produção de citocinas ou sem perfil predominante **REGULA** ou **INFLAMA** (valores em verde). Calculamos a porcentagem de produção de citocinas com perfil **REGULA** ou **INFLAMA**, para cada citocina, por grupo clínico. Na última coluna calculamos a porcentagem global de produção de citocinas do perfil **REGULA** e **INFLAMA** para cada grupo clínico, e a respectiva razão de frequência **REGULA/INFLAMA**. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0.82 e < 3676.08); IL-5 (OOR > 2.18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1.73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2.46 e < 27189.47); IL-13 (OOR > 0.86 e < 14996.07); IL-2 (OOR > 8.3 e < 10015.26); IL-1B (OOR > 2.02 e < 29090.07); IL-6 (OOR > 6.32 e < 23,599.9); IL-8 (OOR > 1.42 e < 26599.9); IL-12 (OOR > 2.76 e < 43369.64); IL-17 (OOR > 9.755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0.72 e < 2425.89); GM-CSF (OOR > 197.63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41.1 e < 39741.12); TNF-α (OOR > 1.97 e < 30517.8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861.92) e MIP-1B (OOR > 5.88 e < 21761.9). Perfil global (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0001 e TOxSAU Qui-quadrado: 0,002).

Figura 6: Produção Espontânea de citocinas – TOxRC e TOxSAU. Perfil global do número de casos de produção espontânea de citocinas com efeito predominantemente REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) e SEM PRODUÇÃO (cinza) na comparação entre os grupos TOxRC ($p < 0,0001$, Qui-quadrado) e TOx SAU ($p = 0,002$, Qui-quadrado)

Para algumas citocinas, observamos um perfil distinto. Por exemplo, a produção espontânea da citocina IL-5 foi REGULA na TO, e não houve produção pelo grupo RC. Além disso, para as demais citocinas REGULA, a frequência de produção espontânea de citocinas predominantemente REGULA (IL-4, IL-7 e IL-13) foi maior em TO do que em RC (por exemplo razão TO/RC para as citocinas REGULA: IL-4: 1,8; IL-7: 1,8 e IL-13: 2,3), indicando predomínio de perfil REGULA na TO.

Para as citocinas predominantemente INFLAMA, a produção espontânea também foi mais frequente no grupo TO, para algumas citocinas, como por exemplo para IL-12 (razão TO/RC: 1,5) e TNF (razão TO/RC: 1,4), sugerindo também maior frequência de estimulação destas vias moleculares inflamatórias, em TO.

A comparação com o grupo de indivíduos saudáveis pode ser informativa como parâmetro de maior ou menor ativação de diferentes vias

moleculares, em relação ao estado fisiológico. Para as citocinas do perfil REGULA, IL-4 e IL-13, as razões das frequências de produção espontânea entre TO e SAU também indicam um aumento na frequência de estimulação dessas vias na TO, principalmente para IL-13 (IL-13: razão TO/SAU: 1,5 e para IL-4: 1,2). Para as citocinas do perfil INFLAMA, a razão da frequência de positividade entre TO/SAU foi, basicamente, equilibrada para TNF (razão: 1), IFN- γ (razão: 0,8) e para IL-17 (razão: 0,8). O perfil global das frequências também foi predominantemente diferente entre TO e SAU ($p=0,002$, Qui-quadrado) (Figura 6).

No que diz respeito à quantidade de produção espontânea de citocina (pg/ml), encontramos diferenças significativas na comparação entre os grupos de estudo apenas para a citocinas IL-5 ($p=0,03$, Kruskal-Wallis) no entanto, não foi encontrada diferença na comparação, dois a dois, (Mann-Whitney). Destacamos as citocinas REGULA produzidas em maiores quantidades: IL-5 (valor máximo de 241,7 pg/ml, no grupo TO), IL-10 (valor máximo de 508,5 pg/ml, no grupo TO), IL-13 (valor máximo de 103,7 pg/ml, no grupo TO), e aquelas do perfil INFLAMA: IL-6 (valor máximo de 20482 pg/ml, no grupo TO), IL-8 (18322 pg/ml, nos grupos RC e EST), MCP-1 (3504,8 pg/ml, no grupo EST) e MIP-1B (21761,9 pg/ml, nos grupos TO e SAU), em todos os grupos clínicos e a IL-2 com altos níveis de produção espontânea (>6000 pg/ml) em SAU .

Figura 7: Produção Espontânea de citocinas REGULA IL-4, IL-5, IL-7 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de PBMC após 48h, por Luminex. TO: tolerância operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. A comparação entre os diferentes grupos dois a dois (Mann Whitney), não mostrou significância estatística, mas sim na comparação de todos os grupos apenas para a citocina IL-5 ($p=0,03^*$, Kruskal-Wallis). Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR $>0,82$ e $<3676,08$); IL-5 (OOR $>2,18$ e <8953), IL-7 (OOR $>1,73$ e <28975), IL-10 (OOR $>2,46$ e $<27189,47$).

Figura 8: Produção Espontânea de citocinas predominantemente REGULA (em azul) IL-13, sem perfil predominantemente Regula, nem Inflama, a IL-2 ecitocinas predominantemente INFLAMA (vermelho) IL-1B, IL-6, IL-8 e IL-12, nos sobrenadantes de cultura de PBMC após 48h, por Luminex. TO: tolerância operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. A comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis) ou dois a dois (Mann Whitney), não mostrou significância estatística. OOR (Fora do alcance, em inglês, *Out of Range*) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07), IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26), IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9), IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9), IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64).

Figura 9: Produção Espontânea de citocinas predominantemente INFLAMA IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, TNF, MCP-1 e MIP-1B, nos sobrenadantes de cultura de PBMC após 48h, por Luminex. TO: tolerância operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. A comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis) ou dois a dois (Mann Whitney), não mostrou significância estatística. OOR (Fora do alcance, em inglês, *Out of Range*) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735), G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89), GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082), IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12), TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8), MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9).

4.1.2 Aloantígenos: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos derivados de moléculas HLA-DR alogeneicas, nos diferentes grupos clínicos

Escolhemos peptídeos das sequências das moléculas HLA-DR como fonte de antígenos alogeneicos, para determinar se há um perfil diferencial na TO, em relação a efeitos REGULA e INFLAMA, comparativamente aos demais grupos clínicos, principalmente RC. Os peptídeos sintéticos alogeneicos foram derivados de moléculas HLA-DR alogeneicas, correspondentes a uma disparidade presente no doador (para os indivíduos transplantados) ou, simplesmente, derivados de uma molécula HLA-DR não presente no sujeito de pesquisa estudado (para os indivíduos saudáveis). Deste modo, utilizamos diferentes peptídeos HLA-DR para os diferentes sujeitos de pesquisa, descrito em material e métodos (Tabela 2). Esses peptídeos provocaram efeitos tanto de inibição, quanto de indução/aumento da produção de todas as citocinas estudadas, em todos os grupos (considerado diferenças com valores $\geq 1\text{pg/ml}$) (Tabela 9).

Considerando-se todas as citocinas estudadas, a frequência global dos efeitos dos peptídeos HLA-DR, apresentando o perfil REGULA, foi maior para o grupo TO, e menor para os grupos SAU e RC (TO: 44,8%; RC: 33%; EST: 40,6%; SAU: 32,1%). Ademais, a frequência do perfil INFLAMA, para o efeito do peptídeo HLA-DR na produção de citocinas, foi menor para o grupo TO e maior para o grupo RC (TO: 39,6%; RC: 53,6%; EST: 46,9%; SAU: 50,9%).

Tabela 9: Efeito do aloantígeno - HLA-DR -alo na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-3,1	-232,3	-1,5	-436,9	-83,8	-10,2	-2765,9	178,1	-1443,3	-36,1	-50,6	-0,8	0,0	-992,7	-554,6	676,9	-2691,6	REGULA: 44,8%
	Ltx10	0,4	10,5	0,3	70,7	34,0	84,3	-2681,8	1711,2	-5568,9	3,3	287,2	57,1	0,0	46,1	28,1	-666,7	987,1	INFLAMA: 39,6%
	Ltx16	-0,5	0,0	-1,0	-0,8	-0,3	26,7	-6,2	17,0	452,6	0,4	2,5	-1,8	-149,0	-6,1	20,8	-1561,1	594,5	Sem Efeito: 15,6%
	Ltx62	1,0	0,1	0,9	42,2	18,8	172,8	-926,6	10281,0	5698,3	-11,7	53,7	483,5	47,9	153,4	11,0	696,0	1527,6	RAZÃO
	Ltx90	-2,6	-2,0	-1,0	-16,2	-0,1	259,2	-9,0	-18212,1	-6398,3	-6,3	-17,7	-291,0	-108,8	-91,0	118,6	-1300,1	-19965,5	REG/INF: 1,1
	Ltx91	-4,9	-7,4	-0,2	-1410,5	-65,3	-244,1	-471,7	-1048,1	-1937,5	-289,7	-414,0	-80,0	-534,7	-25139,3	-4382,5	-1974,8	0,0	
	Media	-1,6	-38,5	-0,4	-291,9	-16,1	48,1	-1143,5	-1178,8	-1532,9	-56,7	-23,1	27,9	-124,1	-4338,3	-793,1	-688,3	-3258,0	
Mediana		-1,5	-1,0	-0,6	-8,5	-0,2	55,5	-699,1	97,5	-1690,4	-9,0	-7,6	-1,3	-54,4	-48,5	15,9	-983,4	297,2	
%Efeito REGULA:		16,7%	16,7%	0,0%	33,3%	33,3%		100%	33,3%	66,7%	66,7%	50%	50%	50%	66,7%	33,3%	66,7%	33,3%	
%Efeito INFLAMA:		50%	50%	50%	50%	33,3%		0,0%	66,7%	33,3%	16,7%	50%	33,3%	16,7%	33,3%	66,7%	33,3%	50%	
Razão REG/INF:		0,3	0,3	1	0,7	1		R	0,5	2	4	1	1,5	3	2	0,5	2	0,7	
RC	Ltx04	5,0	216,4	5,9	0,0	243,6	448,1	0,0	1051,8	816,3	58,7	129,5	35,7	57,6	639,6	28,8	763,1	0,0	REGULA: 33%
	Ltx05	1,8	1,3	1,5	409,3	7,5	174,9	-87,3	6612,7	9787,1	-22,5	52,3	116,3	47,9	251,4	92,5	1611,0	20990,9	INFLAMA: 53,6%
	Ltx13	1,0	0,3	0,2	615,6	2,4	81,8	-3394,3	17903,5	0,0	-6,7	-14,2	681,5	1,4	117,5	33,4	-324,3	20043,8	Sem Efeito: 13,4%
	Ltx24	1,5	-1,7	-0,4	24,4	1,1	96,4	7,8	4615,3	-1455,2	9,0	25,2	142,2	-34,5	123,6	26,9	-392,9	983,8	RAZÃO
	Ltx26	0,6	0,0	-1,1	9,5	-0,2	17,4	-2,0	344,5	2328,9	-1,0	41,0	18,7	-119,1	20,5	23,2	5861,92*	251,0	REG/INF: 0,6
	Ltx79	4,2	0,0	-0,9	107,1	0,4	305,0	13,0	23599,9*	-475,3	11,0	30,2	1045,1	-23,3	209,0	859,0	20,4	21711,2	
	Ltx87	3,8	-1,9	-0,6	164,7	-0,0	216,0	15,9	12611,5	-543,7	5,6	32,0	693,0	-52,2	171,4	206,0	-1444,9	4869,8	
Media		2,5	30,6	0,7	190,1	36,4	191,4	-492,4	7189,9	1494,0	7,7	42,3	390,4	-17,5	219,0	181,4	38,7	9835,8	
Mediana		1,8	0,0	-0,4	107,1	1,1	174,9	0,0	5614,0	0,0	5,6	32,0	142,2	-23,3	171,4	33,4	-152,0	4869,8	
%Efeito REGULA:		85,7%	28,6%	28,6%	85,7%	57,1%		42,9%	0,0%	42,9%	42,9%	14,3%	0,0%	57,1%	0,0%	0,0%	42,9%	0,0%	
%Efeito INFLAMA:		0,0%	28,6%	14,3%	0,0%	0,0%		42,9%	100%	42,9%	57,1%	85,7%	100%	42,9%	100%	100%	57,1%	85,7%	
Razão REG/INF:		R	1	2	R	R		1	1	1	0,8	0,2	1	1,3	1	1	0,8	1	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo HLA-DR, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo DR, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0007 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,005) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0001 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,0005).

Tabela 9 (continuação): Efeito do aloantígeno - HLA-DR -alo na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-18	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	LTX11	2,2	0,0	3,1	449,4	25,9	208,3	-3770,7	18814,0	15391,2	19,1	151,0	755,8	45,9	312,0	108,3	5861,92*	21365,8	REGULA: 40,6%
	LTX12	-1,4	-9,3	-7,6	12,2	3,4	-28,8	-1605,5	81,6	-2206,8	-624,8	-54,3	-10,4	-852,1	-428,2	1,4	330,9	-12,6	INFLAMA: 46,9%
	LTX14	-1,2	-0,5	-0,2	35,0	1,1	50,9	-1577,7	6077,5	-16780,0	3,3	22,6	206,3	0,0	304,1	10,1	-2697,3	386,6	Sem Efeito: 12,5%
	Ltx22	0,5	0,0	-1,1	6,9	0,3	65,6	-3,4	-1362,5	2264,0	1,1	-8,1	0,0	-54,2	-11,2	3,8	444,4	20410,7	RAZÃO
Media		0,0	-2,5	-1,4	125,9	7,7	74,0	-1739,3	5902,7	-332,9	-150,3	27,8	237,9	-215,1	44,2	30,9	-640,6	10537,6	REG/INF: 0,9
Mediana		-0,3	-0,3	-0,7	23,6	2,3	58,3	-1591,6	3079,5	28,6	2,2	7,3	103,1	-27,1	146,5	6,9	330,9	10398,6	
%Efeito REGULA:		25%	0,0%	25%	100%	75%		100%	25%	50%	25%	50%	25%	50%	50%	0,0%	25%	25%	
%Efeito INFLAMA:		50%	25%	50%	0,0%	0,0%		0,0%	75%	50%	75%	50%	50%	25%	50%	100,0%	75%	75%	
Razão REG/INF:		0,5	I	0,5	R	R		R	0,3	1	0,3	1	0,5	2	1	I	0,3	0,3	
SAU	Ltx18	1,2	0,0	-0,8	4,8	0,2	263,0	3,7	9797,6	-1472,1	1,9	8,6	399,7	-41,3	62,6	6,6	23,7	20307,3	REGULA: 32,1%
	Ltx36	0,2	5,9	-0,2	66,5	7,1	32,6	-5777,4	509,6	14220,5	4,8	29,3	17,4	0,0	-20,5	8,2	1419,8	395,8	INFLAMA: 50,9%
	Ltx37	5,8	0,0	-1,1	128,0	0,9	1129,2	31,8	23599,9*	3105,0	13,2	60,0	1005,7	250,2	352,3	338,0	480,7	20369,8	Sem Efeito: 17%
	Ltx40	3,5	-1,9	-0,9	152,4	0,9	2118,8	25,5	23599,9*	1789,5	2,9	42,1	2832,0	112,6	222,1	77,7	-345,4	0,0	RAZÃO
	Ltx41	-0,2	0,0	-0,3	77,9	2,8	43,6	160,5	2440,4	1438,7	-10,9	-39,5	57,5	59,8	289,9	1,8	-795,7	-191,7	REG/INF: 0,6
	Ltx44	0,0	0,0	-1,1	-1,4	0,0	0,4	-7,8	-4,2	-872,9	-1,8	-4,2	-4,7	-158,7	-33,2	-5,4	-35,3	-360,4	
	Ltx84	2,0	4,0	0,3	441,8	9,6	142,7	-3709,5	21285,6	16565,0	11,8	70,8	968,5	0,0	256,1	58,8	4018,5	21402,5	
Media		1,8	1,1	-0,6	124,3	3,0	532,9	-1324,7	6805,8	4967,7	3,1	23,9	753,7	31,8	161,3	69,4	680,9	8846,2	
Mediana		1,2	0,0	-0,8	77,9	0,9	142,7	3,7	2440,4	1789,5	2,9	29,3	399,7	0,0	222,1	8,2	23,7	395,8	
%Efeito REGULA:		57,1%	28,6%	0,0%	85,7%	42,9%		42,9%	14,3%	28,6%	28,6%	28,6%	14,3%	28,6%	28,6%	14,3%	42,9%	28,6%	
%Efeito INFLAMA:		0,0%	14,3%	28,6%	14,3%	0,0%		57,1%	85,7%	71,4%	71,4%	71,4%	85,7%	42,9%	71,4%	85,7%	57,1%	57,1%	
Razão REG/INF:		R	2	I	6	R		0,8	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,7	0,4	0,2	0,8	0,5	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo HLA-DR, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção ≥ 1 pg/ml; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina ≥ 1 pg/ml; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos ≥ 1 pg/ml da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR<: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-18 (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo DR, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0007 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,005) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,0001 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,0005).

As razões globais das frequências REGULA/INFLAMA, do efeito do peptídeo HLA-DR na produção de citocinas, foram predominantemente INFLAMA para os grupos SAU e RC, em contraste com efeitos mais equilibrados REGULA e INFLAMA na TO e EST (TO: 1,1; RC: 0,6; EST: 0,9; SAU: 0,6).

A comparação das frequências de efeitos REGULA ou INFLAMA, assim como da ausência de efeito, dos peptídeos HLA-DR, mostrou perfis significativamente diferentes entre os grupos de TO e RC, tanto para as citocinas REGULA ($p=0,0007$; Qui-quadrado) (Figura 10a), quanto para as citocinas INFLAMA ($p=0,0001$; Qui-quadrado) (Figura 10b), indicando a ocorrência de resposta celular alogeneica dirigida ao doador, diferencial, nesses dois distintos estados clínicos. Os efeitos sobre as citocinas INFLAMA foram mais REGULA no grupo TO, enquanto que os efeitos sobre as citocinas REGULA foram mais do tipo INFLAMA, na TO.

Figura 10: Peptídeos HLA-DR alo do doador. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TOxRC e TOxSAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM PRODUÇÃO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo HLA-DR alo na comparação entre os diferentes grupos. a) Citocinas REGULA: TOxRC ($p=0,0007$, Qui-quadrado) e TOxSAU ($p=0,005$, Qui-quadrado) e b) Citocinas INFLAMA: TOxRC ($p=0,0001$, Qui-quadrado) e TOxSAU ($p=0,0005$, Qui-quadrado).

É interessante destacar que o estado de TO também se diferenciou significativamente do estado fisiológico, no grupo SAU, em relação à resposta alogeneica, quando comparamos as frequências de efeitos REGULA ou INFLAMA, assim como da ausência de efeito, dos peptídeos HLA-DR alo, tanto para as citocinas REGULA ($p=0,005$; Qui-quadrado) (Figura 10a), quanto para as citocinas INFLAMA ($p=0,0005$; Qui-quadrado) (Figura 10b). Isto indica uma mudança na TO, em relação ao padrão fisiológico que mostrou predomínio INFLAMA na resposta alogeneica, em relação às citocinas INFLAMA e, de forma inversa, predomínio REGULA na resposta alogeneica, em relação às citocinas REGULA.

Nesse sentido, destacamos que, nos grupos TO e SAU, os efeitos dos peptídeos HLA-DR foram, preponderantemente, INFLAMA para as citocinas do perfil INFLAMA (Razões REGULA/INFLAMA por citocina: $\leq 0,7$ para RC: IL-6, IL-17, G-CSF, IFN- γ , TNF, MIP-1B; para SAU: IL-6, IL-12, G-CSF, IFN- γ , MIP-1B), em praticamente todas as citocinas INFLAMA estudadas. Para o grupo SAU, não observamos predomínio de efeito REGULA dos peptídeos HLA-DR, para nenhuma das citocinas INFLAMA.

Para o grupo de RC (Tabela 9), observamos efeito REGULA apenas para o GM-CSF. O perfil global de efeitos REGULA e INFLAMA não foram significativamente diferentes entre RC e SAU para as citocinas REGULA ($p=0,4$, Qui-quadrado) ou para as citocinas INFLAMA ($p=0,7$, Qui-quadrado). Em contraste, na TO, observamos um predomínio de perfil REGULA para as citocinas INFLAMA: Razões REGULA/INFLAMA por citocina: $\geq 1,3$ para TO: IL-8, IL-12, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ). Não obstante, no grupo TO, observamos também que os peptídeos HLA-DR induziram efeito INFLAMA

para outras citocinas com perfil predominantemente INFLAMA (IL-6, TNF- α , MIP-1B) com valores das razões REGULA/INFLAMA = 0,5, 0,5 e 0,7, respectivamente.

Para as citocinas REGULA, os peptídeos HLA-DR-alo do doador tiveram efeitos principalmente REGULA, na RC (Razões REGULA/INFLAMA: IL-7: 2 e, para IL-4, IL-10 e IL-13, só ocorreu indução ou aumento de produção). Em contraste, na TO, os efeitos dos peptídeos HLA-DR-alo do doador, em relação à produção de citocinas REGULA, foram todos do perfil INFLAMA (inibição da produção) para IL-4, IL-5, IL-7 e IL-10 e, para IL-13, equilibrada.

No que diz respeito à quantidade de citocina (pg/ml) produzida e/ou inibida diante do estímulo com os peptídeos HLA-DR-alo (Figuras 11), não encontramos diferenças significativas entre os grupos de estudo quando analisados em conjunto (Kruskal-Wallis). Porém, quando comparamos os grupos dois a dois, encontramos algumas diferenças significativas: entre os grupos TO e RC: para as citocinas predominantemente REGULA: (i) IL-4: maior produção na RC ($p=0,005$, Mann-Whitney) e (ii) IL-10: maior produção na RC ($p=0,03$, Mann-Whitney).

Figura 11: Efeitos de peptideos HLA-DR-alo na produção de citocinas IL-4 e IL-10 - TOxRC. Citocinas analisadas nos sobrenadantes de cultura de PBMC, após 48h, por Luminex. Valores expressos em pg/ml. TO: Tolerante operacional (n=6) e RC: rejeição crônica (n=7). A comparação entre dois grupos (Mann Whitney TO x RC (para as citocinas: IL-4: $p=0,005$ e IL-10: $p=0,04$). OOR (Fora do alcance, em inglês, *Out of Range*) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08) e IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47).

Assim como para as citocinas predominantemente INFLAMA: (i) IL-6: maior produção na RC ($p=0,03$, Mann-Whitney); na TO o efeito foi mais de inibição; (ii) G-CSF: maior produção na RC ($p=0,03$, Mann-Whitney), na TO o efeito foi mais de inibição; e (iii) IFN- γ : também, maior produção na RC ($p=0,01$, Mann-Whitney) (Figura 12).

Figura 12: Efeitos de peptídeos HLA-DR-alo na produção de citocinas IL-4, G-CSF e IFN- γ - TOxRC. Citocinas analisadas nos sobrenadantes de cultura de PBMC, após 48h, por Luminex. Valores expressos em pg/ml. TO: Tolerante operacional (n=6) e RC: rejeição crônica (n=7). A comparação entre dois grupos (Mann Whitney TO x RC (para as citocinas: a) IL-6: $p=0,04$; b) G-CSF: $p=0,04$ e c) IFN- γ : $p=0,01$). Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9), G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89) e IFN- γ (OOR > 41,1 e < 39741,12).

Na comparação do efeito dos peptídeos HLA-DR-alo entre os grupos TO e SAU, também observamos algumas diferenças significativas nos níveis de algumas citocinas: (i) IL-4: maior produção no grupo SAU ($p=0,03$, Mann-Whitney), em contraste com efeito predominantemente de inibição na TO e (ii) IL-10: também maior produção no grupo SAU ($p=0,03$, Mann-Whitney), enquanto que na TO o efeito foi principalmente de inibição (Figura 13).

4.1.3 Antígenos de microrganismo patogênico: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos do CMV, nos diferentes grupos clínicos

Na presença de peptídeos do microrganismo patogênico, CMV, observamos também, tanto inibição, quanto indução/aumento da produção de citocinas REGULA e INFLAMA em, praticamente, todos os grupos (considerado diferenças com valores $\geq 1\text{pg/ml}$) (TABELA 10).

A frequência global do efeito dos peptídeos CMV induzindo um perfil REGULA foi maior para o grupo TO, e menor para os grupos RC e EST (TO: 34,4%; RC: 25%; EST: 26,6%; SAU: 28,6%). Por outro lado, a frequência do perfil INFLAMA, para o efeito do peptídeo CMV, foi menor para o grupo TO, de forma semelhante ao SAU (TO: 49%; RC: 56,3%; EST: 61%; SAU: 50,9%).

As razões globais da frequência REGULA/INFLAMA para o efeito dos peptídeos CMV, foram, predominantemente, INFLAMA em todos os grupos, sendo menores nos grupos RC e EST, e muito semelhantes entre os grupos TO e SAU (TO: 0,7; RC: 0,4; EST: 0,4; SAU: 0,6).

As frequências de efeitos do tipo REGULA ou INFLAMA, assim como da ausência de efeito, dos peptídeos-CMV, mostraram perfis significativamente diferentes entre os grupos de TO e RC, tanto para as citocinas REGULA ($p=0,02$; Qui-quadrado), quanto para as citocinas INFLAMA ($p=0,008$; Qui-quadrado). Ou seja, observamos mais efeito INFLAMA em relação às citocinas REGULA, na TO e, mais efeito REGULA nas citocinas INFLAMA (Figura 14).

Tabela 10: Efeito do peptídeo de microrganismo patogênico - CMV - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-3,0	-231,6	-1,2	-472,6	-88,2	-3719,9	-27,4	-244,5	-12168,2	-25,6	-55,4	-10,3	0,0	-214,1	-560,5	-952,6	-2704,6	REGULA: 34,4%
	Ltx10	0,9	29,3	-0,5	158,4	47,4	-1662,9	122,5	2701,6	-551,5	25,4	157,4	50,5	0,0	514,4	27,3	163,2	1924,5	INFLAMA: 49%
	Ltx16	-0,6	0,0	-0,9	-1,4	-0,5	-5,5	16,2	-24,0	25,6	1,8	1,6	-6,4	-149,2	29,4	-3,9	-1698,2	734,0	Sem Efeito: 16,7%
	Ltx62	-1,7	-1,8	-0,8	191,5	-1,1	-1579,2	-55,8	4061,9	1232,4	-12,2	17,3	-48,1	0,0	26,9	-2,9	2775,8	2076,8	RAZÃO
	Ltx90	-0,8	0,0	-1,2	-6,1	0,2	9,2	1095,4	-17514,6	18953,3	-2,1	-4,1	-271,2	6,6	145,3	-4,2	1197,6	0,0	REG/INF: 0,7
	Ltx91	1,2	0,6	-0,6	153,3	25,0	-0,1	19,0	83,0	2873,0	12,9	45,0	17,5	-120,5	2363,0	47,6	2190,5	21594,5	
	Media	-0,7	-33,9	-0,9	3,9	-2,9	-1159,7	195,0	-1822,8	1727,4	0,0	27,0	-44,6	-43,9	477,5	-82,8	612,7	3937,5	
	Mediana	-0,7	0,0	-0,8	76,0	-0,2	-792,3	17,6	29,5	629,0	-0,1	9,4	-8,3	0,0	87,4	-3,4	680,4	1329,3	
%Efeito REGULA:		16,7%	16,7%	0,0%	50,0%	33,3%		33,3%	50%	33,3%	50%	33,3%	66,7%	33,3%	16,7%	66,7%	33,3%	16,7%	
%Efeito INFLAMA:		33,3%	33,3%	33,3%	50,0%	33,3%		66,7%	50%	66,7%	50%	66,7%	33,3%	16,7%	83,3%	33,3%	66,7%	66,7%	
Razão REG/INF:		0,5	0,5	I	1	1		0,5	1	0,5	1	0,5	2	2	0,2	2	0,5	0,3	
RC	Ltx04	2,0	1,3	0,8	200,5	18,4	1112,2	25,1	446,3	1806,8	42,7	47,1	13,3	2,2	10126,2	230,4	8105,7	1706,1	REGULA: 25%
	Ltx05	0,4	0,0	0,0	34,8	2,2	-579,6	11,3	-11,0	4337,6	-1,4	2,1	2,3	0,0	1599,4	5,2	1779,6	1631,8	INFLAMA: 56,3%
	Ltx13	-0,2	0,0	-0,2	28,9	1,0	-3809,3	70,9	703,5	-13818,4	57,0	-15,9	41,8	0,0	2384,9	-4,9	1256,9	1525,5	Sem Efeito: 18,8%
	Ltx24	2,8	0,0	-1,0	26,9	3,2	99,0	280,6	14493,0	14431,6	7,7	31,6	150,1	69,4	1478,6	20,8	1785,4	20313,2	RAZÃO
	Ltx26	1,6	1,4	-0,8	9,0	36,6	168,7	50,6	244,9	558,2	10,6	49,1	27,2	-58,8	14832,5	76,6	5762,8	21596,8	REG/INF: 0,4
	Ltx79	0,1	0,0	-1,0	-0,2	-0,1	-1,4	15,2	82,3	-1209,0	-1,0	-3,5	6,1	-161,9	167,7	3,8	439,1	323,8	
	Ltx87	0,6	0,0	-0,9	-1,2	0,2	52,9	8,4	82,2	-546,8	-0,4	0,6	6,4	-158,5	163,0	3,3	-103,8	112,4	
	Media	1,0	0,4	-0,4	42,7	8,8	-422,5	66,0	2291,6	794,3	16,5	15,9	35,3	-43,9	4393,2	47,9	2718,0	6744,2	
	Mediana	0,6	0,0	-0,8	26,9	2,2	52,9	25,1	244,9	558,2	7,7	2,1	13,3	0,0	1599,4	5,2	1779,6	1631,8	
%Efeito REGULA:		42,9%	28,5%	0,0%	71,4%	71,4%		0,0%	14,3%	42,9%	28,6%	28,6%	0,0%	42,9%	0,0%	14,3%	14,3%	0,0%	
%Efeito INFLAMA:		0,0%	0,0%	28,5%	14,3%	0,0%		100,0%	85,7%	57,1%	57,1%	57,1%	100,0%	28,6%	100,0%	85,7%	85,7%	100,0%	
Razão REG/INF:		R	R	I	5	R		I	0,2	0,8	0,5	0,5	I	1,5	I	0,2	0,2	I	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo CMV, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreado de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0.82 e < 3676.08); IL-5 (OOR > 2.18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1.73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2.46 e < 27189.47); IL-13 (OOR > 0.86 e < 14996.07); IL-2 (OOR > 8.3 e < 10015.26); IL-1B (OOR > 2.02 e < 29090.07); IL-6 (OOR > 6.32 e < 23,599.9); IL-8 (OOR > 1.42 e < 26599.9); IL-12 (OOR > 2.76 e < 43369.64); IL-17 (OOR > 9.755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0.72 e < 2425.89); GM-CSF (OOR > 197.63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41.1 e < 39741.12); TNF-α (OOR > 1.97 e < 30517.8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861.92) e MIP-1B (OOR > 5.88 e < 21761.9). Para o efeito do peptídeo CMV, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,02 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,05) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,008 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,1).

Tabela 10 (Continuação): Efeito do peptídeo de microrganismo patogênico - CMV - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	1,2	1,5	1,2	40,2	16,7	-3009,0	87,0	3213,8	8787,7	3,0	61,4	54,1	0,0	3045,1	24,1	5346,8	2222,6	REGULA: 26,6%
	Ltx12	-0,4	-8,4	-6,8	57,8	8,3	360,3	5,3	295,1	15699,0	-583,3	-19,1	3,7	-852,1	2603,6	30,8	5861,92*	903,3	INFLAMA: 61%
	Ltx14	0,1	1,8	0,2	224,6	24,8	280,2	143,2	5377,6	0,0	6,8	60,6	139,2	0,0	8031,2	30,0	-754,4	21756,1	Sem Efeito: 12,5%
	Ltx22	2,9	0,0	-1,1	39,1	1,4	25,4	288,6	23599,9*	5782,9	0,0	34,3	282,5	54,8	187,8	11,1	616,9	20410,7	RAZÃO
	Media	1,0	-1,3	-1,6	90,4	12,8	-585,8	131,0	2962,2	7567,4	-143,4	34,3	119,9	-199,3	3466,9	24,0	1736,4	11323,2	REG/INF: 0,4
	Mediana	0,7	0,8	-0,4	49,0	12,5	152,8	115,1	3213,8	7285,3	1,5	47,4	96,7	0,0	2824,3	27,1	616,9	11316,6	
	%Efeito REGULA:	50,0%	50,0%	25,0%	100,0%	100,0%		00%	00%	0,0%	25,0%	25,0%	00%	25,0%	00%	00%	25%	00%	
	%Efeito INFLAMA:	0,0%	25,0%	50,0%	0,0%	0,0%		100,0%	100,0%	75,0%	50,0%	75,0%	100,0%	25,0%	100,0%	100,0%	75,0%	100,0%	
	Razão REG/INF:	R	2	0,5	R	R		I	I	I	0,5	0,3	I	1	I	I	0,3	I	
SAU	Ltx18	1,3	0,0	-0,8	21,7	2,9	28,3	224,3	2220,5	-1994,1	2,1	14,2	97,9	-43,0	212,7	6,4	63,6	5216,6	REGULA: 28,6%
	Ltx36	1,3	30,8	-0,1	203,5	30,8	-5365,0	25,4	-11,5	2154,5	20,6	44,7	4,2	0,0	5476,7	18,8	2722,6	21228,6	INFLAMA: 50,9%
	Ltx37	3,6	0,0	-1,1	25,3	0,4	13,1	443,0	23599,9*	6971,7	6,9	35,7	299,9	77,4	199,4	24,9	2219,3	20369,8	Sem Efeito: 20,5%
	Ltx40	3,0	0,0	-1,0	31,8	15,4	65,0	1133,5	23599,9*	6337,8	4,4	18,3	593,5	92,0	5785,0	106,9	-393,4	0,0	RAZÃO
	Ltx41	0,3	0,0	-0,7	2,0	0,3	-3652,8	0,9	-296,2	-937,2	21,5	2,6	-4,9	0,0	308,2	2,1	1447,8	342,0	REG/INF: 0,6
	Ltx44	-0,8	0,0	-1,1	-1,6	0,0	-7,8	-0,3	-8,3	-965,9	-1,7	-6,4	-4,7	-154,4	-34,1	-12,1	-38,9	-407,2	
	Ltx84	0,5	0,0	0,0	54,5	-0,9	-1100,4	64,4	922,6	6723,0	-7,3	8,6	38,1	0,0	57,3	3,8	3908,8	129,0	
	Media	1,3	4,4	-0,7	48,2	7,0	-1431,4	270,2	565,4	2612,8	6,7	16,8	146,3	-4,0	1715,0	21,5	1418,6	6697,0	
	Mediana	1,3	0,0	-0,8	25,3	0,4	-7,8	64,4	-8,3	2154,5	4,4	14,2	38,1	0,0	212,7	6,4	1447,8	342,0	
	%Efeito REGULA:	57,1%	14,3%	0,0%	85,7%	42,9%		0,0%	42,9%	42,9%	28,6%	14,3%	28,6%	28,6%	14,3%	14,3%	28,6%	14,3%	
	%Efeito INFLAMA:	0,0%	0,0%	42,9%	14,3%	0,0%		71,4%	57,1%	57,1%	71,4%	85,7%	71,4%	28,6%	85,7%	85,7%	71,4%	71,4%	
	Razão REG/INF:	R	R	I	6	R		I	0,8	0,8	0,4	0,2	0,4	1	0,2	0,2	0,4	0,2	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo CMV, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=4); SAU: saudável (n=7); n total=24 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0.82 e < 3676.08); IL-5 (OOR > 2.18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1.73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2.46 e < 27189.47); IL-13 (OOR > 0.86 e < 14996.07); IL-2 (OOR > 8.3 e < 10015.26); IL-1B (OOR > 2.02 e < 29090.07); IL-6 (OOR > 6.32 e < 23,599.9); IL-8 (OOR > 1.42 e < 26599.9); IL-12 (OOR > 2.76 e < 43369.64); IL-17 (OOR > 9.755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0.72 e < 2425.89); GM-CSF (OOR > 197.63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41.1 e < 39741.12); TNF-α (OOR > 1.97 e < 30517.8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861.92) e MIP-1B (OOR > 5.88 e < 21761.9). Para o efeito do peptídeo CMV, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,02 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,05) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,008 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,1).

Figura 14: Peptídeos CMV. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM PRODUÇÃO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo CMV na comparação entre os grupos TO, RC, SAU. a) Citocinas REGULA, TOxRC ($p=0,02$, Qui-quadrado) e b) Citocinas INFLAMA, TOxRC ($p=0,008$, Qui-quadrado).

Não obstante, o perfil em TO foi semelhante ao grupo SAU em relação às citocinas INFLAMA, uma vez que não observamos diferenças significativas nas frequências de efeitos do tipo REGULA ou INFLAMA, assim como da ausência de efeito, dos peptídeos-CMV, na comparação entre TO e SAU, seja em relação às citocinas REGULA ($p=0,05$; Qui-quadrado) ou em relação àquelas INFLAMA ($p=0,1$; Qui-quadrado).

Destacamos algumas diferenças dos efeitos dos peptídeos-CMV, entre os grupos TO e RC: por exemplo, para as citocinas REGULA, o peptídeo CMV teve efeito predominantemente REGULA na RC (Razões REGULA/INFLAMA: IL-10: 5 e para as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, detectamos apenas indução ou aumento de produção destas citocinas). Em contraste, em TO, o efeito dos peptídeos-CMV em relação à produção de citocinas REGULA, (IL-4 e IL-5) foi de inibição, portanto, do perfil INFLAMA. Para as citocinas predominantemente INFLAMA, o efeito preponderante do CMV foi INFLAMA em todos os grupos.

Na comparação entre TO e SAU, destacamos algumas diferenças das razões REGULA/INFLAMA. Por exemplo, para IL-10, o efeito dos peptídeos-CMV foi mais REGULA em SAU (razão REGULA/INFLAMA: 6), e equilibrada REGULA/INFLAMA no grupo TO (razão REGULA/INFLAMA: 1). Não obstante, o perfil global de efeitos não foi estatisticamente diferente entre TO e SAU.

No que diz respeito à quantidade de citocina (pg/ml) produzida e/ou inibida diante do estímulo com os peptídeos-CMV, mais uma vez, não encontramos diferenças significativas entre os grupos de estudo, quando analisados em conjunto (Kruskal-Wallis). No entanto, comparando os grupos dois a dois (Mann-Whitney) observamos algumas diferenças significativas, em relação aos efeitos dos peptídeos-CMV, apenas na comparação entre TO e RC, no qual, os níveis de indução e ou aumento de IFN- γ foram maiores na RC ($p=0,03$) (Figura 15).

quantidades foram IL-8 (valores máximos > 18.000 pg/ml em TO), MCP-1 (valores máximos > 11.000 pg/ml em EST) e MIP-1B (valores máximos > 21.000 pg/ml). Os níveis de produção de citocinas do perfil INFLAMA foram, em geral, bem maiores do que as do perfil REGULA.

4.1.4. Autoantígenos: produção de citocinas REGULA e INFLAMA frente a peptídeos da Hsp60, nos diferentes grupos clínicos

Foi analisado o efeito do autoantígeno, proteína de choque térmico 60 - Hsp60 (HSP, do inglês, *Heat shock protein*), dirigido a três peptídeos, previamente estudados por nosso grupo, que apresentam atividade, predominantemente REGULA (peptídeos N6 e N7) ou INFLAMA (peptídeo C9), em relação à produção de citocinas com predomínio de atividades REGULA ou INFLAMA.

Peptídeos da Hsp60 REGULA: N6 e N7

Analisamos, inicialmente, a produção de citocinas (com perfil REGULA ou INFLAMA), frente ao estímulo com os peptídeos, predominantemente, REGULA (N6 e N7).

Pep N6-REGULA - Citocinas com perfil REGULA e INFLAMA

Na presença do peptídeo N6, observamos tanto inibição, quanto indução/aumento da produção de citocinas com perfil predominantemente REGULA, assim como daquelas predominantemente INFLAMA em, praticamente, todos os grupos (considerado diferenças com valores ≥ 1 pg/ml) (Tabela 11).

Tabela 11: Efeito do autoantígeno - Pep-N6 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-4,1	-234,2	-1,3	-475,0	-89,7	-2380,7	-27,3	-256,4	-7610,0	-45,7	-78,7	-8,8	0,0	-1045,5	-564,8	-874,4	-2880,2	REGULA: 41,3%
	Ltx10	6,4	183,6	1,3	2087,6	230,9	-4148,9	359,0	-1340,7	-4227,5	23,8	645,3	0,4	39,3	12331,8	2577,8	3773,0	3379,3	INFLAMA: 45%
	Ltx16	-0,3	0,0	-0,9	-1,1	-0,7	-6,3	23,0	-31,3	360,2	0,2	-1,6	-4,1	-154,1	-7,0	7,4	-1883,9	285,3	Sem Efeito: 13,8%
	Ltx62	0,3	8,1	-0,1	1,7	13,7	-367,2	44,5	1703,0	6236,8	9,9	8,9	32,1	0,0	-1,7	-7,7	1112,3	354,0	RAZÃO
	Ltx91	1,1	1,5	-0,7	185,4	22,1	-2,6	14,5	53,3	2291,6	9,5	61,4	11,7	-102,1	1063,8	186,4	1598,1	21594,5	REG/INF:0,9
	Media	0,7	-8,2	-0,3	359,7	35,3	-1381,1	82,8	25,6	-589,8	-0,4	127,1	6,3	-43,4	2468,3	439,8	745,0	4546,6	
RC	Mediana	0,3	1,5	-0,7	1,7	13,7	-367,2	23,0	-31,3	360,2	9,5	8,9	0,4	0,0	-1,7	7,4	1112,3	354,0	
	%Efeito REGULA:	40%	60%	20%	60%	60%		20%	60%	40%	20%	40%	40%	40%	60%	40%	40%	20%	
	%Efeito INFLAMA:	20%	20%	20%	20%	20%		80%	40%	60%	60%	60%	40%	20%	40%	60%	60%	80%	
	Razão REG/INF:	2	3	1	3	3		0,25	1,5	0,7	0,3	0,7	1	2	1,5	0,7	0,7	0,25	
	Ltx04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-14,4	0,0	
	Ltx05	-1,2	0,0	0,3	-5,0	-1,2	-1881,7	-9,5	-173,0	-784,4	-42,9	-16,5	-5,0	0,0	-80,2	-8,4	-877,5	-526,7	REGULA: 36,6%
RC	Ltx13	-1,6	0,0	-0,4	-29,3	-1,6	-3352,4	-21,0	-1909,9	-12485,9	-25,8	-66,9	-32,4	0,0	-211,6	-27,3	-166,4	-1470,4	INFLAMA: 31,3%
	Ltx24	3,3	-1,8	-0,7	42,3	0,9	26,5	290,3	23599,9*	4357,5	7,8	41,4	888,5	62,6	185,6	22,6	1904,2	20303,2	Sem Efeito: 32,1%
	Ltx26	-0,6	0,0	-0,8	-0,1	-0,7	-5,0	-1,6	-59,2	183,4	-0,4	-1,3	-9,9	-160,4	-26,1	-4,1	1159,7	-55,3	RAZÃO
	Ltx79	-0,5	0,0	-1,0	-0,9	-0,5	-6,1	15,4	130,0	2302,1	-1,0	-2,0	7,0	-154,4	-13,5	3,2	66,4	76,6	REG/INF:1,2
	Ltx87	-0,3	0,0	-1,1	1,1	-0,7	-2,2	9,3	122,6	1952,9	-1,7	-1,6	1,8	-157,5	-15,4	0,4	-677,2	8,1	
	Media	-0,1	-0,3	-0,5	1,2	-0,6	-745,8	40,4	-314,9	-638,6	-9,1	-6,7	121,4	-58,5	-23,0	-1,9	199,3	2620,8	
	Mediana	-0,5	0,0	-0,7	-0,1	-0,7	-5,0	0,0	-29,6	183,4	-1,0	-1,6	0,0	0,0	-15,4	0,0	-14,4	0,0	
	%Efeito REGULA:	14,3%	0,0%	0,0%	28,6%	0,0%		42,9%	42,9%	28,6%	57,1%	71,4%	42,9%	42,9%	57,1%	42,9%	42,9%	42,9%	
	%Efeito INFLAMA:	28,6%	14,3%	28,6%	28,6%	28,6%		42,9%	42,9%	71,4%	14,3%	14,3%	42,9%	14,3%	14,3%	28,6%	57,1%	42,9%	
	Razão REG/INF:	0,5	1	1	1	1		1	1	0,4	3,9	3,9	1	3	3,9	1,5	0,8	1	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo N6, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aquelos sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo N6, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,001 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,2) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,04 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,5).

Tabela 11 (Continuação): Efeito do autoantígeno - Pep-N6 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	-0,8	0,0	0,1	4,0	5,1	-4060,5	18,5	-16,6	-1743,1	-11,3	9,9	1,7	0,0	-58,1	-5,0	972,1	-291,4	REGULA: 45,8%
	Ltx12	-1,4	-9,0	-7,4	1,6	3,6	-1421,9	-27,8	52,7	-2131,7	-621,9	-54,3	-7,7	-852,1	-363,9	7,5	622,7	32,6	INFLAMA: 39,6%
	Ltx14	-1,1	-0,3	-0,5	159,3	1,1	379,1	101,7	6837,3	-13247,7	-4,5	16,1	154,1	0,0	317,6	14,7	-2898,5	424,5	Sem Efeito: 14,6%
	Media	-1,1	-3,1	-2,6	55,0	3,3	-1701,1	30,8	2291,1	-5707,5	-212,6	-9,4	49,3	-284,0	-34,8	5,8	-434,6	55,2	RAZÃO
	Mediana	-1,1	-0,3	-0,5	4,0	3,6	-1421,9	18,5	52,7	-2131,7	-11,3	9,9	1,7	0,0	-58,1	7,5	622,7	32,6	REG/INF: 1,2
	%Efeito REGULA:	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%		33,3%	33,3%	100%	100%	33,3%	33,3%	33,3%	66,6%	33,3%	33,3%	33,3%	
	%Efeito INFLAMA:	66,7%	33,3%	33,3%	0,0%	0,0%		66,6%	66,6%	0,0%	0,0%	66,6%	66,6%	0,0%	33,3%	66,6%	66,6%	66,6%	
	Razão REG/INF:	I	I	I	R	R		0,5	0,5	R	R	0,5	0,5	R	2	0,5	0,5	0,5	
SAU	Ltx18	1,1	0,0	-0,7	4,4	-0,1	0,5	185,6	5963,0	-3135,3	-1,2	3,7	206,2	-81,2	56,0	6,3	-480,0	175,0	REGULA: 48,8%
	Ltx36	-1,3	0,0	12,5	-9,5	-3,0	-6479,1	-12,9	-242,7	-4069,1	4,7	27,0	6,9	0,0	-165,1	-21,9	-1985,8	-527,5	INFLAMA: 35%
	Ltx41	-1,2	0,0	-0,7	-11,4	0,8	-3604,5	-9,7	-675,4	-1356,7	-10,9	-33,6	-12,6	0,0	-98,4	-9,9	-364,9	-372,8	Sem Efeito: 16,3%
	Ltx44	-0,7	0,0	-1,1	-1,7	-0,7	-7,6	0,7	-7,8	-867,7	-1,0	-7,1	-2,9	-158,7	-26,6	-6,2	-37,2	-336,8	RAZÃO
	Ltx84	1,1	23,2	8,7	882,1	40,6	-3329,5	116,3	3014,8	3158,2	13,5	403,3	46,2	192,7	95,2	58,1	406,2	294,7	REG/INF:1,4
	Media	-0,2	4,6	3,8	172,8	7,5	-2684,0	56,0	1610,4	-1254,1	1,0	78,7	48,8	-9,4	-27,8	5,3	-492,3	-153,5	
	Mediana	-0,7	0,0	-0,7	-1,7	-0,1	-3329,5	0,7	-7,8	-1356,7	-1,0	3,7	6,9	0,0	-26,6	-6,2	-364,9	-336,8	
	%Efeito REGULA:	40%	20%	40%	40%	20%		40%	60%	80%	60%	40%	40%	40%	60%	60%	80%	60%	
	%Efeito INFLAMA:	40%	0,0%	20%	60%	20%		40%	40%	20%	40%	60%	60%	20%	40%	40%	20%	40%	
	Razão REG/INF:	1	R	2	0,7	1		1	1,5	4	1,5	0,7	0,7	2	1,5	1,5	4	1,5	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo N6, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo N6, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas REGULA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,001 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,5) e Citocinas INFLAMA (TOxRC: Qui-quadrado: 0,04 e TOxSAU: Qui-quadrado: 0,2).

A frequência global do efeito REGULA do peptídeo N6 apresentando o perfil REGULA foi maior para o grupo SAU, e menor para o grupo RC (TO: 41,3%; RC: 36,6%; EST: 45,8% e SAU: 48,8%). Por outro lado, a frequência do efeito do perfil INFLAMA, para o peptídeo N6, foi menor para o grupo RC (TO: 45%; RC: 31,3%; EST: 39,6% e SAU: 35%). A razão global da frequência REGULA/INFLAMA, para o efeito do peptídeo N6, foi maior para o grupo SAU (TO: 0,9; RC: 1,2; EST: 1,2 e SAU: 1,4). Assim, o peptídeo N6 induziu mais frequentemente efeitos do perfil REGULA, em relação à produção do conjunto das citocinas estudadas, nos SAU, e mais equilibrado REGULA/INFLAMA nos demais grupos clínicos e, inclusive, na TO.

Não obstante, observamos um perfil distinto, em relação às frequências dos efeitos do tipo REGULA ou INFLAMA, do peptídeo N6, assim como a ausência de efeito, entre os grupos TO e RC, tanto em relação às citocinas predominantemente REGULA ($p=0,001$; Qui-quadrado), quanto àquelas INFLAMA ($p=0,04$; Qui-quadrado) (Figura 16 a e b).

Figura 16: Peptídeo auto N6. Citocinas Regula e Citocinas Inflama – TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM PRODUÇÃO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo N6 na comparação entre os grupos TO, RC e SAU. a) Citocinas REGULA, TOxRC ($p=0,01$, Qui-quadrado) e b) Citocinas INFLAMA, TOxRC ($p=0,04$, Qui-quadrado).

Destacamos alguns efeitos diferenciais do peptídeo N6, como por exemplo, na produção de IL-4, uma citocina com relevância imunorreguladora no contexto do transplante. O efeito foi mais REGULA na TO (Razão REGULA/INFLAMA para IL-4: 2), em contraste com o efeito preponderante INFLAMA na RC (Razão REGULA/INFLAMA para IL-4: 0,5). De forma semelhante, para as demais citocinas REGULA, o peptídeo N6 teve efeito predominantemente REGULA, na TO (Razões REGULA/INFLAMA: IL-5: 3; IL-10: 3 e IL-13: 3), exceto para a IL-7, para a qual houve um efeito REGULA e outro INFLAMA.

Em contraste, na RC, o efeito do peptídeo N6 em relação à produção de citocinas REGULA, além de menos frequente, foi mais (para IL-4), ou unicamente (para IL-5, IL-7 e IL-13) do perfil INFLAMA. Para IL-10, o efeito foi igualmente REGULA e INFLAMA. Assim, as razões entre TO e RC para as frequências do efeito REGULA das citocinas REGULA (IL-10: 2,1; IL-4: 2,8 e IL-13: somente o grupo TO teve indução/aumento de IL-13 pelo peptídeo N6) mostram claramente um predomínio para o grupo TO.

Para as citocinas predominantemente INFLAMA, o efeito preponderante do N6 foi INFLAMA no grupo TO (Razões REGULA/INFLAMA $\leq 0,7$ para IL-1B, IL-8, IL-12, IL-17, TNF, MCP-1 e MIP-1B), em contraste com o grupo RC que teve predomínio de efeito REGULA para diversas citocinas (Razões REGULA/INFLAMA $\geq 1,3$ para: IL-12, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , e TNF- α), havendo efeito INFLAMA apenas para a IL-8 (Razão REGULA/INFLAMA 0,4) e, para as demais citocinas INFLAMA, o efeito foi igualmente compartilhado REGULA e INFLAMA (IL-6, G-CSF, IL-1B, MCP-1 e

MIP-1B). Destacamos que o efeito do peptídeo N6, em relação à produção de IFN- γ foi REGULA para todos os grupos estudados.

A comparação com o grupo de indivíduos saudáveis pode ser informativa como parâmetro de maior ou menor ativação em relação ao estado fisiológico. Destacamos algumas diferenças das razões REGULA/INFLAMA entre TO e SAU. Por exemplo, para IL-10, o efeito do N6 foi mais REGULA na TO e INFLAMA no grupo SAU (Razão REGULA/INFLAMA: 3 na TO contra 0,7 para SAU). Para IL-13, o efeito em SAU foi menos frequente do que na TO e equilibrado REGULA e INFLAMA. No grupo de EST, o efeito foi, em geral, intermediário entre TO e RC. Apesar dessas diferenças, o perfil global dos efeitos do peptídeo N6, não foi significativamente diferente entre TO e SAU para as citocinas REGULA ($p=0,5$; Qui-quadrado), nem para as citocinas INFLAMA ($p=0,2$; Qui-quadrado).

No que diz respeito à quantidade de citocina (pg/ml) produzida e/ou inibida diante do estímulo com o peptídeo N6 (Tabela 11), não encontramos diferenças significativas entre os grupos de estudo (Kruskal-Wallis) e mesmo na comparação, dois a dois, (Mann-Whitney, $p=ns$). Apesar da quantidade de diversas citocinas ter sido bem alta, sob estímulo do peptídeo N6, para muitos indivíduos, como por exemplo, para MCP-1 (>3000 pg/ml, na TO), MIP-1B (>21000 pg/ml, na TO), IL-6 (>6000 pg/ml, em EST), IL-8 (>6000 pg/ml, na TO), e mesmo IL-10 (>200 pg/ml, na TO), observamos grande variabilidade de efeito do peptídeo N6 na quantidade de citocina produzida.

Pep N7-REGULA - Citocinas com perfil REGULA/INFLAMA

O peptídeo N7 também foi capaz tanto de inibir, quanto induzir/aumentar a produção de citocinas com perfil predominantemente REGULA, ou INFLAMA em, praticamente, todos os grupos (sempre considerado diferenças com valores $\geq 1\text{pg/ml}$) (Tabela 12).

A frequência global do efeito REGULA do peptídeo N7 foi maior para o grupo SAU, e menor para o grupo RC (TO: 36,3%; RC: 30,4%; EST: 43,8% e SAU: 48,8%), de forma semelhante ao observado para o peptídeo N6. Por outro lado, a frequência do perfil INFLAMA, para o efeito do peptídeo N7, foi menor para o grupo SAU (TO: 46,3%; RC: 45,5%; EST: 42,2% e SAU: 26,2%) e semelhante nos grupos TO e RC. A razão global da frequência REGULA/INFLAMA, para o efeito do peptídeo N7, foi maior para o grupo SAU (TO: 0,8; RC: 0,7; EST: 1 e SAU: 1,9). Desta forma, o peptídeo N7 induziu mais frequentemente efeitos do perfil REGULA, em relação à produção do conjunto das citocinas estudadas, nos SAU, mais INFLAMA na RC, e mais equilibrado REGULA/INFLAMA nos grupos TO e EST.

Em relação às citocinas REGULA, chama a atenção que o peptídeo N7 teve mais efeito na produção de IL-7 (efeito predominantemente INFLAMA em todos os grupos clínicos), IL-10 (efeito predominantemente REGULA em todos os grupos, menos nos SAU) e na produção de IL-13 (efeito predominantemente REGULA em todos os grupos, menos nos SAU (Razões REGULA/INFLAMA: na TO: IL-10: 1,5 e IL-13: 3; na RC: IL-10: 4 e IL-13: 2). Em contraste com o peptídeo N6, o N7 praticamente não teve efeito na produção de IL-4.

Tabela 12: Efeito do autoantígeno - Pep-N7 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-18	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-3,8	-236,1	-1,5	-480,1	-93,3	-2422,9	-28,4	-251,7	-9493,3	-45,7	-82,5	-10,0	0,0	-1103,1	-565,8	-971,4	-2896,6	REGULA: 36,3%
	Ltx10	0,4	36,9	-0,4	99,4	46,5	-1871,8	69,7	774,4	5216,4	1,6	158,0	16,8	0,0	76,9	57,0	24,0	434,1	INFLAMA: 46,3%
	Ltx16	-0,5	0,0	-1,1	-1,2	-0,8	-6,0	23,1	-8,6	699,2	0,9	-0,5	-3,5	-148,3	-1,4	12,8	-1521,0	337,4	Sem Efeito: 17,5%
	Ltx62	0,6	0,3	1,9	60,6	5,9	-2201,3	9,7	91,6	-895,9	26,9	57,1	-6,6	0,0	1676,6	19,8	-727,6	-62,8	RAZÃO
	Ltx91	1,3	0,3	-0,8	188,9	16,2	-0,5	11,3	50,5	4099,4	13,7	81,1	12,8	-99,1	916,8	158,4	1540,5	21594,5	REG/INF: 0,8
Media		-0,4	-39,7	-0,4	-26,5	-5,1	-1300,5	17,1	131,2	-74,9	-0,5	42,6	1,9	-49,5	313,2	-63,5	-331,1	3881,3	
Mediana		0,4	0,3	-0,8	60,6	5,9	-1871,8	11,3	50,5	699,2	1,6	57,1	-3,5	0,0	76,9	19,8	-727,6	337,4	
%Efeito REGULA:		20%	20%	20%	60%	60%		20%	40%	40%	20%	20%	60%	40%	40%	20%	60%	40%	
%Efeito INFLAMA:		20%	20%	40%	40%	20%		80%	60%	60%	60%	60%	40%	0,0%	60%	80%	40%	60%	
Razão REG/INF:		1	1	0,5	1,5	3		0,25	0,7	0,7	0,3	0,3	1,5	R	0,7	0,25	1,5	0,7	
RC	Ltx04	0,0	0,0	3,1	5,6	1,2	0,0	3,1	27,8	128,2	46,0	0,0	9,4	0,0	123,5	8,1	-24,3	116,4	REGULA: 30,4%
	Ltx05	-1,2	0,0	0,0	-6,0	-1,3	-1658,3	-9,0	-189,1	-703,1	-39,9	-25,6	-5,8	0,0	-89,4	-9,5	-876,9	-483,6	INFLAMA: 45,5%
	Ltx13	-1,2	2,0	-0,1	113,8	21,2	-4269,3	100,4	16749,7	-17036,8	59,5	51,5	336,1	0,0	-344,2	25,2	-2860,4	20043,8	Sem Efeito: 24,1%
	Ltx24	0,2	0,0	-1,0	10,7	-0,1	1,8	88,7	1878,9	3494,7	7,1	9,0	38,3	-36,9	54,2	15,4	1091,6	20313,2	RAZÃO
	Ltx26	-0,4	0,0	-0,9	1,5	-0,6	-4,5	5,9	55,2	469,8	-1,0	4,1	-1,8	-161,4	-24,3	-4,1	1155,9	-52,6	REG/INF: 0,7
RC	Ltx79	-0,4	0,0	-1,1	-0,8	-0,7	-7,4	4,9	79,0	726,5	-0,8	-4,6	2,3	-160,4	-21,0	1,3	16,7	37,1	
	Ltx87	-0,3	0,0	-1,2	0,5	-0,6	-3,8	9,1	179,2	1873,5	-0,7	-0,9	5,5	-150,2	-2,3	1,4	29,3	14,7	
Media		-0,4	0,3	-0,2	17,9	2,7	-848,8	29,0	2683,0	-1578,2	10,0	4,8	54,9	-72,7	-43,4	5,4	-209,7	5712,7	
Mediana		-0,4	0,0	-0,9	1,5	-0,6	-4,5	5,9	79,0	469,8	-0,7	0,0	5,5	-36,9	-21,0	1,4	16,7	37,1	
%Efeito REGULA:		0,0%	14,3%	0,0%	57,1%	28,6%		14,3%	14,3%	28,6%	28,6%	28,6%	28,6%	57,1%	71,4%	28,6%	42,9%	28,6%	
%Efeito INFLAMA:		28,6%	0,0%	57,1%	14,3%	14,3%		85,7%	85,7%	71,4%	42,9%	42,9%	71,4%	0,0%	28,6%	71,4%	57,1%	71,4%	
Razão REG/INF:		I	R	I	4	2		0,2	0,2	0,4	0,7	0,7	0,4	R	2,5	0,4	0,8	0,4	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo N7, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou a produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreado de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR<: limite inferior de detecção / OOR>: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-18 (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo N7, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas INFLAMA (TOxSAU: Qui-quadrado: 0,007 e RCxSAU: Qui-quadrado: 0,001).

Tabela 12 (Continuação): Efeito do autoantígeno - Pep-N7 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-18	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	-0,2	2,2	-0,1	9,5	6,7	-3489,3	30,0	209,4	1500,3	-14,3	14,3	5,4	0,0	-36,3	-3,1	1503,2	-254,3	REGULA: 43,8%
	Ltx12	-1,4	-8,4	-7,6	0,5	5,1	-1467,5	-21,5	69,7	-2087,8	-624,8	-54,3	-9,4	-852,1	-397,4	3,2	279,6	4,1	INFLAMA: 42,2%
	Ltx14	-1,7	0,5	-0,6	152,3	2,2	107,9	109,9	5983,3	-12784,7	-12,4	4,5	132,0	0,0	280,2	12,8	-2547,0	304,8	Sem Efeito: 14,6%
Media		-1,1	-1,9	-2,8	54,1	4,7	-1616,3	39,4	2087,5	-4457,4	-217,2	-11,8	42,7	-284,0	-51,1	4,3	-254,7	18,2	RAZÃO
Mediana		-1,4	0,5	-0,6	9,5	5,1	-1467,5	30,0	209,4	-2087,8	-14,3	4,5	5,4	0,0	-36,3	3,2	279,6	4,1	REG/INF: 1
%Efeito REGULA:		0,0%	33,3%	0,0%	66,7%	100%		33,3%	0,0%	66,7%	100%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	
%Efeito INFLAMA:		66,7%	33,3%	33,3%	0,0%	0,0%		66,7%	100%	33,3%	0,0%	66,7%	66,7%	0,0%	33,3%	66,7%	66,7%	66,7%	
Razão REG/INF:		I	1	I	R	R		0,5	I	2	R	0,5	0,5	R	2	0,5	0,5	0,5	
SAU	Ltx18	1,5	0,0	-1,0	18,9	0,6	4,4	215,2	8556,6	-2620,6	-0,2	7,1	397,4	-54,9	61,6	9,0	-319,2	1834,5	REGULA: 48,8%
	Ltx36	-1,1	34,3	0,1	43,2	35,1	-6403,9	-8,1	-122,4	-3798,4	8,0	-11,6	-8,0	0,0	-86,1	14,0	-1778,5	-112,6	INFLAMA: 26,2%
	Ltx41	-0,2	0,0	-0,6	-2,4	0,3	-2719,6	-2,7	-485,4	14390,0	2,3	-27,5	-7,0	0,0	-11,6	-4,8	725,2	-295,2	Sem Efeito: 25%
	Ltx44	-0,8	0,0	-1,3	-2,2	0,0	-7,7	0,3	-8,4	-970,3	-1,8	-8,2	-4,1	-168,7	-32,2	-7,6	-39,2	-382,0	RAZÃO
	Ltx84	-0,4	0,0	-0,3	-3,2	-1,6	-2342,4	22,0	-99,4	1217,2	-21,8	-19,0	-0,2	0,0	-81,1	-0,7	-56,3	-100,5	REG/INF: 1,9
Media		-0,2	6,9	-0,6	10,8	6,9	-2293,8	45,4	1568,2	1643,6	-2,7	-11,8	75,6	-44,7	-29,9	2,0	-293,6	188,9	
Mediana		-0,4	0,0	-0,6	-2,2	0,3	-2342,4	0,3	-99,4	-970,3	-0,2	-11,6	-4,1	0,0	-32,2	-0,7	-56,3	-112,6	
%Efeito REGULA:		20%	20%	0,0%	40%	20%		40%	80%	60%	40%	80%	80%	40%	80%	40%	80%	80%	
%Efeito INFLAMA:		20%	0,0%	40%	60%	20%		40%	20%	40%	40%	20%	20%	0,0%	20%	40%	20%	20%	
Razão REG/INF:		1	R	I	0,7	1		1	4	1,5	1	4	4	R	4	1	4	4	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo N7, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-18 (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo N7, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. Citocinas INFLAMA (ToxSAU: Qui-quadrado: 0,007 e RCxSAU: Qui-quadrado: 0,001).

O efeito do peptídeo N7 sobre a produção de citocinas INFLAMA foi muito frequente, para todas as citocinas, em todos os grupos clínicos e, foi predominantemente do perfil INFLAMA, em todos os grupos de transplantados, exceto no grupo de SAU, no qual teve exclusivamente predomínio de efeito REGULA (IL-6, IL-8, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1 e MIP-1B) ou equilibrado (IL-1B, IL-12 e TNF- α) para os efeitos REGULA e INFLAMA. No grupo TO, o peptídeo N7 induziu predomínio de efeito INFLAMA para IL-1B, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α e MIP-1B, e, no grupo RC, para IL-1B, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, TNF- α , MCP-1 e MIP-1B. Apesar de bem menos frequente, também houve efeito REGULA para as citocinas predominantemente INFLAMA; G-CSF, GM-CSF e MCP-1 para o grupo TO, GM-CSF e IFN- γ para RC, e IL-8, IL-12, GM-CSF e IFN- γ para o grupo EST.

A comparação entre o grupo TO e o de RC, que consideramos importante para se avaliar potenciais mecanismos, mostrou pouca diferença informativa para o efeito do peptídeo N7 na produção de citocinas. Não observamos um perfil global significativamente diferente, em relação às frequências dos efeitos do tipo REGULA ou INFLAMA, do peptídeo N7, assim como em relação à ausência de efeito, entre os grupos TO e RC, tanto em relação às citocinas predominantemente REGULA ($p=0,2$; Qui-quadrado), quanto àquelas INFLAMA ($p=0,9$; Qui-quadrado). No entanto, as citocinas G-CSF (Razão REGULA/INFLAMA na TO 1,5 em contraste com 0,4 na RC) e MCP-1 (Razão REGULA/INFLAMA na TO 1,5 em contraste com 0,8 na RC), tiveram predomínio de efeito REGULA na TO e INFLAMA ou equilíbrio na RC.

Na comparação com o grupo de indivíduos SAU e TO, o perfil do efeito do peptídeo N7 foi bem distinto, com evidente predomínio REGULA nos

SAU para as citocinas INFLAMA. O perfil global das frequências de efeito do peptídeo N7, considerando efeitos do tipo REGULA, INFLAMA, ou ausência de efeito, foi significativamente diferente para as citocinas INFLAMA ($p=0,007$; Qui-quadrado), mas não para as citocinas REGULA ($p=0,3$; Qui-quadrado) (Figura 17). Assim como na comparação entre os grupos RC e SAU também foi observado diferença significativa para as citocinas INFLAMA ($p=0,001$; Qui-quadrado), mas não para as citocinas REGULA ($p=0,8$; Qui-quadrado).

Figura 17: Peptídeos auto N7. Citocinas Inflama – TOxSAU e RCxSAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM PRODUÇÃO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo N7 para as citocinas INFLAMA na comparação entre os grupos. a) TOxRC ($p=0,007$, Qui-quadrado) e b) RCxSAU ($p=0,001$, Qui-quadrado).

Vale destacar que o efeito do peptídeo N7 sobre a produção de IL-2, foi basicamente de inibição marcante, em todos os grupos, havendo aumento/indução em apenas 3 casos (1 RC, 1 EST e 1 SAU).

Não encontramos diferenças significativas em relação à quantidade de citocina (pg/ml) produzida e/ou inibida diante do estímulo com o peptídeo N7, na comparação conjunta de todos os grupos (Kruskal-Wallis) ou dois a dois (Mann-Whitney, $p=ns$).

Observamos grande variabilidade de efeito do peptídeo N7 na quantidade de citocinas produzidas. Dentre as citocinas REGULA produzidas em maiores quantidades, destaca-se a IL-10, principalmente, em TO (valor máximo de 188,9 pg/ml, na TO), enquanto que, para aquelas com perfil predominantemente INFLAMA, as produzidas em maiores quantidades foram IL-6 (valor máximo de > 16.000 pg/ml, na RC), IL-8 (valor máximo de > 14.000 pg/ml, em SAU), IFN- γ (valor máximo de > 1500 pg/ml, na TO).

Pep C9- INFLAMA - Citocinas com perfil REGULA / INFLAMA

O peptídeo C9 tem sido considerado com atividade predominantemente INFLAMA, com base em dados anteriores do grupo. De forma semelhante aos peptídeos N6 e N7, o peptídeo C9 induziu efeitos tanto de inibição, quanto de indução/aumento da produção de citocinas com perfil predominantemente REGULA, assim como daquelas predominantemente INFLAMA em, praticamente, todos os grupos (considerando diferenças com valores ≥ 1 pg/ml) (Tabela 13). Chama a atenção que houve efeito mais frequentemente nas citocinas INFLAMA do que nas REGULA, e que os efeitos foram predominantemente do tipo REGULA para as citocinas REGULA, e INFLAMA para as citocinas INFLAMA.

A frequência global do efeito do peptídeo C9 apresentando o perfil REGULA foi maior para o grupo EST, e menor para o grupo RC (TO: 30%; RC: 21,4%; EST: 39,6%; SAU: 31,3%). Por outro lado, a frequência do perfil

Tabela 13: Efeito do autoantígeno - Pep-C9 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-3,0	-236,5	-1,7	-40,7	-94,9	-3817,3	-0,9	2763,1	-12044,8	-26,6	-88,1	79,6	0,0	-970,2	-454,1	-575,6	-2689,4	REGULA: 30%
	Ltx10	1,4	6,9	0,1	117,0	17,2	-2287,8	160,1	9654,7	-6358,4	2,6	381,3	213,7	0,0	222,4	26,6	-1534,6	-184,2	INFLAMA: 56,3%
	Ltx16	0,8	0,0	-0,9	8,5	-0,0	-1,9	44,6	915,9	2724,0	4,2	13,3	71,9	-106,2	49,9	181,3	-1371,8	21469,8	Sem Efeito: 13,8%
	Ltx62	1,3	3,7	0,3	84,1	20,3	-1220,0	134,2	9771,3	3584,1	2,0	46,0	268,5	20,4	199,2	11,7	13,5	899,6	RAZÃO
	Ltx91	5,1	-0,8	-0,7	236,0	16,8	17,7	327,1	17593,8	5367,1	44,2	355,6	227,4	4,1	10850,1	2363,8	261,5	21594,5	REG/INF: 0,5
	Media	1,1	-45,3	-0,5	81,0	-8,1	-1461,8	133,0	8139,7	-1345,6	5,3	141,6	172,2	-16,3	2070,3	425,8	-641,4	8218,0	
RC	Mediana	1,3	0,0	-0,7	84,1	16,8	-1220,0	134,2	9654,7	2724,0	2,6	46,0	213,7	0,0	199,2	26,6	-575,6	899,6	
	%Efeito REGULA:	60%	40%	0,0%	80%	60%		0,0%	0,0%	40%	20%	20%	0,0%	20%	20%	20%	60%	40%	
	%Efeito INFLAMA:	20%	20%	20%	20%	20%		80%	100%	60%	80%	80%	100%	40%	80%	80%	40%	60%	
	Razão REG/INF:	3	2	1	4	3		1	1	0,7	0,25	0,25	1	0,5	0,25	0,25	1,5	0,7	
	Ltx04	0,9	0,0	0,0	379,7	2,1	294,8	21,3	2080,7	518,2	16,7	16,0	50,9	0,0	121,4	28,8	803,1	352,0	REGULA: 21,4%
	Ltx05	1,5	2,6	0,9	395,8	12,7	-386,7	98,6	4070,2	16543,3	-7,1	50,6	52,7	0,0	344,6	49,8	1217,0	20990,9	INFLAMA: 64,3%
EST	Ltx13	1,0	0,0	0,9	951,5	2,2	-3412,6	77,8	16103,1	-9836,1	11,3	-8,3	533,5	0,0	86,5	21,2	-1627,6	1469,9	Sem Efeito: 14,3%
	Ltx24	5,0	-1,9	-0,7	261,1	1,5	31,4	1040,7	23599,9*	14452,9	10,5	52,2	1589,8	140,3	321,7	887,8	888,4	20313,2	RAZÃO
	Ltx26	3,6	-1,9	-0,9	457,1	0,5	18,5	146,5	23599,9*	5014,3	14,6	53,5	913,0	2,9	211,4	187,8	5762,8	21596,8	REG/INF: 0,3
	Ltx79	6,1	0,0	-0,9	415,8	1,0	23,2	526,3	23599,9*	3680,6	23,2	50,9	1856,1	85,4	526,1	1669,0	3131,7	21711,2	
	Ltx87	4,6	0,0	-1,0	149,1	0,6	28,5	112,8	23599,9*	4787,8	10,1	37,3	347,9	-14,4	223,1	65,0	4396,9	1618,3	
	Media	3,3	-0,2	-0,3	430,0	2,9	-486,1	289,1	7418,0	5023,0	11,3	36,0	763,4	30,6	262,1	415,6	2081,8	12578,9	
SAU	Mediana	3,6	0,0	-0,7	395,8	1,5	23,2	112,8	4070,2	4787,8	11,3	50,6	533,5	0,0	223,1	65,0	1217,0	20313,2	
	%Efeito REGULA:	85,7%	14,3%	0,0%	100,0%	71,40%		0,0%	0,0%	14,3%	14,3%	14,3%	0,0%	14,3%	0,0%	0,0%	14,3%	0,0%	
	%Efeito INFLAMA:	0,0%	28,6%	14,3%	0,0%	0,0%		100,0%	100,0%	85,7%	85,7%	85,7%	100,0%	42,9%	100,0%	100,0%	85,7%	100,0%	
	Razão REG/INF:	R	0,5	1	R	R		1	1	0,2	0,2	0,2	1	0,3	1	1	0,2	1	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo C9, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreado de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo C9, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. (Qui-quadrado: ns).

Tabela 13 (Continuação): Efeito do autoantígeno - Pep-C9 (Hsp60) - na indução e/ou inibição da produção de citocinas

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-2	IL-1B	IL-6	IL-8	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	MIP-1B	Frequência Global Resposta REGULA / INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	0,9	0,3	-0,2	41,2	17,6	-3999,5	128,3	1065,6	991,4	-3,6	21,4	-18,9	0,0	56,4	-20,3	-496,5	0,9	REGULA: 39,6%
	Ltx12	-1,4	-7,8	-7,3	153,2	7,2	-1630,8	-19,7	1141,0	-2293,4	-620,6	-54,3	20,9	-852,1	-323,5	10,5	1552,6	58,4	INFLAMA: 41,7%
	Ltx14	-0,8	-0,2	-0,5	244,0	2,1	289,3	115,8	7065,2	-11758,6	-2,3	16,1	186,7	0,0	386,4	18,1	-2351,1	511,7	Sem Efeito: 18,8%
	Media	-0,4	-2,6	-2,7	146,1	9,0	-1780,3	74,8	3090,6	-4353,6	-208,9	-5,6	62,9	-284,0	39,8	2,8	-431,7	190,3	RAZÃO
	Mediana	-0,8	-0,2	-0,5	153,2	7,2	-1630,8	115,8	1141,0	-2293,4	-3,6	16,1	20,9	0,0	56,4	10,5	-496,5	58,4	REG/INF: 0,9
%Efeito REGULA:		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%		33,3%	0,0%	66,7%	100,0%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	66,7%	0,0%	
%Efeito INFLAMA:		33,3%	33,3%	33,3%	0,0%	0,0%		66,7%	100,0%	33,3%	0,0%	66,7%	66,7%	0,0%	66,7%	66,7%	33,3%	66,7%	
Razão REG/INF:		I	I	I	R	R		0,5	I	2	R	0,5	0,5	R	0,5	0,5	2	I	
SAU	Ltx18	2,6	0,0	-0,8	86,0	0,3	9,1	421,4	23599,9*	-1320,9	3,7	22,9	1305,7	0,9	138,4	18,0	-179,0	20307,3	REGULA: 31,3%
	Ltx36	1,2	14,7	1,0	559,2	11,7	-5501,6	58,2	4112,0	14220,5	51,3	63,7	110,7	0,0	142,4	91,9	2587,5	21228,6	INFLAMA: 48,8%
	Ltx41	1,3	0,0	-0,5	432,0	6,6	-3985,2	74,9	7041,8	-1914,4	44,0	25,0	189,4	0,0	140,8	22,7	220,0	1020,0	Sem Efeito: 20%
	Ltx44	-0,7	0,0	-1,1	-1,9	-0,8	-7,9	0,9	-3,8	-997,8	-0,5	-6,4	-1,5	-165,8	-26,6	-6,5	-40,1	-368,2	RAZÃO
	Ltx84	1,4	0,4	-0,5	435,7	6,0	-1606,6	102,9	6955,1	3028,5	14,0	44,5	247,9	0,0	130,4	48,7	2637,8	1867,1	REG/INF: 0,6
Media		1,1	3,0	-0,4	302,2	4,8	-2218,4	131,6	4526,3	2603,2	22,5	30,0	370,4	-33,0	105,1	35,0	1045,2	8810,9	
Mediana		1,3	0,0	-0,5	432,0	6,0	-1606,6	74,9	5533,5	-997,8	14,0	25,0	189,4	0,0	138,4	22,7	220,0	1867,1	
%Efeito REGULA:		80%	20%	20%	80%	60%		0,0%	20%	60,0%	0,0%	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%	40,0%	20,0%	
%Efeito INFLAMA:		0,0%	0,0%	20,0%	20,0%	0,0%		80,0%	80,0%	40,0%	80,0%	80,0%	80,0%	0,0,0%	80,0%	80,0%	60,0%	80,0%	
Razão REG/INF:		R	R	1	4	R		I	0,25	1,5	I	0,25	0,25	R	0,25	0,25	0,7	0,25	

Os valores da tabela foram calculados descontando-se do valor da citocina produzida pelas PBMC estimuladas com o peptídeo C9, o valor encontrado na condição sem estímulo (produção espontânea), para cada indivíduo. As citocinas em azul foram consideradas predominantemente, REGULA, e as citocinas em vermelho, predominantemente, INFLAMA. A citocina em verde (IL-2) não foi considerada com atividade predominantemente REGULA ou INFLAMA. Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo: a) induzir citocinas: quando não havia produção espontânea e o peptídeo levou à produção $\geq 1\text{pg/ml}$; b) aumentar a produção de citocinas: havia produção espontânea e o estímulo com o peptídeo levou a um aumento desta citocina $\geq 1\text{pg/ml}$; c) inibir a produção de citocinas: havia produção espontânea e o peptídeo levou a uma diminuição (parcial ou total) de pelo menos $\geq 1\text{pg/ml}$ da citocina; d) sem efeito: não modificou a produção de citocinas, em relação à condição sem estímulo. Valores em vermelho= valores negativos com inibição da produção de citocinas; Valores em preto= valores positivos para produção de citocinas e valores sem efeito. Classificação dos efeitos de modificação de produção de citocinas: REGULA: há indução de produção ou aumento de citocinas com perfil predominantemente REGULA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA; INFLAMA: há o aumento ou indução de produção de citocinas com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição de citocinas com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA do efeito do antígeno. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA do efeito do antígeno. Sem sombreamento de cor indica não haver efeito que possa ser classificado como REGULA ou INFLAMA, isto é, sem efeito ou efeitos encontrados sem predomínio REGULA ou INFLAMA. Calculamos a porcentagem do efeito com perfil REGULA ou INFLAMA para cada citocina, a porcentagem de não efeito, e a respectiva razão REGULA/INFLAMA, para cada grupo clínico (linha abaixo do valor da mediana). Na última coluna, mostramos a porcentagem global do efeito com perfil REGULA e INFLAMA, a porcentagem de NÃO EFEITO, para cada grupo clínico e a respectiva razão REGULA/INFLAMA. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=7); EST: estável (n=3); SAU: saudável (n=5); n total=20 indivíduos. OOR (Fora do alcance, em inglês, Out of Range) - OOR<: limite inferior de detecção / OOR>: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-4 (OOR > 0,82 e < 3676,08); IL-5 (OOR > 2,18 e < 8953); IL-7 (OOR > 1,73 e < 28975); IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47); IL-13 (OOR > 0,86 e < 14996,07); IL-2 (OOR > 8,3 e < 10015,26); IL-1B (OOR > 2,02 e < 29090,07); IL-6 (OOR > 6,32 e < 23,599,9); IL-8 (OOR > 1,42 e < 26599,9); IL-12 (OOR > 2,76 e < 43369,64); IL-17 (OOR > 9,755 e < 20735); G-CSF (OOR > 0,72 e < 2425,89); GM-CSF (OOR > 197,63 e < 49082); IFN-γ (OOR > 41,1 e < 39741,12); TNF-α (OOR > 1,97 e < 30517,8); MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92) e MIP-1B (OOR > 5,88 e < 21761,9). Para o efeito do peptídeo C9, na razão REGULA/INFLAMA, foram considerados os valores como REGULA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. (Qui-quadrado: ns).

INFLAMA, para o efeito do peptídeo C9, foi maior para RC e menor para o grupo EST (TO: 56,3%; RC: 64,3%; EST: 41,7%; SAU: 48,8%).

A razão global da frequência REGULA/INFLAMA, para o efeito do peptídeo C9, foi maior para o grupo EST (TO: 0,5, RC: 0,3, EST: 0,9 e SAU: 0,6). Ou seja, o peptídeo C9 induziu mais frequentemente efeitos do perfil INFLAMA, em relação à produção do conjunto das citocinas estudadas nos grupos TO, RC, SAU, exceto no grupo EST que foi mais equilibrado em relação a efeitos REGULA e INFLAMA.

Comparando os grupos TO e RC, em relação aos efeitos do peptídeo C9, observamos diferenças significativas em relação ao conjunto das citocinas INFLAMA, considerando os efeitos do tipo REGULA, INFLAMA ou mesmo a ausência de efeito; quando a proporção do efeito REGULA foi maior na TO ($p=0,02$; Qui-quadrado) (Figura 18). No entanto, não observamos diferença nessas proporções em relação às citocinas REGULA ($p=0,4$, Qui-quadrado).

Figura 18: Peptídeo auto C9. Citocinas Inflama - TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM PRODUÇÃO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo C9 na comparação entre os grupos TO, RC e SAU para o efeito de citocinas INFLAMA, TOxRC ($p=0,002$, Qui-quadrado).

Destacamos o efeito do peptídeo C9 mais do tipo REGULA na produção de IL-5 na TO (Razão REGULA/INFLAMA: 2), em contraste com o

efeito preponderante INFLAMA na RC (Razão REGULA/INFLAMA: 0,5). Não observamos diferenças de efeitos para as demais citocinas REGULA (IL-4, IL-10 e IL-13); o peptídeo C9 teve efeito predominantemente REGULA, na TO e, na RC só houve, unicamente, efeito REGULA para essas citocinas. Para as citocinas INFLAMA, apesar do efeito do peptídeo C9 ter sido, predominantemente, INFLAMA tanto para TO como para RC, houve uma diferença significativa, destacando-se o efeito na produção de MCP-1 que foi REGULA na TO (Razão REGULA/INFLAMA=1,5), e INFLAMA no grupo RC (Razão REGULA/INFLAMA=0,2). Para todas as outras citocinas INFLAMA, o efeito do peptídeo C9 foi predominantemente INFLAMA.

Destacamos que o efeito do peptídeo C9 em relação à produção da IL-2 foi, basicamente, de inibição, exceto pelo grupo de RC no qual, observamos mais efeito de indução/aumento de produção da citocina. Esta foi uma diferença clara entre RC e todos os outros grupos.

Na comparação de TO com o grupo de indivíduos saudáveis, o efeito do peptídeo C9 foi muito semelhante, não havendo diferenças significativas entre os perfis de frequência de efeito REGULA ou INFLAMA e ausência de efeitos, seja em relação às citocinas REGULA ($p=0,4$, Qui-quadrado), ou em relação às citocinas INFLAMA ($p=0,8$, Qui-quadrado). Os efeitos foram, predominantemente, REGULA na produção de citocinas REGULA, e efeito INFLAMA na produção de citocinas INFLAMA. No grupo de EST, o efeito, em geral, foi mais equilibrado entre REGULA e INFLAMA, mas o número de indivíduos foi pequeno ($n=3$).

No que diz respeito à quantidade de citocina (pg/ml) produzida e/ou inibida diante do estímulo com o peptídeo C9, não encontramos diferenças

significativas entre os grupos de estudo, analisados conjuntamente (Kruskal-Wallis). Entretanto, na comparação entre os grupos TO e RC, observamos as seguintes diferenças significativas frente ao estímulo com o peptídeo C9: (i) na RC, o aumento dos níveis de IL-10 foi maior ($p=0,005$, Mann-Whitney,) (efeito REGULA para ambos os grupos), (ii) na RC, os níveis de MCP-1 foram maiores, tendo havido predominantemente efeito de aumento de produção, pelo peptídeo C9 (Mann-Whitney, $p=0,05$; Efeito predominante INFLAMA), em contraste com o efeito no grupo TO que foi, predominantemente, de inibição (efeito predominante REGULA) (Figura 19). Apesar dos maiores níveis de IL-10 na RC em relação ao grupo TO, induzidos pelo peptídeo C9, a razão dos níveis de IL-10/MCP-1 (REGULA/INFLAMA) na TO foi de 4,5 (para este cálculo, imputamos como valor de mediana para MCP-1 o limite de detecção, uma vez que os valores foram negativos na TO), enquanto que para o grupo RC foi de 0,3, apontando um predomínio REGULA em TO e INFLAMA na RC.

Figura 19: Produção citocinas IL-10 e MCP-1 frente ao estímulo com o peptídeo C9 - TOxRC, nos sobrenadantes de cultura de PBMC após 48h, por Luminex. TO: tolerância operacional (n=5) e RC: rejeição crônica (n=7). A comparação entre os grupos TOxRC, mostrou significância estatística (Mann Whitney) para as citocinas: a) IL-10 ($p=0,005$) e b) MCP-1 ($p=0,05$). OOR (Fora do alcance, em inglês, *Out of Range*) - OOR>: limite inferior de detecção / OOR<: limite superior de detecção; Os limites de detecção de cada citocina foram: IL-10 (OOR > 2,46 e < 27189,47) e MCP-1 (OOR > 18,78 e < 5861,92).

Na comparação entre RC e SAU, também observamos uma diferença significativa para o efeito do peptídeo C9 na produção de IL-2; com níveis menores no grupo SAU (Mann-Whitney, $p=0,05$), que teve predominantemente inibição da produção, em contraste com o grupo de RC que teve predominantemente indução da produção de IL-2 (Figuras 20).

Apesar da quantidade de diversas citocinas ter sido bem alta, como por exemplo, para IL-6 (valor máximo >20.000 pg/ml, em RC e SAU), IL-8 (valor máximo >16.000 pg/ml, em RC), MCP-1 (valor máximo >5000 pg/ml, em RC) e MIP-1B (valor máximo >20.000 pg/ml, em TO, RC e SAU), observamos grande variabilidade de efeito do peptídeo C9 na quantidade de citocinas produzidas. Dentre as citocinas REGULA produzidas em maiores quantidades, destaca-se a IL-10 para todos os grupos clínicos.

4.2 Resposta celular proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T REGULA e INFLAMA, dirigida a antígenos alogeneicos, antígenos derivados de um microrganismo patogênico e antígenos autólogos

Analizamos a alorreatividade, a reatividade a antígenos de um microrganismo patogênico (CMV) e a autorreatividade (peptídeos da Hsp60) , na reposta celular proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ apresentando fenótipos imunorregulador (REGULA; Células Tregs: CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ (Figura 21)) ou pró-inflamatórios (INFLAMA; Células T: Efetoras: CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻ (Figura 22) e Memória Efetora: CCR7⁻CD27⁻CD45RA⁻ (Figura 23)), comparativamente, nos diferentes grupos clínicos (Tolerância operacional: TO (n=06), Rejeição crônica: RC (n=08), Estáveis com doses habituais de imunossupressores: EST (n=08) e Saudáveis: SAU (n=07)).

Figura 21: Células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ FOXP3⁺). A partir da região de células CD4, foi feito um gate nas regiões que caracterizam as células Tregs como mostrado em material e métodos para análise do fenótipo completo de Treg, usamos a análise *boolean* no FlowJo. (A) Proliferação de células T regs frente ao estímulo com o peptídeo CMV em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx40 – SAU). B) Inibição de proliferação de células T regs frente ao estímulo com o peptídeo N6, em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx03 – TO).

Figura 22: Células T efetoras ($CD4^+CD27^-CD28^+CD45RA^-CD127^+$). A partir da região de células $CD4^+$, foi feito um gate nas regiões que caracterizam as células Tefetoras e verificado a proliferação e inibição deste tipo celular como mostrado em material e métodos para análise do fenótipo completo de T efetora, usamos a análise *boolean* no FlowJo. (A) Proliferação de células Tefetoras frente ao estímulo com o peptídeo HLA-DR em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx26 – RC). (B) Inibição de proliferação de células Tefetora frente ao estímulo com o peptídeo de microrganismo patogênico CMV, em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx36 – RC).

Figura 23: Células T de memória efetora ($CD4^+CCR7^-CD27^-CD45RA^-$). A partir da região de células $CD4^+$, foi feito um gate nas regiões que caracterizam as células T de memória efetora e verificado a proliferação e inibição deste tipo celular como mostrado em material e métodos para análise do fenótipo completo de T de memória efetora, usamos a análise *boolean* no FlowJo. (A) Proliferação de células T de memória efetora frente ao estímulo com o peptídeo CMV em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx79 – RC). (B) Inibição de proliferação de células T de memória efetora frente ao estímulo com o peptídeo de microrganismo patogênico CMV, em relação à condição sem estímulo (sujeito de pesquisa utilizado: Ltx16 – TO).

A proliferação das diferentes subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ foi analisada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, cultivadas com e sem os estímulos antígenicos, por 7 dias. Como

controle positivo da proliferação, utilizamos as mesmas PBMCs marcadas, estimuladas com o anticorpo anti-CD3 (Figura 24). As células que proliferam perdem a intensidade de fluorescência (IF) de CFSE e podem ser quantificadas dentro da região de baixa intensidade de fluorescência. Utilizamos uma combinação de anticorpos monoclonais específicos para determinar as diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ REGULA e INFLAMA, e quantificar a proliferação de cada subpopulação.

Figura 24: Proliferação de linfócitos T CD4⁺, e as condições com estímulo e estimulada com anti-CD3. Análise dentro da região de linfócitos, em PBMCs previamente marcadas com CFSE e estimuladas com anti-CD3, após 7 dias de cultura. Estratégia de análise dentro da região de linfócitos, células vivas e CD4⁺.

Analizamos a proliferação espontânea (sem estímulo antigênico), assim como a proliferação sob efeito dos diferentes antígenos, especificamente das diferentes subpopulações de linfócitos T REGULA e INFLAMA, e comparamos os resultados nos diferentes grupos clínicos. Para o cálculo do efeito dos diferentes antígenos, seja induzindo proliferação, aumentando, ou inibindo a proliferação espontânea, subtraímos o valor da percentagem de células em proliferação espontânea, do valor na presença do antígeno.

4.2.1 Proliferação espontânea de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4+ REGULA e INFLAMA nos diferentes grupos clínicos

Observamos proliferação espontânea de todas as subpopulações de linfócitos T CD4+, em todos os grupos clínicos, considerando como ponte de corte para proliferação o valor de $\geq 1\%$ de células, dentro da região de baixa intensidade de fluorescência para CFSE (células em proliferação) (Tabela 14).

Tabela 14: Porcentagem de Proliferação Espontânea de células CD4 de diferentes fenótipos nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	80,1	58,50	72,7	REGULA: 100% INFLAMA: 100% RAZÃO REG/INF: 1
	Ltx10	65,4	57,90	71,3	
	Ltx16	19,2	6,63	14,1	
	Ltx62	38,6	12,50	20,9	
	Ltx90	3,77	1,97	1,06	
	Ltx91	22,0	1,01	3,13	
<i>Mediana</i>		65,40	35,20	46,10	
Frequência de Prolif		100%	100%	100%	
RC	Ltx04	33,3	11,20	10,1	REGULA: 100% INFLAMA: 56,3% RAZÃO REG/INF: 1,8
	Ltx05	21,4	0,46	33,8	
	Ltx13	14,1	3,41	15	
	Ltx24	26,5	1,64	2,69	
	Ltx26	2,62	0,28	0,12	
	Ltx79	2,61	0,28	0,57	
	Ltx80	7,56	0	0,036	
	Ltx87	2,38	1,43	3,63	
<i>Mediana</i>		21,40	2,53	12,55	
Frequência de Prolif		100%	50%	63%	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação espontânea (sem estímulo antigênico). A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Consideramos proliferação, valores de pelo menos 1% de proliferação. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA da subpopulação em proliferação espontânea. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA da subpopulação em proliferação espontânea. Sem sombreamento de cor indica não ter ocorrido proliferação espontânea. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). TO x RC: p=0,03; TO x SAU p=0,01; Qui-quadrado. R: Quando não é possível calcular a razão REG/INF, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF, pois só ocorreu efeito inflama.

Tabela 14 (Continuação): Porcentagem de Proliferação Espontânea de células CD4 de diferentes fenótipos nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	25,8	9,44	14,8	REGULA: 87,5%
	Ltx12	55	27,50	8,04	INFLAMA: 62,5%
	Ltx14	9,03	9,30	5,87	RAZÃO
	Ltx19	5,81	0	0	REG/INF: 1,4
	Ltx22	41,4	1,28	99,9	
	Ltx31	11,9	0,12	0,13	
	Ltx33	5,65	1,28	2,28	
	Ltx71	0,43	0	0	
Mediana		25,80	9,37	11,42	
Frequência de Prolif		88%	63%	63%	
SAU	Ltx18	0,38	0,11	65,3	REGULA: 85,7%
	Ltx36	66,4	55,70	41,3	INFLAMA: 50%
	Ltx37	2,38	0,70	0	RAZÃO
	Ltx40	3,03	0	0,95	REG/INF: 1,7
	Ltx41	4,08	0,54	5,33	
	Ltx44	55,6	0	40,3	
	Ltx84	22,1	5,85	13,4	
Mediana		22,10	3,28	9,37	
Frequência de Prolif		86%	29%	71%	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação espontânea (sem estímulo antigênico). A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Consideramos proliferação, valores de pelo menos 1% de proliferação. Os valores sombreados na cor azul indicam um perfil REGULA da subpopulação em proliferação espontânea. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam o perfil INFLAMA da subpopulação em proliferação espontânea. Sem sombreamento de cor indica não ter ocorrido proliferação espontânea. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). TO x RC: p=0,03; TO x SAU p=0,01; Qui-quadrado. R: Quando não é possível calcular a razão REG/INF, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF, pois só ocorreu efeito inflama.

A proliferação espontânea da subpopulação de células T CD4+ reguladoras (Treg) (CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺), ocorreu em, praticamente, todos os sujeitos de pesquisa de todos os grupos, exceto por um indivíduo do grupo EST e outro do SAU. Assim, não houve diferenças na frequência de proliferação espontânea de Treg entre os diferentes grupos. No entanto, a comparação da do número de proliferação espontânea de todas as três subpopulações, apresentando o perfil REGULA (Células CD4+ T regs) ou

INFLAMA (Células CD4⁺ T efetoras e T memória efetora), assim como a frequência de ausência de proliferação, mostrou diferença significativa entre os grupos TO e RC ($p=0,03$; Qui-quadrado). Esta comparação foi igualmente significativa entre o grupo TO e SAU ($p=0,01$; Qui-quadrado) (Figura 25).

Figura 25: Proliferação Espontânea – TOxRC e TOxSAU. Perfil do número de casos de proliferação espontânea em populações Reguladoras e Efetoras. REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) e SEM PROLIFERAÇÃO (cinza) na comparação entre os grupos: a) TOxRC ($p=0,03$, Qui-quadrado) e b) TOxSAU ($p=0,01$, Qui-quadrado).

As diferenças de perfil de proliferação espontânea ocorreram em relação às subpopulações de células T CD4⁺ efetoras (CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻) e de células T CD4⁺ de memória efetora (CCR7⁻CD27⁻CD45RA⁻), cuja proliferação ocorreu menos frequentemente na RC e no grupo SAU, em relação ao grupo TO, que teve proliferação em todos os casos estudados. O perfil de proliferação espontânea das subpopulações de células T CD4⁺ REGULA e INFLAMA não foi estatisticamente diferente entre RC e SAU ($p=0,8$; Qui-quadrado). A razão REGULA/INFLAMA da frequência da proliferação espontânea foi equilibrado na TO (Razão=1) e predominantemente REGULA nos grupos RC (Razão=1,8), EST (Razão=1,4) e SAU (Razão=1,7), indicado uma proporção maior de proliferação de células T reguladoras do que efetoras

e de memória efetora, em todos os grupos, menos na TO, onde houve um equilíbrio.

A comparação dos valores de percentagem de células em proliferação espontânea mostrou diferenças significativas para a subpopulação de células T efetora CD4+, com maiores percentagens no grupo TO, em comparação ao grupo de RC ($p=0,03$; Mann-Whitney), assim como em relação ao grupo SAU ($p=0,03$; Mann-Whitney) (Figura 26). Apesar de não termos encontrada diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de células Treg CD4+ em proliferação espontânea, entre TO e RC, a razão desses valores entre TO e RC foi de 2,7, indicando maiores % de Treg em proliferação na TO. De forma semelhante, a razão entre as percentagens de Treg em proliferação entre TO e SAU foi de 1,7.

Figura 26: Proliferação Espontânea das diferentes subpopulações celulares de células T CD4+. Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação espontânea (sem estímulo antigênico). A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise das diferentes subpopulações compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e CD4+ e, em seguida a análise booleana, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação dentro das células CD4+. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, células efectoras: TOxRC: $p=0,03$; TOxSAU: $p=0,03$).

4.2.2. Alorreatividade: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T REGULA e INFLAMA, dirigida a peptídeos HLA-DR, nos diferentes grupos clínicos

Avaliamos a resposta proliferativa alogênica, utilizando peptídeos derivados de moléculas HLA-DR alo, seja da disparidade do doador (nos indivíduos transplantados), ou simplesmente de uma molécula HLA-DR alo, não presente no indivíduo saudável.

Os peptídeos HLA-DR alo levaram tanto à indução ou aumento de proliferação ($\geq 1\%$ de células em proliferação), assim como inibição de proliferação espontânea (de pelo menos 1% de células em proliferação) das diferentes subpopulações de células T CD4⁺ REGULA e INFLAMA, nos diferentes grupos clínicos. Apesar do perfil global da frequência dos efeitos REGULA (induzir proliferação de células Treg ou inibir a proliferação das subpopulações efetora e de memória efetora) ou INFLAMA (induzir proliferação das subpopulações efetora e de memória efetora ou inibir a proliferação de células Treg), assim como a falta de efeito, não ter sido estatisticamente diferente entre os grupos TO x RC ($p=0,4$; Qui-quadrado), observamos algumas diferenças relevantes. As razões REGULA/INFLAMA, em relação aos efeitos dos peptídeos HLA-DR alo, mostraram um predomínio REGULA na TO (Razão=2) e no grupo EST (Razão=2), em contraste com o predomínio INFLAMA nos SAU (Razão=0,6) e mais equilibrado na RC (Razão=0,8). (Tabela 15).

Tabela 15: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo HLA-DR nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-63,10	-0,40	-63,12	REGULA: 55,6%
	Ltx10	13,60	-1,30	1,50	INFLAMA: 27,8%
	Ltx16	69,50	-6,09	-12,81	Sem Efeito: 16,7%
	Ltx62	-11,90	-3,07	-6,30	RAZÃO
	Ltx90	-3,09	-1,97	-0,02	REG/INF: 2
	Ltx91	-9,50	-0,79	-2,06	
Mediana		-6,30	-1,64	-4,18	
%Efeito REGULA:		33,3%	66,7%	66,7%	
%Efeito INFLAMA:		66,7%	0,0%	16,7%	
Razão REG/INF:		0,5	R	4	
RC	Ltx04	-26,19	-4,75	19,20	REGULA: 33,3%
	Ltx05	-16,18	-0,46	-22,10	INFLAMA: 41,7%
	Ltx13	-8,49	3,77	-7,80	Sem Efeito: 25%
	Ltx24	-11,30	-1,64	0,87	RAZÃO
	Ltx26	11,38	3,60	1,26	REG/INF: 0,8
	Ltx79	8,29	0,27	1,06	
	Ltx80	-6,59	0,00	0,03	
	Ltx87	-0,55	-1,25	-2,46	
Mediana		-7,54	-0,23	0,45	
%Efeito REGULA:		25%	37,5%	37,5%	
%Efeito INFLAMA:		50%	25%	37,5%	
Razão REG/INF:		0,4	1,5	1	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o peptídeo HLA-DR alo. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno HLA-DR. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo HLA-DR: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve proliferação ou modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns.

Tabela 15: (Continuação) Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo HLA-DR nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	5,60	-3,65	18,50	REGULA: 41,7%
	Ltx12	-20,30	-13,80	10,56	INFLAMA: 20,8%
	Ltx14	-3,38	-4,07	4,43	Sem Efeito: 37,5%
	Ltx19	7,59	0,00	0,06	RAZÃO
	Ltx22	4,10	-0,25	0,10	REG/INF: 2
	Ltx31	3,50	-0,05	-0,07	
	Ltx33	1,04	-1,11	-2,00	
	Ltx71	0,13	0,00	0,04	
Mediana		2,27	-0,68	0,08	
%Efeito REGULA:		62,5%	50%	12,5%	
%Efeito INFLAMA:		25%	0,0%	37,5%	
Razão REG/INF:		2,5	R	0,3	
SAU	Ltx18	-0,04	-0,02	-53,60	REGULA: 28,6%
	Ltx36	-40,20	-12,90	-7,90	INFLAMA: 47,6%
	Ltx37	-1,83	1,02	5,46	Sem Efeito: 19%
	Ltx40	1,53	0,00	-0,45	RAZÃO
	Ltx41	-1,32	-0,54	1,56	REG/INF: 0,6
	Ltx44	39,90	3,10	-18,70	
	Ltx84	-4,50	6,65	2,10	
Mediana		-1,32	0,00	-0,45	
%Efeito REGULA:		28,6%	14,3%	42,9%	
%Efeito INFLAMA:		57,1%	43%	42,9%	
Razão REG/INF:		0,5	0,3	1	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o peptídeo HLA-DR alo. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno HLA-DR. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo HLA-DR: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve proliferação ou modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns.

O efeito dos peptídeos HLA-DR-alo na resposta proliferativa das células

Treg foi, principalmente, de inibição da proliferação espontânea, total ou parcialmente (efeito INFLAMA), em quase todos os grupos clínicos (razões dos

efeitos REGULA/INFLAMA para as Treg: TO: 0,5; RC: 0,4; SAU: 0,5), exceto para o grupo estável que teve predomínio de efeito REGULA (EST: razão REGULA/INFLAMA dos efeitos dos peptídeos HLA-DR alo: 2,5). (Tabela 15).

A comparação do efeito final dos peptídeos HLA-DR-alo, em proliferação de Tregs, não mostrou diferenças significativas nas porcentagens de células em proliferação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,6537$) ou na comparação dois a dois (Mann Whitney: $p=ns$) (Figura 27).

Figura 27: Porcentagem de células CD4+ T reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). Pep DR: a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeos HLA-DR alo ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,7$) ou comparação dois a dois (Mann Whitney, $p=ns$).

Em relação às subpopulações com perfil INFLAMA (T CD4+ Efetora: CD4⁺CD28⁺CD127⁺CD45RA⁻CD27⁻ e T CD4+ memória Efetora: CD27-CCR7-CD45RA⁻), os peptídeos HLA-DR alo também tiveram efeitos tanto de inibir a proliferação espontânea (Efeito REGULA) quanto de induzir/aumentar a sua proliferação (Efeito INFLAMA) (Tabela 15). Mais uma vez, o perfil das

frequências de efeitos REGULA e INFLAMA, assim como a ausência de efeito na proliferação dessas subpopulações, não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre TO e RC ou entre TO e SAU (Qui-quadrado $p > 0,05$). Não obstante, vale destacar que os efeitos dos peptídeos HLA-DR alo do doador foram, unicamente, REGULA para as células CD4⁺ T efetoras, e predominantemente REGULA para as células T CD4⁺ memória Efetora, na TO (Razão REGULA/INFLAMA: 4). Em contraste, na RC houve tanto efeito REGULA quanto INFLAMA (razões REGULA/INFLAMA na RC: para T CD4⁺ efetora: 1,5; para T CD4⁺ Memória efetora: 1). Também vale destacar que, no grupo SAU, o efeito dos peptídeos HLA-DR alo foi, principalmente, de induzir ou aumentar a proliferação da subpopulação de T CD4⁺ efetora (razão REGULA/INFLAMA para T efetora: 0,3), portanto efeito mais INFLAMA, e para as células T de memória efetora CD4⁺, o efeito foi equilibrado (razão REGULA/INFLAMA para T efetora: 1). O balanço global da resposta proliferativa em relação a peptídeos HLA-DR alo, nos SAU foi, predominantemente, INFLAMA, com razão REGULA/INFLAMA de 0,6, indicando um perfil inflamatório da alorreatividade celular no estado fisiológico.

A comparação do efeito final dos peptídeos HLA-DR alo, não mostrou diferenças significativas entre as percentagens de células T efetoras em proliferação, nos diferentes grupos, analisados em conjunto, (Kruskal-Wallis, $p=0,13$) ou na comparação dois a dois (Mann-Whitney: $p=ns$) (Figura 28).

Em relação à subpopulação de células T CD4 de memória efetora, a comparação do efeito final dos peptídeos HLA-DR alo, não mostrou diferenças significativas entre as percentagens de células em proliferação, nos diferentes grupos, analisados em conjunto (Kruskal-Wallis, $p=0,2$). Porém, na comparação de grupos, dois a dois, observamos percentagens de células em proliferação, significativamente menores, no grupo TO, que teve principalmente inibição de proliferação desta subpopulação, em contraste com o grupo EST que teve mais aumento/indução de proliferação (Mann-Whitney: $p=0,03$) (Figura 29).

Figura 29: Porcentagem de células CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Pep DR. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeos HLA-DR alo ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,2$) ou comparação dois a dois (Mann Whitney, TOxEST: $p=0,03$).

Em conclusão, o balanço global da alorreatividade proliferativa dirigida a peptídeos HLA-DR alo, mostrou um perfil diferencial em relação aos grupos TO e RC, com mais frequência do efeito REGULA na TO (Razão TO/RC para efeitos REGULA: 1,7) e mais frequência do efeito INFLAMA na RC (Razão TO/RC para efeitos INFLAMA: 0,6). Este mesmo perfil foi observado na comparação de TO com SAU (Razão TO/ SAU para efeitos REGULA: 1,9) (Razão TO/ SAU para efeitos INFLAMA: 0,6). Apesar de não termos encontrado diferenças estatisticamente significativas, esses dados indicam resposta alorreativa dirigida ao doador com perfil mais imunorregulador na TO, principalmente por efeito REGULA nas subpopulações efetoras, pró-inflamatórias.

4.2.3 Antígeno de microrganismo patogênico: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T (REGULA e INFLAMA) dirigida a peptídeos do CMV, nos diferentes grupos clínicos

O efeito global dos peptídeos do microrganismo patogênico, CMV, na proliferação de subpopulações de linfócitos T CD4+ com atividades funcionais imunorreguladora ou pró-inflamatória, foi mais REGULA, no grupo TO (Razão REGULA/INFLAMA: 1,4), INFLAMA no grupo RC (Razão REGULA/INFLAMA: 0,7), e um mais equilibrado entre REGULA e INFLAMA nos grupos EST (Razão REGULA/INFLAMA: 1,2) e SAU (Razão REGULA/INFLAMA: 1). Mais uma vez, observamos tanto inibição, quanto indução/aumento de proliferação (considerado aumentos ou diminuições > 1% de células em proliferação) das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4+ pelos peptídeos do CMV (Tabela 16).

A comparação global das frequências de efeitos REGULA, INFLAMA ou ausência de efeitos, considerando as três subpopulações de células CD4+, conjuntamente, não mostrou diferença significativa entre TO e RC ($p=0,4$, Qui-quadrado). Também não encontramos diferenças nas frequências de efeitos REGULA, INFLAMA ou ausência de efeitos entre TO e SAU ($p=0,08$, Qui-quadrado).

Tabela 16: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo CMV nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-49,00	-24,00	-20,10	REGULA: 55,6%
	Ltx10	11,40	-17,10	6,60	INFLAMA: 38,9%
	Ltx16	-19,20	-6,63	-14,10	Sem Efeito: 5,6%
	Ltx62	-18,30	-6,52	-10,10	RAZÃO
	Ltx90	-3,09	-1,26	16,24	REG/INF: 1,4
	Ltx91	-15,63	-0,31	-1,34	
	Mediana	-16,97	-6,58	-5,72	
%Efeito REGULA:		16,7%	83,3%	66,7%	
%Efeito INFLAMA:		83,3%	0,0%	33,3%	
Razão REG/INF:		0,2	R	2	
RC	Ltx04	-7,90	2,90	31,70	REGULA: 37,5%
	Ltx05	1,90	-0,14	-6,10	INFLAMA: 50%
	Ltx13	14,60	5,44	3,10	Sem Efeito: 12,5%
	Ltx24	16,80	11,36	3,69	RAZÃO
	Ltx26	4,45	3,14	1,88	REG/INF: 0,7
	Ltx79	43,59	2,61	8,62	
	Ltx80	2,74	0,00	4,49	
	Ltx87	1,42	-1,30	0,54	
	Mediana	3,60	2,76	3,40	
%Efeito REGULA:		87,5%	12,5%	12,5%	
%Efeito INFLAMA:		12,5%	62,5%	75%	
Razão REG/INF:		7	0,2	0,2	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno CMV. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno CMV. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo CMV: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Reguladora (TOxRC: Fisher: 0,02), Efetora (TOxRC: Qui-quadrado: 0,003) e (TOxSAU: Qui-quadrado: 0,02).

Tabela 16 (Continuação) :Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo CMV nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	-6,80	-9,44	3,20	REGULA:29,2%
	Ltx12	12,30	25,00	15,06	INFLAMA: 25%
	Ltx14	-4,57	-5,62	12,13	Sem Efeito: 37,5%
	Ltx19	17,89	0,04	0,00	RAZÃO
	Ltx22	12,10	-0,63	-0,20	REG/INF: 1,2
	Ltx31	34,60	0,01	0,10	
	Ltx33	-0,97	0,57	-1,15	
	Ltx71	-0,05	0,02	0,05	
Mediana		6,03	0,02	0,07	
%Efeito REGULA:		50%	25%	12,5%	
%Efeito INFLAMA:		25%	12,5%	37,5%	
Razão REG/INF:		2	2	0,3	
SAU	Ltx18	-0,11	0,49	14,80	REGULA:33,3%
	Ltx36	-16,30	-45,00	-16,40	INFLAMA: 33,3%
	Ltx37	9,62	-0,14	6,94	Sem Efeito:33,3%
	Ltx40	7,47	0,15	4,93	RAZÃO
	Ltx41	20,62	-0,03	14,67	REG/INF: 1
	Ltx44	27,70	0,00	0,00	
	Ltx84	-1,70	-1,27	9,50	
Mediana		7,47	-0,03	6,94	
%Efeito REGULA:		57,1%	28,5%	14,3%	
%Efeito INFLAMA:		28,6%	0,0%	71,4%	
Razão REG/INF:		2	R	0,2	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno CMV. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno CMV. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo CMV: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Reguladora (TOxRC: Fisher: 0,02), Efetora (TOxRC: Qui-quadrado: 0,003) e (TOxSAU: Qui-quadrado: 0,02).

No entanto, considerando as diferentes subpopulações de células CD4+, observamos algumas diferenças relevantes. Analisando o número de casos, dos efeitos REGULA, INFLAMA e sem efeito, dos peptídeos do patógeno CMV, sobre as células Treg, entre os grupos TO e RC, observamos diferença significativa ($p=0,02$, Teste de Fisher) (FIGURA 30). Analisando a frequência dos efeitos nas células Treg, também observamos um perfil predominantemente INFLAMA na TO (Razão REGULA/INFLAMA: 0,2) (Razão TO/RC para o efeito INFLAMA nas Treg: 6,6), inibindo a sua proliferação e, REGULA na RC (Razão REGULA/INFLAMA: 7), induzindo/aumentando a proliferação. Em relação ao grupo de SAU, apesar do efeito dos peptídeos CMV na subpopulação de Treg ter sido mais REGULA nos SAU (Razão REGULA/INFLAMA: 2), não encontramos diferença estatisticamente significativa entre TO e SAU em relação à resposta de Treg aos peptídeos CMV ($p=0,2$ Teste de Fisher). Ou seja, o efeito dos peptídeos CMV na resposta proliferativa das Treg foi semelhante na TO e SAU.

Figura 30: Peptídeo CMV. População Reguladora – TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM EFEITO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo CMV, nas populações Reguladoras, na comparação entre os grupos TO x RC ($p=0,02$, Fisher).

Quando comparamos o número de casos desses efeitos, apenas nas subpopulações com perfil pró-inflamatório (células CD4+ T efetoras e T de memória efetora), observamos perfil diferencial entre TO e RC ($p=0,003$, Qui-quadrado), (Figura 31) havendo mais efeitos REGULA na TO (Razão TO/RC para efeitos REGULA: 1,5), enquanto que, para o efeito INFLAMA foi mais equilibrada nesses dois grupos, clinicamente opostos (Razão TO/RC para efeitos INFLAMA: 0,8). Ou seja, na RC observamos basicamente indução/aumento de proliferação dessas duas subpopulações pró-inflamatórias, em contraste com a inibição da proliferação na TO (Razões REGULA/INFLAMA para as células T efetoras: TO: só efeito REGULA x na RC: 0,2; para as células T de memória efetora: TO: 2 x na RC: 0,2).

Figura 31: Peptídeos CMV. População Efetora – TOxRC e TOxSAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM EFEITO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo CMV nas populações Efetoras, na comparação entre os grupos TOxRC ($p=0,003$, Qui-quadrado) e TOxSAU ($p=0,02$, Qui-quadrado).

A despeito das diferenças no perfil de proliferação mais REGULA na resposta ao patógeno, a comparação global considerando as três subpopulações não deu diferença entre TO e SAU ($p=0,08$, Qui-quadrado), no entanto, diferenças significativas foram observadas em relação à resposta proliferativa aos peptídeos do CMV nas subpopulações pró-inflamatórias, entre TO e SAU ($p=0,02$, Qui-quadrado) (FIGURA 31). Em contraste com a comparação com RC, no grupo SAU, praticamente não houve efeito nas células efectoras e, quando houve, este foi do tipo REGULA, de forma semelhante ao encontrado na TO. O efeito nas células T de memória efectora, no grupo SAU (efeito INFLAMA, Razão REGULA/INFLAMA 0,2), foi semelhante ao encontrado na RC, e bem diferente da TO, que foi REGULA (Razão REGULA/INFLAMA 2).

A comparação dos valores de percentagem de células Tregs em proliferação, após o estímulo com os peptídeos do CMV, entre os diferentes grupos, não mostrou diferença estatística na análise conjunta (Kruskal-Wallis, $p=0,06$). No entanto, na comparação entre os grupos TO e EST e TO e RC observamos diferenças significativas com maiores percentagens de proliferação da subpopulação de células Treg nos grupos EST e RC, em relação ao grupo de TO (Mann-Whitney, $p=0,02$), no qual o efeito foi basicamente de inibir a proliferação de Treg (Figura 32).

Figura 32: Porcentagem de células CD4+ T reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). Pep CMV. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeos CMV ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,3$) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, TOxRC: $p=0,2$ e TOxEST: $p=0,2$).

A comparação das percentagens de células T efectoras CD4+ em proliferação, após o estímulo com os peptídeos do CMV, mostrou diferença significativa entre TO e RC, na análise conjunta de todos os grupos clínicos ($p=0,01$, Kruskal-Wallis). Na comparação dois a dois, observamos maiores percentagens de células T efectoras CD4+ em proliferação, frente aos peptídeos do CMV, na RC ($p=0,003$, Mann-Whitney), assim como no grupo EST ($p=0,03$, Mann-Whitney), em relação ao estado de TO (Figura 33). Lembramos que no grupo TO, os peptídeos do CMV provocaram unicamente inibição da proliferação das células T efectoras CD4+; efeito REGULA.

Figura 33: Porcentagem de células CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). Pep CMV. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeos CMV ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,01$) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, TOxRC: $p=0,003$ e TOxEST: $p=0,03$).

No entanto, para a subpopulação de células T CD4 de memória efetora, não encontramos diferenças significativas nas percentagens de células em proliferação com o estímulo dos peptídeos CMV, entre os diferentes grupos clínicos, analisados em conjunto ($p=0,4$, Kruskal-Wallis) ou, na comparação dois a dois ($p=ns$, Mann-Whitney) (Figura 34). É interessante destacar que mesmo que os efeitos dos peptídeos do CMV na proliferação das células T de memória efetora, tenham sido qualitativamente opostos, na TO (efeito REGULA: inibição da proliferação) e RC (efeito INFLAMA: indução/aumento da proliferação), as percentagens de células em proliferação, após o estímulo com os peptídeos, não foram significativamente diferentes, nos dois grupos.

Figura 34: Porcentagem de células CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Pep CMV. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeos CMV ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=6); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=7). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,4$) ou comparação dois a dois (Mann Whitney, $p=ns$).

Em resumo, a resposta celular proliferativa dirigida a peptídeos do microrganismo patogênico CMV mostrou um perfil global diferencial entre TO (mais efeito REGULA) e RC (mais efeito INFLAMA). No entanto, o grupo TO não foi, em geral, significativamente diferente em relação ao estado fisiológico de SAU, mas sim para a subpopulação efetora. Destacamos os efeitos opostos em relação às subpopulações Treg (efeito INFLAMA na TO e REGULA nos grupos RC, SAU e EST), e efeitos opostos também nas subpopulações efetoras e de memória efetora (efeito REGULA na TO e INFLAMA nos grupos RC) e nos grupos, SAU e EST, efeito REGULA para as efetoras e INFLAMA para as de memória efetora.

4.2.4 Autorreatividade: resposta proliferativa de diferentes subpopulações de linfócitos T (REGULA e INFLAMA), dirigida a peptídeos da Hsp60, nos diferentes grupos clínicos

Analizamos a autorreatividade dirigida a três peptídeos da proteína de choque térmico 60 (Hsp60), previamente estudados por nosso grupo, que apresentam atividade, predominantemente, REGULA (peptídeos N6 e N7) ou INFLAMA (peptídeo C9), em subpopulações do linfócito T CD4⁺ com atividades REGULA (Treg) ou INFLAMA (T efetora CD4⁺ e T de memória efetora).

Peptídeos Hsp60 REGULA: N6 e N7

Analizamos, inicialmente, a proliferação frente aos peptídeos, predominantemente, REGULA (N6 e N7), na subpopulação de células Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺).

Pep N6-REGULA

Na presença do peptídeo N6, observamos, principalmente, inibição da proliferação espontânea de Treg (efeito INFLAMA), em todos os grupos de transplantados (Razão REGULA/INFLAMA para as Treg: TO: 0,25; RC: 0,2; EST: 0,4), exceto para o grupo de SAU, no qual ocorreu mais indução/aumento da proliferação (Efeito REGULA; Razão REGULA/INFLAMA para as Treg: 3). (Tabela 17). Não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação às frequências de efeitos do tipo REGULA ou INFLAMA, assim como a ausência de efeitos, na resposta proliferativa de Treg pelo peptídeo N6, tanto na comparação entre TO e RC, como TO e SAU (p=ns, Qui-quadrado ou Fisher).

Tabela 17: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N6 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-22,50	-11,50	-53,90	REGULA: 46,7%
	Ltx10	10,70	1,70	1,90	INFLAMA: 46,7%
	Ltx16	-19,20	-4,43	14,00	Sem Efeito: 6,7%
	Ltx62	-12,70	-6,17	-1,40	RAZÃO
	Ltx91	-11,50	-0,38	-1,52	REG/INF: 1
Mediana		-12,70	-4,43	-1,40	
%Efeito REGULA:		20%	60%	60%	
%Efeito INFLAMA:		80%	20%	40%	
Razão REG/INF:		0.25	3	1.5	
RC	Ltx04	-12,80	-6,84	-1,55	REGULA: 33,3%
	Ltx05	-4,70	0,48	-19,40	INFLAMA: 25%
	Ltx13	-9,48	-2,74	-0,20	Sem Efeito: 41,7%
	Ltx24	-3,30	5,72	-2,26	RAZÃO
	Ltx26	3,77	0,51	0,21	REG/INF: 1,3
	Ltx79	0,76	0,00	-0,11	
	Ltx80	-6,69	0,00	0,01	
	Ltx87	0,67	-1,05	-1,08	
Mediana		-4,00	0,00	-0,64	
%Efeito REGULA:		12.5%	37.5%	50%	
%Efeito INFLAMA:		62.5%	12,5%	0,0%	
Razão REG/INF:		0.2	3	R	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno N6. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno N6. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo N6: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados de cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns.

Tabela 17 (Continuação): Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N6 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	-2,70	-5,63	17,30	REGULA: 29,2%
	Ltx12	-32,40	-7,40	2,06	INFLAMA: 33,3%
	Ltx14	-7,42	-8,60	2,89	Sem Efeito: 37,5%
	Ltx19	-0,66	0,00	0,00	RAZÃO
	Ltx22	-25,00	-0,64	0,10	REG/INF: 0,9
	Ltx31	-2,30	0,06	0,92	
	Ltx33	10,65	-1,28	-2,11	
	Ltx71	13,77	0,02	0,00	
Mediana		-2,50	-0,96	0,51	
%Efeito REGULA:		25%	50%	12,5%	
%Efeito INFLAMA:		62,5%	0,0%	50%	
Razão REG/INF:		0.4	R	0.25	
SAU	Ltx18	-0,07	0,12	-33,80	REGULA: 46,7%
	Ltx36	-7,90	-6,20	-10,80	INFLAMA: 26,7%
	Ltx41	8,52	-0,27	-1,59	Sem Efeito: 26,7%
	Ltx44	8,40	14,30	1,00	RAZÃO
	Ltx84	3,10	-0,17	9,30	REG/INF: 1,7
Mediana		3,10	-0,17	-1,59	
%Efeito REGULA:		60%	20%	60%	
%Efeito INFLAMA:		20%	20%	40%	
Razão REG/INF:		3	1	1.5	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno N6. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno N6. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo N6: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns.

Também, não encontramos diferenças significativas entre as percentagens de células Treg em proliferação, após o estímulo com o peptídeo N6, na comparação entre todos os grupos clínicos, em conjunto ($p=0,3$ Kruskal-Wallis), ou na comparação dois a dois ($p=ns$, Mann-Whitney) (Figura 35).

Figura 35: Porcentagem de células CD4+ T reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). Pep N6. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença do peptídeo N6 ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,3$) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, $p=ns$).

Em relação à subpopulação de células T efetoras ($CD4^+CD28^+CD127^+CD45RA^-CD27^-$), o efeito do peptídeo N6 foi, mais uma vez, principalmente, (Tabela 17) de inibição da proliferação espontânea, porém como esta subpopulação tem perfil funcional pró-inflamatório, consideramos este efeito do peptídeo N6 do tipo REGULA (Razão REGULA/INFLAMA para as T efetoras: TO: 3; RC: 3; EST: unicamente efeito REGULA) e, para o grupo SAU, houve apenas 2 casos com efeito, um REGULA e outro INFLAMA. (Figura 36)

Figura 36: Porcentagem de células CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). Pep N6. a) em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo N6 ou b) em proliferação espontânea (sem estímulo antigênico). A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,4$) ou comparação dois a dois (Mann Whitney, $p=ns$).

Para a subpopulação de células T de memória efetora, o efeito do peptídeo N6 foi, predominantemente, de inibição de proliferação (Efeito REGULA) (Razão REGULA/INFLAMA para as T de memória efetora: TO: 1,5; RC: unicamente efeito REGULA; SAU: 1,5), exceto no grupo EST que teve mais efeito INFLAMA (Razão REGULA/INFLAMA para as T de memória efetora: EST: 0,25) (Tabela 17). De forma semelhante às Treg, não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de casos de efeitos REGULA ou INFLAMA para essas duas subpopulações pró-inflamatórias, na comparação entre TO e RC ($p=0,06$, Qui-quadrado) ou TO e SAU ($p=0,2$, Qui-quadrado). Tampouco, encontramos diferenças significativas na comparação entre as percentagens de células T efetoras ou T

de memória efetora em proliferação, após o estímulo com o peptídeo N6, analisando-se os grupos, em conjunto (T efetoras: $p=0,4$ e T de memória efetora: $p=0,3$; Kruskal-Wallis), ou na comparação dois a dois ($p=ns$, Mann-Whitney), envolvendo o grupo TO (Figura 37). Encontramos, apenas, maiores percentagens de células T de memória efetora, em proliferação, após o estímulo com o peptídeo N6, no grupo EST em relação ao grupo RC ($p=0,02$ Mann-Whitney) (Figura 37), lembrando que o efeito na RC foi unicamente REGULA (inibição de proliferação) e no EST, o efeito foi mais INFLAMA (indução/aumento de proliferação, Razão REGULA/INFLAMA: 0,25).

Figura 37: Porcentagem de células CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Pep N6. a) Com estímulo: em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo N6 ou b) Sem estímulo antigênico: em proliferação espontânea. A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação da subpopulação CD4+ T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise boolean, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,3$) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, RCxEST: $p=0,03$).

Pep N7-REGULA

Frente ao estímulo com o peptídeo N7, observamos, mais uma vez, efeitos tanto de indução quanto de inibição de proliferação das diferentes subpopulações de células T CD4+ imunorreguladoras e pró-inflamatórias.

Porém, em contraste com o peptídeo N6, encontramos alguns perfis diferenciais, em relação à resposta proliferativa, na comparação com o grupo TO. Destacamos, a menor frequência de algum tipo de efeito no grupo RC (sem efeito em 45,8% das análises dentro do grupo) em relação aos demais grupos (sem efeito em TO: 6,7%; EST: 33,3%; SAU: 26,7 das análises dentro do grupo), e a alta frequência de efeito na TO (Tabela 18).

Tabela 18: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N7 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-28,10	-15,90	-30,20	REGULA: 53,3%
	Ltx10	4,20	3,90	11,80	INFLAMA: 40%
	Ltx16	-19,20	-4,46	-12,40	Sem Efeito: 6,7%
	Ltx62	-5,30	-7,80	-9,10	RAZÃO
	Ltx91	-7,60	-0,72	-1,36	REG/INF: 1,3
	Mediana	-7,60	-4,46	-9,10	
	%Efeito REGULA:	20%	60%	80%	
	%Efeito INFLAMA:	80%	20%	20%	
	Razão REG/INF:	0.25	3	4	
RC	Ltx04	-10,80	-2,25	-0,67	REGULA: 29,2%
	Ltx05	-4,20	-0,14	-18,40	INFLAMA: 25%
	Ltx13	-4,73	-2,24	-4,50	Sem Efeito: 45,8%
	Ltx24	-16,56	-1,64	-0,11	RAZÃO
	Ltx26	0,58	0,38	0,19	REG/INF: 1,2
	Ltx79	0,28	0,05	-0,23	
	Ltx80	-4,62	0,00	0,07	
	Ltx87	-1,57	-1,32	-2,37	
	Mediana	-4,41	-0,73	-0,45	
	%Efeito REGULA:	0,0%	50%	37,5%	
	%Efeito INFLAMA:	75%	0,0%	0,0%	
	Razão REG/INF:	I	R	R	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno N7. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno N7. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo N7: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Populações Regula e Efetoras: TOxRC, $p=0,01$, Qui-quadrado.

Tabela 18 (Continuação): Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo N7 da HSP60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	-10,50	-5,77	33,10	REGULA:29,2%
	Ltx12	-28,60	-18,38	3,56	INFLAMA: 37,5%
	Ltx14	-5,75	-8,46	-2,83	Sem Efeito:33,3%
	Ltx19	6,89	0,00	0,13	RAZÃO
	Ltx22	-4,70	3,22	0,10	REG/INF: 0,8
	Ltx31	-7,88	-0,08	-0,08	
	Ltx33	-1,22	-0,68	-2,28	
	Ltx71	3,09	0,47	0,00	
<i>Mediana</i>		-5,23	-0,38	0,05	
%Efeito REGULA:		25%	37,5%	25%	
%Efeito INFLAMA:		75%	12,5%	25%	
Razão REG/INF:		0,3	3	1	
SAU	Ltx18	0,74	-0,11	-41,80	REGULA: 40%
	Ltx36	-8,60	-15,50	-5,90	INFLAMA: 26,7%
	Ltx41	-4,08	-0,28	-0,59	Sem Efeito:26,7%
	Ltx44	36,70	5,17	0,90	RAZÃO
	Ltx84	1,90	19,65	-8,81	REG/INF: 1,5
<i>Mediana</i>		0,74	-0,11	-5,90	
%Efeito REGULA:		40%	20%	60%	
%Efeito INFLAMA:		40%	40%	0,0%	
Razão REG/INF:		1	0,5	R	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno N7. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno N7. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo N7: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns.

Destacamos também, que, globalmente, considerando todas as três subpopulações, os efeitos do peptídeo N7 foram do tipo REGULA para TO e SAU (Razão REGULA/INFLAMA: TO: 1,3 e SAU: 1,5) e mais equilibrado para RC e EST (Razão REGULA/INFLAMA: RC: 1,2; EST: 0,8).

A comparação entre o número de casos dos efeitos REGULA ou INFLAMA, assim como considerando a frequência de ausência de efeito, mostrou um perfil significativamente diferente entre TO e RC, considerando todas as três subpopulações ($p=0,04$; Qui-quadrado) (Figura 38). Essa diferença se deu principalmente pela baixa frequência de efeito na RC, uma vez que qualitativamente, os efeitos foram semelhantes nas três subpopulações, tanto na TO como na RC (efeito REGULA nas populações de T efetora e de memória efetora e INFLAMA nas Tregs). Em contraste, o perfil do número de casos dos efeitos REGULA ou INFLAMA não foi estatisticamente diferente entre TO e o grupo SAU ($p=0,1$; Qui-quadrado), indicando resposta proliferativa ao peptídeo N7 semelhante, na TO e no estado fisiológico.

Figura 38: Peptídeo auto N7. Populações Reguladora e Efetora – TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM EFEITO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo CMV, nas populações Reguladoras e Efetoras para os grupos TOxRC ($p=0,04$, Qui-quadrado).

No que diz respeito às percentagens de células em proliferação, em resposta ao peptídeo N7, não encontramos diferenças significativas, quando

todos os grupos foram analisados em conjunto, seja para as células Treg ($p=0,3$, Kruskal-Wallis) (Figura 39a), para as T efedoras (Kruskal-Wallis, $p=0,6$) (Figura 39b), ou para as T de memória efetora (Kruskal-Wallis, $p=0,2$) (Figura 39c). Na comparação dos diferentes grupos clínicos, dois a dois, encontramos apenas uma diferença significativa entre os grupos EST e SAU, em relação às percentagens de células T de memória efetora em proliferação, após o estímulo com o peptídeo N7. Encontramos maiores valores no grupo EST, que teve tanto indução quanto inibição de proliferação (Razão REGULA/INFLAMA: 1 para esta subpopulação), em contraste com o grupo SAU que só teve efeito REGULA de inibição de proliferação ($p=0,04$, Mann-Whitney) (Figura 39 c).

Figura 39: Porcentagem de células CD4+ de diferentes subpopulações em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo N7. a) T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+), b) T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e c) T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das subpopulações CD4+: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+), T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise booleana, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=8); SAU: saudável (n=5). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=ns$ para nenhuma subpopulação) ou comparação dois a dois (Mann-Whitney, p estatístico apenas p/ M. Efetora: RCxEST: $p=0,04$).

Pep C9-INFLAMA

A resposta proliferativa ao peptídeo C9, mostrou alguns perfis diferenciais em relação às diferentes subpopulações celulares e o grupo de TO. Mais uma vez, chama a atenção as menores frequências de algum efeito na proliferação no grupo de RC (sem efeito em 33,3% das análises dentro do grupo) e também no EST (sem efeito em 42,9% das análises dentro do grupo), em contraste com TO (não houve condição sem efeito do peptídeo C9) e SAU (sem efeito em 20% das análises dentro do grupo) (Tabela 19).

Tabela 19: Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo C9 da Hsp60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
TO	Ltx03	-8,00	7,50	-41,80	REGULA: 53,3% INFLAMA: 46,7% Sem Efeito: 0,0% RAZÃO REG/INF: 1,1
	Ltx10	14,60	-3,90	-7,70	
	Ltx16	-9,20	-1,63	-12,27	
	Ltx62	-22,60	-4,35	15,90	
	Ltx91	12,70	3,79	7,67	
Mediana		-8,00	-1,63	-7,70	
%Efeito REGULA:		40%	60%	60%	
%Efeito INFLAMA:		60%	40%	40%	
Razão REG/INF:		0,7	1,5	1,5	
RC	Ltx04	-4,60	-5,80	-0,89	REGULA: 24% INFLAMA: 29,2% Sem Efeito: 33,3% RAZÃO REG/INF: 0,8
	Ltx05	3,50	0,99	-17,30	
	Ltx13	-2,10	0,02	-5,82	
	Ltx24	0,30	10,96	3,39	
	Ltx26	0,95	1,45	0,54	
	Ltx79	1,25	0,33	0,89	
	Ltx80	-4,13	0,00	0,63	
	Ltx87	-1,56	-1,43	-0,76	
Mediana		-0,63	0,18	-0,11	
%Efeito REGULA:		25%	25%	25%	
%Efeito INFLAMA:		50%	25%	12,5%	
Razão REG/INF:		0,5	1	2	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno C9. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno C9. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo C9: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=7); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns

Tabela 19 (Continuação): Porcentagem de proliferação de células CD4 com diferentes fenótipos frente ao estímulo com o peptídeo C9 da Hsp60 nos diferentes grupos clínicos de estudo

Grupo Clínico	Sujeito de Pesquisa	REGULADORA	EFETORA	M. EFETORA	% REGULA/INFLAMA NO GRUPO
EST	Ltx11	13,80	6,56	37,80	REGULA: 33,3%
	Ltx12	-26,50	-2,30	0,78	INFLAMA: 23,8%
	Ltx14	1,17	-8,09	2,86	Sem Efeito: 42,9%
	Ltx19	20,59	0,11	0,10	RAZÃO
	Ltx31	0,20	-0,01	-0,08	REG/INF: 1,4
	Ltx33	1,53	-1,28	2,01	
	Ltx71	-0,19	0,00	0,03	
Mediana		1,17	-0,01	0,78	
%Efeito REGULA:		57,1%	43%	0,0%	
%Efeito INFLAMA:		14,3%	14,3%	42,9%	
Razão REG/INF:		4	3	1	
SAU	Ltx18	0,25	0,02	-43,50	REGULA: 33,3%
	Ltx36	-18,40	-7,30	-16,90	INFLAMA: 46,7%
	Ltx41	-0,07	2,76	-2,89	Sem Efeito: 20%
	Ltx44	-2,30	11,80	1,60	RAZÃO
	Ltx84	-10,70	19,05	-4,91	REG/INF: 0,7
Mediana		-2,30	2,76	-4,91	
%Efeito REGULA:		0,0%	20%	80%	
%Efeito INFLAMA:		60%	60%	20%	
Razão REG/INF:		1	0,3	4	

Porcentagem de células CD4+ de diferentes fenótipos, em proliferação, após o estímulo com o antígeno C9. A proliferação de diferentes subpopulações de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMC previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias, com o antígeno C9. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das diferentes subpopulações CD4+: REGULA: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+); INFLAMA: Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e Memória efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). Foram considerados os seguintes efeitos do peptídeo C9: a) induzir proliferação: quando não havia proliferação espontânea e o peptídeo levou à proliferação $\geq 1\%$; b) aumento da proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou ao aumento de proliferação $\geq 1\%$ da subpopulação analisada; c) inibir a proliferação: havia proliferação espontânea e o peptídeo levou a uma inibição da proliferação, total, ou parcial (de pelo menos 1%) da subpopulação analisada; d) sem efeito: não houve modificação da proliferação, em relação à condição sem estímulo. Classificação dos efeitos do antígeno sobre cada subpopulação: efeito REGULA: indução de proliferação ou aumento da subpopulação com perfil predominantemente REGULA ou inibição da subpopulação com perfil predominantemente INFLAMA; efeito INFLAMA: aumento ou indução de proliferação de subpopulações com perfil predominantemente INFLAMA ou inibição da proliferação de subpopulação com perfil predominantemente REGULA. Os valores sombreados na cor azul indicam que o efeito do antígeno foi do tipo REGULA. Aqueles sombreados de cor vermelha indicam que o efeito do antígeno foi do tipo INFLAMA. Sem sombreamento de cor indica não houve efeito. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=7); SAU: saudável (n=5). Foram considerados como razão predominantemente REGULA, os valores de razão REGULA/INFLAMA: $\geq 1,3$ e INFLAMA: $\leq 0,7$. R: Regula. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito regula. I: Inflama. Quando não é possível calcular a razão REG/INF por subpopulação, pois só ocorreu efeito inflama. Qui-quadrado: p=ns

Os efeitos do peptídeo C9, considerando-se todas as três subpopulações, foram mais equilibrados para TO e RC (Razão REGULA/INFLAMA: TO: 1,1; RC: 0,8), REGULA para o grupo EST (Razão REGULA/INFLAMA: EST: 1,4) e INFLAMA no SAU (Razão REGULA/INFLAMA: SAU: 0,7) (Tabela 19). Não obstante, a comparação entre os números de casos dos efeitos REGULA ou INFLAMA, assim como a ausência de efeito, mostrou perfis significativamente diferentes, para o efeito do peptídeo C9, entre TO e RC, seja considerando as três subpopulações ($p=0,03$; Qui-quadrado), ou apenas as populações pró-inflamatórias ($p=0,01$; Qui-quadrado) (Figura 40). Essas diferenças, podem ser decorrentes da baixa frequência de efeito na RC, assim como mais efeito REGULA na TO.

Figura 40: Peptídeo alo C9. Populações Efetoras – TO, RC, SAU. Perfil de número de casos de efeito REGULA (azul), INFLAMA (vermelho) ou SEM EFEITO (cinza) pelo estímulo com o peptídeo CMV, na comparação entre os grupos TOxRC nas populações efetoras ($p=0,01$, Qui-quadrado).

As diferenças entre TO e SAU não foram estatisticamente significativas ($p=0,2$; Qui-quadrado), mesmo que o efeito do peptídeo C9 na subpopulação T efetora, tenha sido INFLAMA, apenas no grupo SAU (razão REGULA/INFLAMA para T efetora no SAU: 0,3).

A comparação das percentagens de células em proliferação, em resposta ao peptídeo C9, não mostrou diferenças significativas, quando todos os grupos foram analisados em conjunto, seja para as células Treg ($p=0,4$, Kruskal-Wallis) (Figura 41a), para as T efetoras (Kruskal-Wallis, $p=0,5$) (Figura 41b), ou para as T de memória efetora (Kruskal-Wallis, $p=0,2$) (Figura 41c). Na comparação dos diferentes grupos clínicos, dois a dois, encontramos, de forma semelhante ao peptídeo N7, apenas uma diferença significativa entre os grupos EST e SAU, em relação às percentagens de células T de memória efetora em proliferação, após o estímulo com o peptídeo C9. Encontramos maiores valores no grupo EST, que teve unicamente indução de proliferação, em contraste com o grupo SAU que teve dominante efeito REGULA (Razão REGULA/INFLAMA: 4 para esta subpopulação), ou seja, de inibição de proliferação ($p=0,03$, Mann-Whitney) (Figura 41c).

Figura 41: Porcentagem de células CD4+ de diferentes subpopulações em proliferação, ou que sofreram inibição de proliferação espontânea na presença de peptídeo C9: a) T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+), b) T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e c) T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A proliferação da subpopulação de células CD4+ foi avaliada por citometria de fluxo, em PBMCs previamente marcadas com CFSE, mantidas em cultura por 7 dias com e sem estímulo antigênico. Diferentes anticorpos monoclonais foram utilizados para definir a proliferação das subpopulações CD4+: T Reguladora (CD25+CD127-Foxp3+), T Efetora (CD28+CD27-CD45RA-CD127+) e T Memória Efetora (CD27-CCR7-CD45RA-). A estratégia de análise compreendeu a análise dentro da região de linfócitos, selecionadas as células vivas e as CD4+ e, em seguida a análise booleana, para a combinação dos diferentes moléculas de cada subpopulação. TO: tolerante operacional (n=5); RC: rejeição crônica (n=8); EST: estável (n=7); SAU: saudável (n=5). Comparação entre os diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $p=ns$ para nenhuma subpopulação) ou comparação dois a dois (Mann Whitney, p estatístico apenas p/ M. Efetora: ESTxSAU: $p=0,03$).

5. Discussão

Os dados deste trabalho corroboram a nossa hipótese de que, na tolerância operacional (TO), a resposta celular antígeno-específica é modulada, de forma diferencial, em relação a aloantígenos do doador e antígenos de patógenos. Na TO, há um perfil, predominantemente, imunorregulador na resposta alogeneica dirigida a antígenos HLA-DR do doador e, na resposta a antígenos do patógeno, apesar de ocorrer certo desvio REGULA, o seu perfil funcional global na produção de citocinas permanece pró-inflamatório, não se diferenciando, significativamente, da condição fisiológica. Interpretamos que os mecanismos imunorreguladores ativados na tolerância operacional, levam a um desvio REGULA da resposta imune celular, especificamente, dirigida a antígenos envolvidos no transplante, não afetando de forma significativa a resposta celular a antígenos de microrganismos patogênicos, uma vez que a resposta dirigida a peptídeos do CMV, foi preservada com perfil pró-inflamatório.

Destacamos que as respostas dirigidas a aloantígenos do doador apresentaram perfis funcionais contrastantes entre o estado de tolerância operacional (perfil REGULA) e o de rejeição crônica, que apresentou um perfil bem pró-inflamatório. Considerando que esses dois desfechos clínicos são funcionalmente opostos, interpretamos que o desvio da resposta a antígenos HLA-DR do doador, para um perfil imunorregulador, tenha um papel importante nos mecanismos atuantes na tolerância operacional.

O perfil imunorregulador da resposta celular dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, que diferenciou a tolerância operacional do estado de rejeição crônica, foi principalmente devido à inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-1B, IL-8, IL-17, IL-12, G-CSF, IFN- γ e MCP-1, assim como devido à inibição da proliferação de células CD4⁺ T efectoras e, principalmente, das células T de memória efectora. Como esses dois desfechos clínicos são opostos – TO x RC -, interpretamos que o controle da produção dessas citocinas pró-inflamatórias, assim como da proliferação de células CD4⁺ T efectoras e das células T de memória efectora, seja importante para o desenvolvimento e/ou manutenção da TO, e que o desvio REGULA de via indireta de alorreconhecimento tem um papel neste controle, uma vez que foi esta via que avaliamos, com o uso de peptídeos da molécula HLA-DR do doador.

Não encontramos outros relatos na literatura sobre o papel de via indireta de alorreconhecimento na TO, no transplante renal. Porém, esses dados são concordantes com a, mais recente, reconhecida importância da alorreatividade de células T reguladoras no controle mais robusto da agressão do aloenxerto, em diversos modelos experimentais (Nishimura et al., 2004; Demirkiran et al., 2006; Sagoo et al., 2012; Tang et al., 2013).

Com base nesse conhecimento, estão sendo propostas estratégias de terapia celular com células T reguladoras alorreativas a antígenos do doador (Tang et al., 2013; Singer et al., 2014). Ademais, há diversos trabalhos que apontam que a via indireta de alorreconhecimento também pode ter atividade imunorreguladora (Spadafora-Ferreira et al., 2001; Jiang et al., 2004; Sánchez-Fueyo et al., 2007). Em estudos anteriores do nosso grupo, observamos que a

via indireta de alorreconhecimento dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, em pacientes estáveis, no transplante renal, induzia a produção de IL-10, às vezes, sem associação com produção de citocinas inflamatórias (Spadafora-Ferreira et al., 2001). Ademais, linhagens de linfócitos T células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) com alorreatividade pela via indireta, foram capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T, induzida tanto pela via direta, quanto pela indireta, indicando que a via indireta de alorreconhecimento também pode estar envolvida nos mecanismos reguladores relacionados à manutenção do enxerto (Spadafora-Ferreira et al., 2007).

Diversas das citocinas que, no presente trabalho, tiveram sua produção inibida, na resposta celular a peptídeos HLA-DR do doador, na TO, já foram descritas como atuantes em processos de agressão ao enxerto, reforçando a importância da sua inibição na proteção do enxerto. Por exemplo, há relatos na literatura de altos níveis de IL-17 na rejeição do transplante renal (Crispim et al., 2009; Li T., 2011; Loverre et al., 2011). As outras citocinas pró-inflamatórias que também tiveram sua produção parcialmente inibida, na resposta dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, na TO, em contraste com o ocorrido na RC, foram IL-1B, IL-8, IL-12, G-CSF, IFN- γ e MCP-1,

É importante mencionar que, no nosso trabalho, a avaliação da resposta celular foi basicamente dirigida para as subpopulações de linfócitos T CD4+, uma vez que o tamanho dos peptídeos utilizados favorece a sua apresentação em moléculas MHC de classe II e, conseqüentemente, para linfócitos CD4+. No entanto, também vale destacar que, na análise da produção de citocinas, não podemos especificar que tipos celulares são responsáveis pela produção das diferentes citocinas, uma vez que elas foram quantificadas nos sobrenadantes

de cultura das PBMC estimuladas com os antígenos. Apesar de não termos este dado específico, consideramos relevante a informação de que, globalmente, a resposta dos peptídeos HLA-DR do doador na produção de citocinas, por PBMC, é predominantemente REGULA na TO, e predominantemente INFLAMA na RC.

Também é interessante apontar que, para as citocinas com perfil predominantemente REGULA, a resposta celular a peptídeos HLA-DR do doador, levou a um aumento da sua produção, mais frequentemente na RC do que na TO, principalmente para as citocinas IL-4, IL-7, IL-10 e IL-13. Ademais, para as citocinas IL-4 e IL-10, os níveis de produção na resposta dos peptídeos HLA-DR do doador, foram significativamente maiores na RC do que na TO, que teve basicamente inibição da sua produção. É possível que esses mecanismos tenham sido desencadeados em resposta ao intenso contexto inflamatório da RC. Não obstante, considerando o conjunto das citocinas estudadas, o perfil da resposta celular alogeneica a peptídeos HLA-DR do doador foi predominantemente REGULA na TO e INFLAMA na RC. Vale a pena destacar que a resposta celular aos peptídeos HLA-DR do doador, afeta a produção de múltiplas citocinas, tanto as com atividade REGULA quanto aquelas com atividade INFLAMA, indicando a complexidade de ações mediadas pela resposta alogeneica, mesmo a um único peptídeo HLA-DR do doador.

O fato de termos escolhido a molécula HLA-DR para testar a nossa hipótese é interessante, uma vez que a maior disparidade em relação a esta molécula tem sido consistentemente associada ao desenvolvimento de RC (Terasaki, 2005), em diversas coortes internacionais. Não sabemos se este

desvio REGULA também ocorre em relação a peptídeos derivados da molécula HLA classe I e não encontramos dados na literatura.

Na análise da resposta celular proliferativa das diferentes subpopulações de linfócitos CD4+, sob o efeito dos peptídeos HLA-DR, não observamos diferenças estatisticamente significativas em relação ao perfil global de respostas com o perfil REGULA ou INFLAMA, seja na comparação entre TO e RC, ou mesmo TO e SAU. Não obstante, a razão REGULA/INFLAMA para a frequência dos tipos de resposta foi maior nos grupos TO (Razão=2) e EST (Razão=2), do que nos grupos de RC (Razão=0,8) e SAU (Razão=0,6), sugerindo, mais uma vez, a ocorrência de um desvio REGULA na resposta alogeneica a peptídeos HLA-DR do doador.

O efeito REGULA na resposta proliferativa, na TO, se deu principalmente pela maior frequência de inibição das células T CD4+ efectoras e, principalmente, de memória efetora, diferentemente do observado nos grupos de RC ou SAU. Considerando que as células de memória, desempenham um papel importante na rejeição (Espinosa et al., 2016) inclusive por serem mais resistentes aos efeitos de drogas imunossupressoras (Krummer & Ford, 2012), podemos interpretar que a inibição da proliferação das células T de memória pode ser um relevante mecanismo em curso, induzido pela alorreatividade indireta a peptídeos HLA-DR do doador, na TO. Vale destacar que as células T de memória também têm importância na proteção contra infecções e, apesar de apresentarem reconhecimento antigênico específico aos patógenos (Lin et al., 2015; Chen et al., 2015), podem apresentar reatividade cruzada com as moléculas alogeneicas MHC (D'Orsogna et al., 2012; Degauque et al., 2016), como relatado para antígenos virais vacinais (Esser et al., 2003; D'Orsogna et

al., 2011). Assim, há sobreposição entre as respostas imunes celulares alogeneicas e a patógenos, apontando a complexa interligação de respostas imunes dirigidas a diferentes antígenos, na imunobiologia do alotransplante.

Uma questão imunologicamente interessante e com importância na clínica é se o impacto a resposta imune induzida a patógenos poderia ter impacto negativo na evolução do enxerto, e mesmo prejudicar o desenvolvimento de tolerância. Dados recentes no contexto do transplante hepático, dentro de um ensaio clínico para retirada de drogas imunossupressoras, observaram-se 50% de sucesso para tolerância, e os casos de sucesso estavam associados à resposta antiviral de CD8+, com expressão de IFN do tipo I (Bohne et al., 2014). Esses dados trazem uma interessante discussão de que a resposta antiviral pode contribuir para a ativação de mecanismos imunorreguladores e indução de tolerância

É interessante destacar que, exceto pelo grupo EST, houve basicamente inibição da proliferação de células Tregs (efeito INFLAMA) na presença dos peptídeos HLA-DR, não havendo diferença entre TO e RC ou SAU. Também destacamos a alta taxa de proliferação espontânea da subpopulação de Treg em todos os grupos clínicos, inclusive no estado fisiológico. Esses dados são surpreendentes – tanto pelo efeito de inibição da proliferação quanto pela alta proliferação espontânea - uma vez que, as células Treg têm sido descritas por terem baixa taxa proliferativa (Dejaco et al., 2006). Vale apontar, porém, que as PBMC foram mantidas em cultura por 7 dias e isto, talvez, tenha contribuído para a observação deste fenômeno. Ademais, há relatos recentes, em modelos experimentais de alotransplante, nos quais células Treg antígeno-específicas de animais tolerante, apresentam grande atividade proliferativa e sua

sobrevivência é mediada por IL-5 e IFN- γ (Hall et al., 2013). Esses dados nos fazem pensar que outros mecanismos podem estar envolvidos na proliferação espontânea das Tregs, observada no nosso estudo, talvez em parte mediada por IL-5 e IFN- γ .

Incluimos o grupo EST em nosso estudo, cujos indivíduos fazem uso de doses habituais de imunossupressores 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 RC, uma vez que o EST é um grupo alvo para futuros ensaios clínicos visando identificar pacientes como potencial para desenvolver TO, buscando aqueles que têm o perfil de biomarcadores compartilhado com TO. Apesar do menor número de casos analisados, no grupo EST, houve um equilíbrio REGULA/IFLAMA frente aos estímulos antigênicos com os peptídeos HLA-DR alo do doador, em relação às citocinas, e um perfil mais REGULA em relação à resposta proliferativa.

A tolerância materno-fetal é a experiência de tolerância alogeneica, fisiológica, construída ao longo do processo evolutivo de espécies que se produzem por gravidez, e carrega o refinamento de mecanismos que sofreram pressão seletiva, ao longo da evolução. Assim, a investigação sobre a imunobiologia da tolerância no contexto do alotransplante, pode ser muito enriquecida pelo conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na tolerância materno-fetal.

De forma semelhante ao que ocorre no contexto do transplante, a gravidez envolve também uma fase predominantemente inflamatória, tanto no seu início quanto no período do parto. Os processos inflamatórios na gravidez, envolvem

o reconhecimento de aloantígenos paternos presentes no feto, e são fundamentais na implantação do óvulo fecundando, na ativação de mecanismos imunorreguladores e, conseqüentemente, na não rejeição do feto durante o seu desenvolvimento, e no sucesso do parto, desencadeando a expulsão do feto. O sucesso da gravidez e da manutenção do feto envolve múltiplos mecanismos imunorreguladores (Guleria e Sayegh, 2007; Robertson e Moldenhauer, 2014; La Rocca et al., 2014), que ocorrem no microambiente materno-fetal, mas também ativados, sistemicamente, na mãe. Além de importantes mecanismos imunorreguladores, como por exemplo aqueles mediados pela expressão da molécula HLA-G (Hyiid, T.V., 2006) e IDO (do inglês, “*idoleamine 2,3-dioxygenase*” ou indoleamina 2,3-dioxigenase), que têm atividade imunorreguladora - no microambiente materno-fetal, as células Tregs induzidas também têm um papel importante (La Rocca, et al., 2014). Além dos aloantígenos paternos presentes no feto, para os quais a resposta imune da mãe é imunorregulada durante a gravidez (Tafari et al., 1995), há diversos outros antígenos envolvidos na imunobiologia da tolerância materno-fetal, inclusive autoantígenos (Trowsdale e Betz, 2006).

Estabelecendo uma ligação com o nosso trabalho, destacamos que na gravidez, há relatos de diminuição da razão entre a citocina pró-inflamatória IFN- γ e as citocinas imunorreguladoras IL-10, e IL-13, na resposta alogeneica da mãe a células do cordão umbilical, em cultura linfocitária mista, principalmente pela maior diminuição de IFN- γ , em relação ao período pós-parto (Breckler et al., 2008). Em nosso estudo, também observamos uma diminuição significativa da produção de IFN- γ na resposta celular dirigida a

peptídeos HLA-DR do doador, na TO, tanto em relação aos níveis, quanto em relação à frequência de inibição.

Em conclusão, em relação à resposta celular alogeneica, o desvio REGULA da resposta celular a peptídeos da molécula HLA-DR do doador, na tolerância operacional, contrastou com o perfil INFLAMA na RC, sugerindo que a via indireta de alorreconhecimento pode ter um papel importante nos mecanismos imunorreguladores em curso, na TO. A análise conjunta de um painel de citocinas, assim como da resposta proliferativa de subpopulações com atividades reguladora e inflamatória, nos permitiu observar um impacto sobre múltiplas vias imunológicas, ativadas ou inibidas na alorreatividade indireta, indicando a complexidade de mecanismos em curso.

O núcleo central da nossa hipótese em relação à resposta celular antígeno-específica, reside na polaridade REGULA para a resposta a antígenos do doador, ao mesmo tempo em que seria preservado o perfil INFLAMA da resposta celular a antígenos de patógenos. Para testar esta hipótese, escolhemos o CMV como patógeno, cuja infecção é considerada a principal complicação infecciosa no transplante renal (Brennan D.C., 2001; Razonable e Humar, 2013). Em concordância com nossa hipótese, a resposta celular aos peptídeos do microrganismo patogênico, CMV, mostrou um perfil global de produção de citocinas, predominantemente INFLAMA, para todos os grupos de estudo. Ou seja, apesar do estado de tolerância ter induzido um certo desvio REGULA da resposta a antígenos do doador, a resposta a antígenos do patógeno não foi significativamente diferente, em relação ao estado fisiológico (grupo de indivíduos saudáveis), em relação ao perfil global de produção de citocinas. Houve, porém, uma diferença em relação à resposta

proliferativa das subpopulações efetora e de memória efetora; na TO houve principalmente inibição da proliferação das células memória efetora (efeito REGULA), enquanto no estado fisiológico, houve mais indução/aumento de proliferação (efeito INFLAMA). Apesar disto, a diferença significativa do perfil global de citocinas e da resposta proliferativa entre TO e RC indica a ocorrência de algum desvio REGULA na tolerância, e algum desvio INFLAMA na RC, mesmo que não tenha ocorrido diferença significativa com o grupo de SAU.

O desvio REGULA na resposta celular a antígenos do patógeno, na TO, em relação ao grupo RC, ocorreu principalmente pela inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-12, G-CSF e TNF, assim como pela inibição da proliferação das células T de memória efetora, como mencionamos acima. Não obstante, a preservação do perfil INFLAMA da resposta celular pró-inflamatória ao patógeno, na TO, se deu pela indução/aumento das citocinas inflamatórias IL-1B, IL-17, IFN- γ , MCP-1 e MIP-1B, assim como por algum grau de inibição de citocinas imunorreguladoras, além da inibição da proliferação de células Tregs. Apesar dos níveis de IFN- γ , na resposta a antígenos do CMV terem sido, significativamente, maiores na RC do que na TO, eles foram semelhantes entre TO e no estado fisiológico. Destacamos, assim, a importância da preservação da resposta a antígenos do CMV com produção indução/aumento de IFN- γ , na TO, uma vez que esta citocina tem sido enfatizada como crítica na capacidade de lidar com a infecção pelo CMV, no transplante renal (Costa et al., 2014). Esta interpretação está em concordância com outros dados da literatura que apontam altos níveis de IFN- γ durante a infecção por CMV (Tormo et al., 2010; Ritter et al., 2013). Assim, interpretamos que a resposta celular a antígenos do

CMV, mediada por essas citocinas inflamatórias, seja importante nos mecanismos envolvidos na preservação da imunocompetência na TO.

Chama a atenção que a resposta aos antígenos do CMV levou à indução/ aumento da produção de citocinas imunorreguladoras, principalmente, IL-10 e IL-13, nos grupos RC, EST e SAU, mas não no grupo TO. Apesar de não estar muito claro o papel das citocinas imunorreguladoras, na infecção pelo CMV, o seu aumento tem sido bem documentado na literatura, principalmente para a produção de IL-10, associado a um pior prognóstico, tendo sido inclusive, recentemente apontado que o seu alto nível plasmático pode estar associado ao desenvolvimento de doença-CMV (Limaye et al., 2016). Também há relatos de que durante a infecção ativa, em indivíduos transplantados, há um aumento sérico de níveis de TNF- α e IL-10 (Cervera et al., 2007). Vale destacar também que o CMV humano codifica um ortólogo da IL-10 humana que é capaz de se ligar ao receptor de IL-10 humano, induzindo sinalização efetiva (Jenkins et al., 2008), também induzindo a produção de IL-10 humana, por monócitos (Avdic et al., 2016), e modulando a atividade de células dendríticas para um perfil imunorregulador (Avdic et al., 2014). Esses mecanismos têm sido implicados na relação da infecção por CMV e o desenvolvimento e mesmo a agressividade de câncer (Bishop et al., 2015), devido ao seu importante efeito imunossupressor. É interessante notar que no grupo de TO, a resposta celular a peptídeos de CMV não induziu a produção de IL-10, como nos demais grupos.

Em nosso estudo, todos os transplantados têm sorologia positiva para CMV (IgG+), indicando, principalmente, infecção previamente ao transplante. Nos grupos EST e de RC, houve um paciente em cada grupo que desenvolveu

infecção por CMV após o transplante, mas não houve registro de reativação de infecção pelo CMV no grupo TO, após a inclusão em nosso estudo, portanto, na vigência de tolerância. Uma importante medida de imunocompetência é capacidade de o indivíduo lidar, de forma eficaz, com diferentes patógenos, assim como pela capacidade de eliminar células cancerosas. Em nosso estudo, não observamos desenvolvimento de neoplasias no grupo de TO, nem de infecções importantes, no período do estudo, em contraste com uma frequência de 63%, no grupo EST e de 100% na RC. Esses dados apoiam a interpretação de que, na TO, a imunocompetência é basicamente preservada, a despeito de ativos mecanismos imunorreguladores em curso que impem a rejeição do enxerto, e do desvio da resposta celular a aloantígenos do doador para um perfil REGULA.

Em trabalho recente, foi apontada a importância da citocina IL-12 na resposta proliferativa de linfócitos CD4⁺ em resposta a antígenos de CMV (Popescu et al., 2016). Em nosso estudo, apesar do perfil de resposta celular aos antígenos do CMV ter sido, predominantemente, INFLAMA na RC, EST e no grupo de SAU, na TO, tivemos tanto inibição quanto indução de produção de IL-12, um perfil mais equilibrado que, junto com a manutenção da produção de outras citocinas INFLAMA, provavelmente contribui para a preservação da imunocompetência.

O pequeno desvio REGULA detectado na resposta a peptídeos do CMV, na TO, ocorreu, principalmente, pela inibição das citocinas pró-inflamatórias G-CSF e TNF- α e inibição da proliferação de células TCD4 efetoras e de memória efetora. Considerando a preservação da imunocompetência dos TO, e a manutenção do perfil INFLAMA de resposta aos antígenos do CMV, pensamos

que o conjunto das demais citocinas inflamatórias e a inibição da proliferação das células Tregs (efeito contrário ao observado nos demais grupos), podem ser suficientes para manter a imunocompetência.

Vale ainda discutir que, em nosso trabalho, focamos na resposta celular de células CD4+, apesar da resposta de células CD8 ser muito importante nas infecções virais. Por exemplo, no transplante de órgãos, a resposta imune de células T CD8+ limita a viremia e protege contra a doença invasiva do órgão pelo CMV (Pourgheysari et al., 2007; Crough e Khanna, 2009). Apesar da indiscutível relevância das células TCD8+ na infecção por CMV, também tem sido relatada a importância de células TCD4+ no controle da infecção pelo CMV (Pourgheysari et al., 2007; Sester et al., 2005), assim como de outros tipos celulares como as células NK, células T $\gamma\delta$, e de anticorpos (Pourgheysari et al., 2007; Vasto et al., 2007). Portanto, a análise da resposta celular de linfócitos TCD4+ é relevante e tem despertado crescente interesse da comunidade científica, inclusive pelo potencial valor de monitorar o decréscimo de números de células TCD4+ CMV específicas, em relação à evolução para a doença por CMV (Sester et al., 2001; Widmann, 2008).

Para testar a questão conceitual no presente trabalho, escolhemos um tripé antigênico representativo dos universos do transplante (aloantígenos HLA-DR), dos patógenos (antígenos do CMV), e de autoantígenos envolvidos na homeostase (autoantígenos da Hsp60) – tripé Alo-Patógeno-Auto, para testar a resposta celular antígeno-específica, no estado de tolerância operacional.

Conforme argumentamos na fundamentação da nossa hipótese, o autoantígeno Hsp60 é, particularmente, interessante para o nosso estudo, uma vez que apresenta propriedades imunológicas tanto REGULA quanto

INFLAMA. Apesar de ser conhecido que a autoimunidade à Hsp60 também participa da imunobiologia do transplante (Granja et al., 2004; Caldas, 2006) e, em modelos experimentais, participa de mecanismos imunorreguladores, prolongando a sobrevivência de aloenxertos (Luna et al., 2007), e mesmo induzindo tolerância de (Pockley et al., 2001), ainda não há dados a respeito do seu potencial envolvimento na tolerância operacional. Escolhemos 3 peptídeos, previamente estudados por nosso grupo, cujos efeitos imunológicos foram predominantemente REGULA (peptídeos N6 e N7) ou INFLAMA (peptídeo C9).

Além de múltiplos efeitos sobre a produção de citocinas, observamos perfis distintos de resposta celular aos peptídeos da Hsp60, nos diferentes grupos de estudo, indicando serem antígenos efetivos em diversas vias imunológicas, atuando de forma diferencial nos diversos contextos clínicos. Destacamos o peptídeo N6 que, apesar de induzir um perfil global de produção de citocinas em relação a efeitos REGULA e INFLAMA, equilibrado na TO e na RC, e mais REGULA no estado fisiológico, mostrou um perfil diferencial significativo entre TO e RC, em relação à produção das citocinas INFLAMA e, principalmente em relação à produção das citocinas predominantemente REGULA.

Na TO, a resposta celular ao peptídeo N6 provocou um aumento/indução da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, sugerindo que este peptídeo possa ter uma contribuição nos mecanismos imunorreguladores em curso na TO, favorecendo a produção dessas citocinas com atividade imunorreguladora. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, a produção de IL-4 por PBMC de indivíduos transplantados renais, induzida pela Hsp60, foi associada com a ausência da rejeição, em período mais tardio do transplante,

sugerindo que a resposta celular à Hsp60 pode estar envolvida em atividade imunorreguladora no transplante renal humano (Granja et al., 2004).

Em contraste, na RC, a resposta ao peptídeo N6 levou à inibição destas citocinas. Por outro lado, a resposta ao peptídeo N6 levou a efeitos opostos, em relação às citocinas predominantemente INFLAMA, sendo mais frequente o aumento da produção de IL-12, IL-17 e TNF- α na TO, em contraste com, principalmente, o efeito de inibir a produção de citocinas INFLAMA, na RC. Não obstante, os níveis de citocinas, na resposta ao peptídeo N6, não foram significativamente diferentes nos diferentes grupos. Nesse sentido, vale discutir que, de modo geral, a comparação dos níveis de citocinas foi menos informativa em relação à discriminação entre TO e os diferentes grupos, do que o perfil funcional de respostas, culminando no aumento ou diminuição de citocinas que apresentam predominantemente funções REGULA ou INFLAMA.

A resposta proliferativa das diferentes subpopulações de células CD4+, Treg, efetoras e de memória efetora, ao peptídeo N6, mostrou perfil global equilibrado na TO, e mais REGULA em RC, principalmente pela inibição de células efetoras e de memória efetora.

Na resposta celular ao peptídeo N7, não encontramos um perfil global diferencial tanto para citocinas quanto para proliferação, entre TO e RC. No entanto, as diferenças significativas das respostas em relação à produção de citocinas predominantemente INFLAMA, entre o estado fisiológico no qual houve inibição, e os grupos de TO e RC, indicam a ocorrência de um desvio INFLAMA, no contexto do transplante renal, principalmente na RC. Este resultado com o peptídeo N7 foi surpreendente, uma vez que em trabalhos anteriores do nosso grupo, observamos repetidamente, atividade imunológica

dominantemente imunorreguladora, *in vitro*, com células humanas, PBMC (Martello, 2009) e células dendríticas (DC) (Socorro-Silva, 2007) e no sistema murino, com DC (Volsi, 2008) ou células do baço (Guembes, 2010), e mesmo no contexto do transplante experimental, induzindo aumento de sobrevivência do enxerto de pele (Luna et al., 2007).

Não obstante, o perfil de resposta celular dominantemente REGULA no estado fisiológico (SAU), tanto em relação à produção de citocinas quanto proliferação, nos leva a pensar que este peptídeo possa exercer atividade na manutenção da homeostase no estado fisiológico. Ainda não sabemos, se os nossos peptídeos são gerados *in vivo*, fisiologicamente, mas é conhecido que a Hsp60 é encontrada na forma solúvel no sangue (Xiao et al., 2005), e que peptídeos derivados de diversas proteínas de choque térmico, inclusive da Hsp60, estão presentes na fenda de moléculas MHC (Srivastava, 2002; Coelho et al., 2008), no estado fisiológico. Assim, parece-nos pertinente a ideia de que alguns dos nossos peptídeos possam estar sendo gerados endogenamente, exercendo papel no controle da inflamação, ora amplificando a resposta inflamatória, ora controlando-a, exercendo suas atividades funcionais REGULA e INFLAMA, como bem discutido na literatura, inclusive por nosso grupo (Coelho e Faria, 2012). Esta visão tem como base a teoria do homúnculo imunológico (Cohen e Young, 1991), na qual postula-se que as HSP integram um grupo de autoantígenos dominantes na interação com o sistema imune, envolvidos na manutenção da homeostase.

Para o peptídeo C9, considerado, por nosso grupo, como o peptídeo com atividade mais INFLAMA, o perfil global da produção de citocinas foi dominantemente INFLAMA, em todos os grupos, menos no EST, em

concordância com nossos dados anteriores, mostrando este perfil funcional dominante. Não obstante, observamos diferenças significativas do perfil da resposta em relação às citocinas pró-inflamatórias, que foi mais INFLAMA na RC do que na TO e no estado fisiológico, destacando-se a diferença de mais inibição da produção de MCP-1, na TO, sugerindo que o peptídeo C9 possa contribuir na amplificação da inflamação, e agressão ao enxerto, em curso no grupo de RC. Em relação à resposta proliferativa, o peptídeo C9 também induziu respostas mais INFLAMA no estado fisiológico e, mais uma vez, encontramos diferença entre RC e TO, porém essa diferença foi principalmente decorrente da baixa resposta na RC do que de um perfil funcionalmente distinto.

O efeito imunorregulador da Hsp60 e seus peptídeos tem sido mostrado em diferentes contextos, como em modelos de aterosclerose (Maron *et al.*, 2002), em diabetes autoimune (Cohen e Young, 1991; Birk *et al.*, 1996), e no transplante de pele (Pockley, 2005; Luna *et al.*, 2007). Em outros trabalhos do nosso grupo, observou-se que diversos peptídeos da Hsp60, desenhados por nosso grupo, induzem um predomínio de modificações de expressão gênica com perfil imunorregulador, entre os quais os peptídeos N2, N6 e N7 que foram capazes de inibir a proliferação alogeneica com PBMCs humanas (Martello, 2009). Alguns desses trabalhos ainda não foram publicados devido à perspectiva de solicitação de patentes, ainda em processo.

No contexto do transplante renal humano, nosso grupo também mostrou um predomínio de produção de IL-10 na resposta celular à Hsp60, no período tardio do transplante, livre de rejeição, além de linhagens de linfócitos T infiltrantes do enxerto, também autorreativas à Hsp60, com produção

principalmente de IL-10, mas também IFN- γ (Caldas et al., 2006). Esses dados indicam que linfócitos T reativos à Hsp60 e a seus peptídeos estão no microambiente do enxerto e podem contribuir para o controle ou amplificação da inflamação, também no enxerto. Vale destacar que em situações de estresse, há aumento da expressão de diferentes Hsp, inclusive da Hsp60 (Welch, 1992; Kiang e Tsokos, 1998). No contexto do transplante, o aumento da Hsp60 no tecido renal transplantado pode induzir a autorreatividade à Hsp de linfócitos T infiltrantes, que podem participar da rejeição do transplante, como discutido na literatura (Pockley et al., 2005), mas pode também contribuir para o controle da inflamação e agressão ao enxerto.

Tem sido bem documentado na literatura que a Hsp60 pode se ligar a diferentes receptores, como os receptores do tipo *Toll* (Cohen-Sfady et al., 2005), membros da família dos receptores *scavenger*, como o LOX-1 e SREC-1, e o receptor de lipoproteína de baixa densidade, CD91 (Thériault et al., 2006), além de seus peptídeos poderem ser apresentados em moléculas MHC (Quintana et al., 2008). Apesar de os ligantes de nossos peptídeos ainda não terem sido estudados, é provável que eles possam também interagir com diferentes receptores presentes nas células do sistema imune e, consequentemente, induzir respostas imunes com diferentes atividades funcionais, com ou sem a sua apresentação por APCs. Neste sentido, o grupo de pesquisa do Cohen mostrou a importância do receptor TLR2 na resposta celular, *in vitro*, após o tratamento com Hsp60, observando diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α e aumento da produção de IL-10 por células T ativadas (Zanin-Zhorov et al., 2005b). Em outro trabalho, esse mesmo grupo

observou que a Hsp60 pode atuar em células B *in vitro*, por meio da ativação de TLR4, provocando a produção de quantidades expressivas de IL-10 e IL-6 (Cohen-Sfady *et al.*, 2005). Existe ainda outro trabalho, no qual foi mostrado que a Hsp60 está aumentada em mulheres na menopausa e que a sua presença excessiva provoca apoptose de osteoclastos, mediada por TLR2 e TLR4 (Kim *et al.*, 2009). Então, a Hsp60 e seus peptídeos, não apenas interagem com os receptores TLR, e são apresentados em moléculas MHC, como podem exercer atividade funcionais distintas em diferentes tipos celulares.

Voltando ao contexto da gravidez, onde ocorre tolerância alogeneica fisiologicamente, os dados mostrando que exossomos contendo Hsp70 estão presentes no líquido amniótico no primeiro trimestre da gravidez, reforçam a ideia do papel imunorregulador das Hsps e que talvez também, tenham um papel na tolerância materno fetal (Asea *et al.*, 2008).

A produção espontânea de citocinas e a proliferação espontânea das diferentes subpopulações celulares de células T CD4+, que têm atividades predominantemente, REGULA ou INFLAMA, apesar de não fornecerem informações sobre a resposta antígeno-específica, trazem informação relevante sobre o estado basal de ativação imunológica, dos diferentes grupos clínicos, provavelmente refletindo a ativação e imunorregulação por múltiplos antígenos, ocorrendo *in vivo*. Por isso, consideramos importante também discutir esses dados.

Primeiramente, é interessante dizer que os perfis funcionais globais, tanto em relação à produção de citocinas como em relação à proliferação, foram significativamente diferentes entre os grupos TO e RC, e TO e o estado

fisiológico, indicando que o estado basal de ativação imunológica, *in vivo*, na TO é distinto. É interessante apontar que, em todos os grupos, detectamos mais frequentemente a produção espontânea de citocinas INFLAMA do que as REGULA. Mas, as diferenças foram principalmente em relação às citocinas REGULA. Conforme discutimos anteriormente, a comparação de TO com RC é muito informativa, pois, considerando serem desfechos clínicos opostos, permite-nos levantar hipóteses sobre potenciais mecanismos envolvidos nesses opostos estados funcionais.

Apesar dos níveis de produção espontânea de citocinas não terem sido significativamente diferentes entre os grupos, a maior frequência de produção das citocinas REGULA IL-4, IL-5 e IL-13 na TO, em relação à RC (que apresentou menor frequência de produção espontânea de IL-13 e não teve produção da citocina IL-5), sugere que estas citocinas desempenhem um papel nos mecanismos imunorreguladores na TO. Chama a atenção este perfil diferencial de citocinas Th2, uma vez que, em estudos prévios do nosso grupo, foi observada maior expressão de GATA-3 (mRNA e proteína), fator de transcrição crítico na diferenciação de linfócitos Th2, em relação ao estado fisiológico e em relação à RC (Moraes-Vieira et al., 2012), sugerindo que o desvio Th2 pode ter um papel relevante na TO. A maior frequência de produção espontânea de IL-13 na TO, também é um dado interessante, uma vez que a IL-13 tem sido relatada ser uma citocina com importante atividade imunorreguladora, no contexto de transplante alogeneico, seja com células mesenquimais (MSC) (Hoornaert et al., 2016), seja reduzindo a fibrose do órgão transplantado (Brunner et al., 2013).

É interessante apontar que a IL-13 também tem atividade na proteção das células endoteliais contra apoptose mediada por TNF (Evans e Kilshaw, 2000; Grehan et al, 2005), e esta atividade também pode ter relevância no contexto do transplante. Ademais, a IL-13 e a IL-4 apresentam diversas interfaces de interação, descritas como relevantes na tolerância neonatal (Inoue et al., 2001), por exemplo, têm GATA-3 como fator de transcrição (Tindemans et al., 2014) e, mesmo, compartilham a subunidade IL-4R α do receptor de IL-4, necessária para a sua sinalização e atividade (Hoeman et al., 2013). Vale dizer, no entanto, que apesar do papel predominantemente benéfico das citocinas do tipo Th2 no contexto do transplante alogeneico, as atividades REGULA ou INFLAMA dessas citocinas podem depender muito do local de atuação, do tempo do evento em curso e do tipo celular sobre o qual elas atuam (Tay et al., 2009).

No que diz respeito ao nosso trabalho, considerando que os peptídeos da Hsp60 promoveram aumento/indução de IL-13 na TO, podemos especular que, entre outros fatores, é possível que esses peptídeos possam ter um papel na indução de IL-13, como observamos na produção espontânea.

Em relação à proliferação espontânea, é interessante chamar a atenção de que, praticamente todos os sujeitos de pesquisa tiveram proliferação de células Treg, sendo a razão entre TO e RC de 2,7, indicando quase 3 vezes mais na TO, e entre TO e SAU, de 1,7. No entanto, as porcentagens não foram estatisticamente diferentes nos diferentes grupos. Curiosamente, observamos maiores porcentagens de proliferação espontânea das células CD4⁺ efectoras, na TO do que na RC.

Consideramos importante enfatizar que, neste trabalho, nosso objetivo não foi identificar potenciais biomarcadores de TO, mas sim contribuir para a compreensão de potenciais mecanismos envolvidos neste fenômeno, trazendo à cena da discussão sobre a resposta celular antígeno-específica na TO, três grupos de antígenos com os quais os indivíduos transplantados são desafiados constantemente – antígenos do transplante, antígenos de patógenos, e autoantígenos. A comunidade científica envolvida na investigação de TO, tem dado muita ênfase à busca de biomarcadores confiáveis de TO (Brouard et al., 2007; Sagoo et al., 2010; Newell et al., 2010; Baron et al., 2015; Rebollo-Mesa et al., 2016), visando a sua aplicação na identificação de candidatos à diminuição e ou retirada de drogas imunossupressoras, na aposta de serem pacientes que podem ter boa evolução.

Apesar de vários grupos terem publicado supostas “assinaturas” de TO, há diversas questões em aberto e em debate, de forma que, até hoje, não temos um painel de biomarcadores confiáveis e, mesmo os principais mecanismos envolvidos na TO, ainda não estão muito claros. Uma questão muito importante levantada, de forma rigorosa, pelo grupo de Londres, é a crítica de que os até então publicados “biomarcadores” de TO, não podem ser considerados como tal, uma vez que carregam um viés do efeito das drogas imunossupressoras (Rebollo-Mesa et al., 2016). Ou seja, os perfis diferenciados de TO perderam a capacidade de discriminar TO, quando foram feitas análises estatísticas sofisticadas considerando-se os efeitos de diferentes drogas imunossupressoras, destacando-se que as drogas com mais impacto nos perfis diferenciados previamente identificados, foram azatioprina e prednisona (Rebollo-Mesa et al., 2016). Isto leva à conclusão sobre a necessidade de se enfrentar

esta questão crucial para qualquer proposta de biomarcadores. Por este motivo, o grupo revisitou todos seus resultados brutos e selecionou novos candidatos para biomarcadores, agora, livres do efeito de drogas IS em relação ao painel de moléculas diferencialmente expressas em TO. O perfil diferencial na TO foi maior expressão dos genes GEMIN7, IGLC1, MS4A4A, RAB40C e menor expressão dos genes ATXN3, NFKBIA, TNFAIP3, BCL2A1 e EEF1A1, envolvidos no metabolismo e/ou na comunicação celular, quando comparados os grupos TO e RC (Rebollo-Mesa et al., 2016).

Considerando esses dados, além da importância de também revisitarmos nossos perfis diferenciais de TO já publicados, destacamos que no presente trabalho, mesmo na presença de imunossupressores, nos grupos EST e RC, foi possível detectar perfis diferenciais de resposta celular tanto a aloantígenos quanto a antígenos do patógeno e autoantígenos. Ademais, como TO e SAU também apresentaram diferenças significativas, e esses grupos não estão em uso de imunossupressores, acreditamos que os perfis diferenciais sejam de relevância para a imunobiologia na TO.

Outra questão que vale discutir é o pequeno número de casos estudados em nosso trabalho. De fato, o número de indivíduos em TO é sempre um fator limitante em relação ao poder estatístico das comparações. Não obstante, o fato de termos encontrado diferenças significativas, apoia a interpretação da validade das informações do nosso trabalho.

A contribuição principal do nosso trabalho é trazer à cena da imunobiologia da tolerância operacional, as respostas imunes celulares antígeno-específicas e suas possíveis sobreposições e interações, dirigidas a universos antigênicos que constantemente desafiam os indivíduos

transplantados- alo – patógeno – autoantígeno -, exigindo do sistema imune, constante ativação e controle REGULA INFLAMA. Com base em nossos dados e naqueles da literatura, concluímos que, a resposta celular dirigida a esses três grupos de antígenos, a despeito de significativa sobreposição e efeitos recíprocos, de uma resposta nas outras, o estado de tolerância operacional modula o reconhecimento celular antigênico de forma discriminada, do ponto de vista funcional, induzindo um desvio da resposta aos antígenos do doador para um perfil imunorregulador, mobilizando também autoimunidade com atividade imunorreguladora em relação à Hsp60, ao mesmo tempo em que mantém o perfil inflamatório de resposta dirigida a patógenos, mantendo imunocompetência e um estado de homeostase, mesmo no convívio com o aloenxerto – constante fonte de inflamação.

O perfil diferencial na alorreatividade ao doador e na resposta aos antígenos da Hsp60, em relação ao estado de rejeição crônica que é um desfecho oposto ao da tolerância, nos leva a interpretar que a alo e autominunidade imunorreguladoras têm importante papel na imunobiologia da tolerância operacional. Podemos especular que a compreensão sobre os mecanismos que podem favorecer o desvio REGULA da alorreatividade dirigida ao doador, assim como da autoimunidade imunorreguladora, poderá contribuir para a elaboração de novas estratégias terapêuticas, que favoreçam a modulação da resposta imune na direção da tolerância operacional.

6. Conclusões

1. Os resultados deste trabalho corroboram a nossa hipótese que, na tolerância operacional, a resposta celular antígeno-específica é modulada, funcionalmente, de forma distinta, em relação a aloantígenos do doador e antígenos de patógenos. Os mecanismos imunorreguladores na tolerância operacional desviam a resposta celular dirigida a aloantígenos envolvidos no transplante, para um perfil predominantemente imunorregulador, preservando a resposta celular pró-inflamatória em relação a antígenos de patógenos.
2. Na tolerância operacional, a ativação de mecanismos imunorreguladores levam a um desvio REGULA da resposta celular alogeneica, em relação ao estado fisiológico (saudáveis). Este desvio REGULA não ocorre na rejeição crônica, portanto, interpretamos que a alorreatividade celular imunorreguladora, dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, seja importante na indução e/ou manutenção do estado de tolerância operacional.
3. O desvio REGULA da via indireta de alorreconhecimento a peptídeos HLA-DR do doador, envolveu a inibição das citocinas pró-inflamatórias, IL-1B, IL-8, IL-12, IL-17, G-CSF, IFN- γ e MCP-1, assim como a inibição da proliferação de células CD4⁺ T efectoras e, principalmente, das

células T de memória efetora, indicando serem esses importantes mecanismos imunorreguladores em curso, na tolerância operacional.

4. A preservação do perfil INFLAMA da resposta celular ao patógeno (CMV), na TO, envolve indução/aumento das citocinas inflamatórias IL-1B, IL-17, IFN- γ , MCP-1 e MIP-1B, algum grau de inibição de citocinas imunorreguladoras, e inibição da proliferação de células Tregs, indicando que esses mecanismos são importantes na preservação da imunocompetência observada na clínica, na tolerância operacional.
5. A resposta celular ao peptídeo N6 do autoantígeno Hsp60, na tolerância operacional, teve um perfil distinto da rejeição crônica, principalmente pelo aumento/indução da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, na TO, sugerindo que o peptídeo N6 pode ter uma contribuição nos mecanismos imunorreguladores na TO, favorecendo a produção dessas citocinas com atividade imunorreguladora.
6. Em contraste com o perfil predominantemente REGULA da resposta celular ao peptídeo N7 da Hsp60, no estado fisiológico (SAU), na tolerância operacional e na rejeição crônica, o perfil foi predominantemente INFLAMA, indicando a ocorrência de um desvio INFLAMA da atividade funcional do peptídeo N7, no contexto do transplante, principalmente, por indução de IL-6, IL-8, IL-17, IFN- γ , TNF- α e MIP-1B.
7. A resposta celular ao peptídeo C9, do autoantígeno Hsp60, foi predominantemente, INFLAMA para a produção de citocinas, no estado

fisiológico (SAU), na TO e na RC. No entanto, a diferença significativa da resposta para as citocinas pró-inflamatórias na RC, em relação à TO e ao grupo SAU, mas não entre TO e SAU, indica que, no contexto da RC, o efeito INFLAMA do peptídeo C9 foi intensificado, provavelmente contribuindo para a amplificação da inflamação, e agressão ao enxerto, em curso na RC.

8. Os perfis globais de produção espontânea de citocinas e de proliferação espontânea de diferentes subpopulações de células T CD4+ (sem estímulo antigênico), foram significativamente diferentes entre TO e RC, assim como em relação ao estado fisiológico, indicando haver diferentes estados basais de ativação imunológica, nos processos em curso. A maior frequência de produção espontânea de IL-4, IL-5 e IL-13 na TO, em relação ao estado de RC, sugere que essas citocinas desempenhem um papel nos mecanismos imunorreguladores, em curso, na TO.
9. A complexa e dinâmica imunobiologia da tolerância no transplante, envolve mecanismos imunorreguladores também em relação à resposta antígeno-específica, com o desvio imunorregulador da via indireta de alorreconhecimento, dirigida a peptídeos HLA-DR do doador, assim como a atuação da autoimunidade imunorreguladora, mediada pelo peptídeo N6 da Hsp60, ao mesmo tempo em que é preservada a capacidade inflamatória da resposta celular a patógenos. Concluimos que, em relação ao universo de importantes desafios antigênicos no

alotransplante, apesar da ocorrência de diversas sobreposições e interfaces da resposta celular a aloantígenos, a patógenos e a autoantígenos, bem documentada na literatura, há uma discriminação funcional REGULA/INFLAMA promovendo a manutenção da tolerância e a imunocompetência.

7. Referências bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR*, 6ª EDIÇÃO, ELSEVIER, 2008, 576 p.
- Alberú, J., Y. Richaud-Patin, L. G. Vázquez-Lavista, C. de Leo, H. Guzmán-Rodríguez, E. Mancilla, R. Correa-Rotter, A. Chew-Wong and L. Llorente (2004). "In vivo IL-10 and TGF-beta production by PBMC from long-term kidney transplant recipients with excellent graft function: a possible feedback mechanism participating in immunological stability." *Clin Transplant* 18(2): 174-178.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, Z. Chen, S. P. Berzins, C. Benoist and D. Mathis (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." *Immunity* 23(2): 227-239.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* 298(5597): 1395-1401.
- Anderton, S. M., C. G. Radu, P. A. Lowrey, E. S. Ward and D. C. Wraith (2001). "Negative selection during the peripheral immune response to antigen." *J Exp Med* 193(1): 1-11.
- Ashton-Chess, J., S. Brouard and J. P. Soulillou (2006). "Is clinical tolerance realistic in the next decade?" *Transpl Int* 19(7): 539-548.
- Asea A1, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D, Witkin SS. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*. 2008 Oct;79(1):12-7. doi: 10.1016/j.jri.2008.06.001. Epub 2008 Aug 19.
- Associação Brasileira de Transplantes de órgãos, Registro brasileiro de Transplantes, 2015: Disponível em: www.abto.org.br
- Avdic S, McSharry BP, Steain M, Poole E, Sinclair J, Abendroth A, Slobedman B. Human Cytomegalovirus-Encoded Human Interleukin-10 (IL-10) Homolog Amplifies Its Immunomodulatory Potential by Upregulating Human IL-10 in Monocytes. *J Virol*. 2016 Mar 28;90(8):3819-27. doi: 10.1128/JVI.03066-15. Print 2016 Apr 15.
- Avdic S, McSharry BP, Slobedman B. Modulation of dendritic cell functions by viral IL-10 encoded by human cytomegalovirus. *Front Microbiol*. 2014 Jul 4;5:337. doi: 10.3389/fmicb.2014.00337. eCollection 2014.
- Baron D, Ramstein G, Chesneau M, Echasseriau Y, Pallier A, Paul C, Degauque N, Hernandez-Fuentes MP, Sanchez-Fueyo A, Newell KA, Giral M, Souillou JP, Houlgatte R, Brouard S. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int*. 2015 May;87(5):984-95. doi: 10.1038/ki.2014.395. Epub 2015 Jan 28.

- Benjamin D. Singer, Landon S. King and Franco R. D'Alessio. *Front. Immunol.*, 11 February 2014| <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00046>
- Birk, O. S., S. L. Gur, D. Elias, R. Margalit, F. Mor, P. Carmi, J. Bockova, D. M. Altmann and I. R. Cohen (1999). "The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5159-5163.
- Borie, D. C., J. J. O'Shea and P. S. Changelian (2004). "JAK3 inhibition, a viable new modality of immunosuppression for solid organ transplants." *Trends Mol Med* 10(11): 532-541.
- Braudeau C¹, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, Braud C, Moreau A, Renaudin K, Souillou JP, Brouard S. 2008 Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 15;86(1): 130-6. doi: 10.1097/TP.0b013e31817b8dc5.
- 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⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int*. 20(10):845-55, 2007.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton-Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Souillou JP, Sarwal M. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(39):15448-53, 2007.
- 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 (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant* 5(2): 330-340.
- Brouard S, Pallier A, Renaudin K, Foucher Y, Danger R, Devys A, Cesbron A, Guillot-Guegen C, Ashton-Chess J, Le Roux S, Harb J, Roussey G, Subra JF, Villemain F, Legendre C, Bemelman FJ, Orlando G, Garnier A, Jambon H, Le Monies De Sagazan H, Braun L, Noël C, Pillebout E, Moal MC, Cantarell C, Hoitsma A, Ranbant M, Testa A, Souillou JP, Giral M. 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. Epub 2012 Sep 13.
- Burnet, F., Ed. (1959). *The clonal selection theory of acquired immunity*. London, Cambridge University Press.
- Bishop RK, Valle Oseguera CA, Spencer JV. Human Cytomegalovirus interleukin-10 promotes proliferation and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Cell Microenviron*. 2015;2(1). pii: e678.

- Breckler LA, Hale J, Taylor A, Dunstan JA, Thornton CA, Prescott SL. Pregnancy IFN-gamma responses to foetal alloantigens are altered by maternal allergy and gravidity status. *Allergy*. 2008 Nov;63(11):1473-80. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01718.x.
- Brennan DC Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Apr;12(4):848-55.
- Cai J e Terasaki PI. Humoral theory transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunology*. 2005; 66(4):334-42.
- Caldas, CA Estudo sequencial da autorreatividade celular à proteína de choque térmico 60 em pacientes transplantados renais indivíduos saudáveis: busca de epitopos potencialmente reguladores [tese doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências biomédicas – USP, 2005.
- Caldas, C., E. Luna, M. Spadafora-Ferreira, G. Porto, L. K. Iwai, S. E. Oshiro, S. M. Monteiro, J. A. Fonseca, F. Lemos, J. Hammer, P. L. Ho, J. Kalil and V. Coelho (2006). "Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses." *Clin Exp Immunol* 146(1): 66-75.
- Caldas, C., M. Spadafora-Ferreira, J. A. Fonseca, E. Luna, L. K. Iwai, J. Kalil and V. Coelho (2004). "T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role?" *Transplant Proc* 36(4): 833-835.
- Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." *J Immunol* 178(1): 179-185.
- Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity." *J Immunol* 178(1): 172-178.
- Cervera C, Filella X, Linares L, Pineda M, Esteva C, Antón A, Marcos MA, Cofán F, Navasa M, Pérez-Villa F, Pumarola T, Moreno A. TH1/TH2 cytokine release pattern during in vivo cytomegalovirus disease in solid organ transplantation.
- Chen W, Ghobrial RM, Li XC. The Evolving Roles of Memory Immune Cells in Transplantation. *Transplantation*. 2015 Oct;99(10):2029-37. doi: 10.1097/TP.0000000000000802.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* 265(5176): 1237-1240.
- Coelho, V. and A. M. Faria (2011). "HSP60: Issues and Insights on Its Therapeutic Use as an Immunoregulatory Agent." *Front Immunol* 2: 97.
- Coelho V, Kalil J. *Imunobiologia dos transplantes*. In : *Imunologia*, 2nd ed. Rio de Janeiro ; Livraria e Editora Revinter Ltda ; 2009.p241-263.

- Coelho V, Faria AMC. HSP60: Issues and Insights on Its Therapeutic Use as an Immunoregulatory Agent. *Frontiers in Immunology*. 2011;2:97. doi:10.3389/fimmu.2011.00097.
- Colovai AI, Mirza M, Vlad G et al. Regulatory CD8+CD28– T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003; 64:31–7.
- Cohen, I. R. (1992). "The cognitive paradigm and the immunological homunculus." *Immunol Today* 13(12): 490-494.
- Cohen, I. R. (2000). "Discrimination and dialogue in the immune system." *Semin Immunol* 12(3): 215-219; discussion 257-344.
- Cohen, I. R. (2007). "Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus." *J Autoimmun* 29(4): 246-249.
- Cohen, I. R. (2007). "Real and artificial immune systems: computing the state of the body." *Nat Rev Immunol* 7(7): 569-574.
- Cohen, I. R. and D. B. Young (1991). "Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus." *Immunol Today* 12(4): 105-110.
- Cohen-Sfady M, Nussbaum G, Pevsner-Fischer M, Mor F, Carmi P, Zanin-Zhorov A, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3594-602.
- Costa C, Balloco C, Sidoti F, Mantovani S, Rittà M, Piccighello A, Fop F, Messina M, Cavallo R. Evaluation of CMV-specific cellular immune response by EliSPOT assay in kidney transplant patients. *J Clin Virol*. 2014 Dec;61(4):523-8. doi: 10.1016/j.jcv.2014.09.015. Epub 2014 Oct 5.
- Crispim JC, Grespan R, Martelli-Palomino G, Rassi DM, Costa RS, Saber LT, Cunha FQ, Donadi EA. Interleukin-17 and kidney allograft outcome. *Transplant Proc*. 2009 Jun;41(5):1562-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.01.092.
- Crough T, Khanna R Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):76-98, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00034-08.
- Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. 1993
- Danger R, Giral M, Souillou JP, Brouard S. Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Dec;13(6):609-13.
- Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B, et al.. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998 Feb 28;351(9103):623-8.

- Demetris AJ, Lunz JG 3rd, Randhawa P, Wu T, Nalesnik M, Thomson AW. Monitoring of human liver and kidney allograft tolerance: a tissue/histopathology perspective. *Transpl Int*. 2009 Jan;22(1):120-41.
- Demirkiran, A., T. K. Hendriks, C. C. Baan and L. J. van der Laan (2008). "Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting?" *Transplantation* 85(6): 783-789.
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics*. 2012 Feb;64(2):77-85. doi: 10.1007/s00251-011-0590-0. Epub 2011 Dec 3.
- Degauque N, Brouard S, Souillou JP. Cross- Reactivity of TCR Repertoire: Current Concepts, Challenges, and Implication for Allotransplantation. *Front Immunol*. 2016 Mar 24;7:89. doi: 10.3389/fimmu.2016.00089. eCollection 2016.
- Demirkiran A¹, Hendriks TK, Baan CC, van der Laan LJ. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation*. 2008 Mar 27;85(6):783-9. doi: 0.1097/TP.0b013e318166910b.
- Erlebacher, A.; Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol*, 2013; 31: 387-411
- Espinosa JR, Samy KP, Kirk AD. Memory T cells in organ transplantation: progress and challenges. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Jun;12(6):339-47. doi: 10.1038/nrneph.2016.9. Epub 2016 Feb 29.
- Evans PC(1), Kilshaw PJ. Interleukin-13 protects endothelial cells from apoptosis and activation: association with the protective genes A20 and A1. *Transplantation*. 2000 Sep 27;70(6):928-34.
- Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1998 Jun 11;338(24):1741-51.
- Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996;8:271–80
- Granja, C. Estudo sequencial da resposta celular anti-proteínas de choque térmico humanas no transplante renal [Tese doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2000.
- Granja, C., R. A. Moliterno, M. S. Ferreira, J. A. Fonseca, J. Kalil and V. Coelho (2004). "T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions." *Hum Immunol* 65(2): 124-134
- Guleria I, Sayegh MH. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance . *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3345-51.
- Hall CH, Kassel R, Tacke RS, Hahn YS. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. *PLoS ONE*. 2010; 5:e12154. [PubMed: 20730048]

- Haas M, SisB, Racusen L C , Solez K, Glotz D, Colvin R B, Castro M C R, David D S R, David E, David-Neto, Bagnasco S M, Cendales L C, Cornell L D, Demetris A J, Drachenberg C B, Farver C F, Farris A B, Gibson I W, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickleit V, Randhawa P, Rodriguez E R, Rush D, Smith R N, Tan C D, Wallace W, Mengel D M. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions *American Journal of Transplantation* 2014; 14: 272–283 .
- Heidt and Wood. BIOMARKERS OF OPERATIONAL TOLERANCE IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION. *Expert Opin Med Diagn.* 6(4):281-293, 2012.
- Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. A 'biomarker signature' for tolerance in transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 6(10):606-13, 2010.
- Hightower, L. E. and P. T. Guidon (1989). "Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins." *J Cell Physiol* 138(2): 257-266.
- Hoeman CM, Dhakal M, Zaghoulani AA, Cascio JA, Wan X, Khairallah MT, Chen W, Zaghoulani H. Developmental expression of IL-12R β 2 on murine naive neonatal T cells counters the upregulation of IL-13R α 1 on primary Th1 cells and balances immunity in the newborn. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):6155-63. doi: 10.4049/jimmunol.1202207. Epub 2013 May 6.
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999 Feb 11;397(6719):530-4.
- Hoornaert CJ, Luyckx E, Reekmans K, Dhainaut M, Guglielmetti C, Le Blon D, Dooley D, Fransen E, Daans J, Verbeeck L, Quarta A, De Vocht N, Lemmens E, Goossens H, Van der Linden A, Roobrouck VD, Verfaillie C, Hendrix S, Moser M, Berneman ZN, Ponsaerts P. In Vivo Interleukin-13-Primed Macrophages Contribute to Reduced Alloantigen-Specific T Cell Activation and Prolong Immunological Survival of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Implants. *Stem Cells*. 2016 Jul;34(7):1971-84. doi: 10.1002/stem.2360. Epub 2016 Mar 28.
- Hsieh, C. S., H. M. Lee and C. W. Lio (2012). "Selection of regulatory T cells in the thymus." *Nat Rev Immunol* 12(3): 157-167.
- Hu H, Knetchle SJ. Elevation of multiple cytokines/chemokines in urine of human renal transplant recipients with acute and chronic injuries: potential usage for diagnosis and monitoring. *Transpl Rev* 2006; 20:165- 71.
- Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Updat.* 2006; 12: 209-32.
- Ibrahim S, Dawson DV, Sanfilippo F. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation.* 1995 Mar 15;59(5):724-8

- Inoue Y, Konieczny BT, Wagener ME, McKenzie AN, Lakkis FG Failure to induce neonatal tolerance in mice that lack both IL-4 and IL-13 but not in those that lack IL-4 alone. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):1125-8.
- Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*. 2007 Dec;19(6):409-17.
- Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):530-41.
- Jeroen B. van der Net, Andrew Bushell, Kathryn J. Wood and Paul N. Harden Regulatory T cells: first steps of clinical application in solid organ transplantation. *Transplantation International*, 2015.
- Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2004 Oct;16(5):550-7.
- Jones ND, Fluck NC, Mellor AL, Morris PJ, Wood KJ. The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation. *Int Immunol* 1998; 10: 1637.
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:531–64. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology and therapeutics*, Oxford, v. 80, no. 2, p. 183-201, nov. 1998.
- Kim YS, Koh JM, Lee YS, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, Kim GS. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone*. 2009 Jul;45(1):68-76. doi: 10.1016/j.bone.2009.03.658. Epub 2009 Mar 21.
- Kindt, T.J., Osborne, B. A., Goldsby, R. A. (2007). *Kuby Immunology*. 6th ed. New York. W. H. Freeman. 574p.
- Knoechel, B., J. Lohr, S. Zhu, L. Wong, D. Hu, L. Ausubel and A. K. Abbas (2006). "Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes." *J Immunol* 176(11): 6473-6483.
- Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J. Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):2013-8
- Krummey SM, Ford ML. Heterogeneity within T Cell Memory: Implications for Transplant Tolerance. *Front Immunol*. 2012 Mar 1;3:36. doi: 10.3389/fimmu.2012.00036. eCollection 2012.
- La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol*

- Lett. 2014 Nov;162(1 Pt A):41-8. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.013. Epub 2014 Jul 1.
- Lafaille, J. J.;Haas, W.;Coutinho, A.;Tonegawa, S.; Positive selection of gamma delta T cells. *Immunol Today*, 1990; 11(3)75-8
- Lamb, JR, Bal, V, Mendez-Samperio, P, Mehlert, A, So, A, Rothbard, J, Jindal, S, Young, RA, and Young, DB. Stress proteins may provide a link between the immu, CAne response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol* 1989; 1(2):191-196
- Lechler, R. I., O. A. Garden and L. A. Turka (2003). "The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* 3(2): 147-158.
- Le Gros G, Ben-Sasson SZ, seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)- producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp med*. 1990 Sep 1;172(3):921-9
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Dec 18;98 (26):15137-42
- Limaye AP, La Rosa C, Longmate J, Diamond DJ. Plasma IL-10 Levels to Guide Antiviral Prophylaxis Prevention of Late-Onset Cytomegalovirus Disease, in High Risk Solid Kidney and Liver Transplant Recipients. *Transplantation*. 2016 Jan;100(1):210-6. Jenkins C¹, Garcia W, Godwin MJ, Spencer JV, Stern JL, Abendroth A, Slobedman B. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection.
- Lin K, Chen S, Chen G. Role of memory T cells and perspectives for intervention in organ transplantation. *Front Immunol*. 2015 Sep 14;6:473. doi: 10.3389/fimmu.2015.00473.
- Li T, Si Z, Qi H, He Z, Li Y. IL-17 in the early diagnosis of acute renal allograft rejection in mice. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011 Dec;36(12):1147-52. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.12.004.
- LiX, Liang Y, LeBlanc M, Benner C, Zheng Y. Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell*. 2014 Aug 14;158(4):734-48. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.030.
- Li, Y., T. Koshiba, A. Yoshizawa, Y. Yonekawa, K. Masuda, A. Ito, M. Ueda, T. Mori, H. Kawamoto, Y. Tanaka, S. Sakaguchi, N. Minato, K. J. Wood and K. Tanaka (2004). "Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation." *Am J Transplant* 4(12): 2118-2125.
- Li H, Zhang J. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 730.535. doi: 10.1155 / 2015/730535. Epub 2015, 28 may. Circulating MicroRNAs: potential

biomarkers and emerging cardiovascular and cerebrovascular disease diagnosis.

- Liston, A. and C. C. Goodnow (2005). "Genetic lesions in thymic T cell clonal deletion and thresholds for autoimmunity." *Novartis Found Symp* 267: 180-192; discussion 192-189.
- Lio CW, Hsieh CS. Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2010
- Liu, Y. J. (2006). "A unified theory of central tolerance in the thymus." *Trends Immunol* 27(5): 215-221.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, Moreau A, Souillou JP, Brouard S. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 81(3):398-407, 2006.
- Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditunno P, Corcelli M, Mangino M, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2011 Jun;11(6):1248-59. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03529.x.
- Luna, E., E. Postol, C. Caldas, L. R. Mundel, G. Porto, L. K. Iwai, P. L. Ho, J. Kalil and V. Coelho (2007). "Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains." *Cell Stress Chaperones* 12(2): 112-122.
- Maron R1, Sukhova G, Faria AM, Hoffmann E, Mach F, Libby P, Weiner HL. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(13):1708-15.
- McGeachy NJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):445-53.
- Magee, C. C. Transplantation across previously incompatible immunological barriers. *Transpl Int*. 2006 Feb; 19(2): 87-97.
- Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernández-Fuentes M, Souillou JP, Sánchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 7(2):309-19, 2007.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301–5.
- Mazariegos, G. V., A. F. Zahorchak, J. Reyes, H. Chapman, A. Zeevi and A. W. Thomson (2005). "Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression." *Am J Transplant* 5(2): 314-322.
- Miqueu P, Degauque N, Guillet M, Giral M, Ruiz C, Pallier A, Braudeau C, Roussey-Kesler G, Ashton-Chess J, Doré JC, Thervet E, Legendre C, Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Goldman M, Volk HD, Janssen U, Wood KJ, Lechler RI,

- Bertrand D, Sébille V, Soulillou JP, Brouard S. Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur J Immunol*. 2010 Nov;40(11):3280-90, 2010.
- Miller, J. F. and W. R. Heath (1993). "Self-ignorance in the peripheral T-cell pool." *Immunol Rev* 133: 131-150.
- Minamimura K¹, Sato K, Yagita H, Tanaka T, Arai S, Maki T. Strategies to induce marked prolongation of secondary skin allograft survival in alloantigen-primed mice. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):761-72. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.02143.x. Epub 2008 Feb 5.
- Monk N. J Hargreaves R. E. G, Simpson E. Dyson J. P. Jurcevic S. Transplant tolerance: models, concepts and facts. *J Mol Med* (2006) 84: 295–304 DOI 10.1007/s00109-005-0006-4.
- Moraes-Vieira, P. M., H. M. Silva, M. C. Takenaka, S. M. Monteiro, F. Lemos, D. Saitovitch, J. Kalil and V. Coelho (2010). "Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals." *Hum Immunol* 71(5): 442-450.
- Moraes-Vieira PM, Takenaka MC, Silva HM, Monteiro SM, Agena F, Lemos F, Saitovitch D, Kalil J, Coelho V. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clin Immunol*.142(2):117-26, 2012.
- Morimoto, R. I. and M. G. Santoro (1998). "Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection." *Nat Biotechnol* 16(9): 833-838.
- Mota, PC, et. al. Pulmão e transplante renal. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v.15, n.6, p.1073-99, 2009.
- Muller, Y. D., J. D. Seebach, L. H. Bühler, M. Pascual and D. Golshayan (2011). "Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells." *Self Nonself* 2(1): 26-34.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004 Aug 27;78(4):557-65.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, C. L. Fung, P. J. O'Connell, R. D. Allen and J. R. Chapman (2003). "The natural history of chronic allograft nephropathy." *N Engl J Med* 349(24): 2326-2333.
- Nankivell, B. J., Kuypers, D.R (2003). "Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss." (2011) *Lancet*. Oct 15;378(9800):1428-37. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60699-5.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1836-47.

- Nishimura, E., T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka and S. Sakaguchi (2004). "Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells." *Int Immunol* 16(8): 1189-1201.
- O'Gorman CS, O'Connell K, Broderick AM, Butler KM. Hepatitis B virus infection in children. *Ir Med J*. 2009 Nov-Dec;102(10):328-31
- O S Birk, D C Douek, D Elias, K Takacs, H Dewchand, S L Gur, M D Walker, R van der Zee, I R Cohen, and D M Altmann. A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Feb 6; 93(3): 1032–1037.
- Page EK, Dar WA, Knechtle SJ. Tolerogenic therapies in transplantation. *Front Immunol*. 2012;3:198.
- 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.
- Pilat N, Klaus C, Hock K, Baranyi U, Unger L, Mahr B, Farkas AM, Wrba F, Wekerle T. Polyclonal Recipient nTregs Are Superior to Donor or Third-Party Tregs in the Induction of Transplantation Tolerance. *J Immunol Res*. 2015;2015:562935. doi: 10.1155/2015/562935. Epub 2015 Jul 27
- Pirenne J, Kitade H, Kawai M, Koshiba T, Van Damme B, Mathieu C, *et al*. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation*. 2005 Feb 15;79(3 Suppl):S25-7.
- Pockley, A. G. (2001). "Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection." *Transplantation* 71(11): 1503-1507.
- Pockley, A. G. Muthana, M. Heat Shock Proteins and allograft rejection. *Contr. nephrol*, 2005; 148:122-134
- Pons, J. A., B. Revilla-Nuin, A. Baroja-Mazo, P. Ramírez, L. Martínez-Alarcón, F. Sánchez-Bueno, R. Robles, A. Rios, P. Aparicio and P. Parrilla (2008). "FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal." *Transplantation* 86(10): 1370-1378.
- Popescu I, Pipeling MR, Mannem H¹, Shah PD², Orens JB, Connors M, Migueles SA, McDyer JF. IL-12-Dependent Cytomegalovirus-Specific CD4+ T Cell Proliferation, T-bet Induction, and Effector Multifunction during Primary Infection Are Key Determinants for Early Immune Control. *J Immunol*. 2016 Jan 15;196(2):877-90. doi: 10.4049/jimmunol.1501589. Epub 2015 Dec 11.
- Pourghesari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA. The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *J Virol*. 2007 Jul;81(14):7759-65. Epub 2007 Apr 4.

- Quintana FJ, Mimran A, Carmi P, Mor F, Cohen IR. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PLoS One*. 2008;3(12):e4026. doi: 10.1371/journal.pone.0004026. Epub 2008 Dec 24.
- Stefan M Brunner, Gabriela Schiechl, Rebecca Kesselring, Maria Martin, Saidou Balam, Hans J Schlitt, Edward K Geissler, and Stefan Fichtner-Feigl IL-13 signaling via IL-13R α_2 triggers TGF- β_1 -dependent allograft fibrosis *Transplant Res*. 2013; 2: 16. Published online 2013 Oct 22. doi: 10.1186/2047-1440-2-16
- Razonable RR, Humar A; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13 Suppl 4:93-106. doi: 10.1111/ajt.12103.
- Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8⁺ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 2010;32(1):67–78.
- Rapaport, F. T., J. Dausset, J. M. Converse and H. S. Lawrence (1965). "Biological and ultrastructural studies of leucocyte fractions as transplantation antigens in man." *Transplantation* 3: 490-500.
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962;18:571–573. doi: 10.1007/BF02172188.
- Ritossa FM (1964) Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35:601-607
- Ritossa, F. M. (1964). "Behaviour of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of drosophila." *Exp Cell Res* 36: 515-523.
- Ritter M, Schmidt T, Dirks J, Hennes P, Juhasz-Böss I, Solomayer EF, Gortner L, Gärtner B, Rohrer T, Sester U, Sester M. Cytomegalovirus-specific T cells are detectable in early childhood and allow assignment of the infection status in children with passive maternal antibodies. *Eur J Immunol*. 2013 Apr;43(4):1099-108. doi: 10.1002/eji.201243100. Epub 2013 Jan 31.
- Roedder S, Gao X, Sarwal MM The pits and pearls in translating operational tolerance biomarkers into clinical practice. *Curr Opin Organ Transplant*. 17(6):655-62, 2012.
- Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J Exp Med*. 1987
- Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005. Review.
- Rouhani SJ, Eccles JD, Tewalt EF, Engelhard VH (2014) Regulation of T-cell Tolerance by Lymphatic Endothelial Cells. *J Clin Cell Immunol* 5:242. doi: 10.4172/2155-9899.1000242
- Rowe V, Banovic T, MacDonald KP, Kuns R, Don AL, Morris ES, Burman AC, Bofinger HM, Clouston AD, Hill GR. Host B cells produce IL-10 following TBI and

- attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2485-92. Epub 2006
- Ruan, Q. G., K. Tung, D. Eisenman, Y. Setiady, S. Eckenrode, B. Yi, S. Purohit, W. P. Zheng, Y. Zhang, L. Peltonen and J. X. She (2007). "The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function." *J Immunol* 178(11): 7173-7180.
- Ruiz P, Maldonado P, Hidalgo Y, Sauma D, Roseblatt M, Bono MR. Alloreactive Regulatory T Cells Allow the Generation of Mixed Chimerism and Transplant Tolerance. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:596. doi:10.3389/fimmu.2015.00596.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayr B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Souillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 120(6):1848-61, 2010.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, v. 22, p. 531-62, 2004.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-1164.
- Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1643-51.
- Sánchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX, Strom TB. Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function in transplantation. *Transpl Int*. 2007 Jun;20(6):534-41. Epub 2007 Mar 16.
- Sánchez-Fueyo A. Identification of tolerant recipients following liver transplantation. *Int Immunopharmacol*. 10(12):1501-4, 2010.
- SAN SEGUNDO, D. et al. Two-year follow-up of a prospective study of circulating regulatory T cells in renal transplant patients. *Clin Transplant*, v. 24, n. 3, p. 386-93, 2010 May-Jun 2010.
- Savage, P. A. and M. M. Davis (2001). "A kinetic window constricts the T cell receptor repertoire in the thymus." *Immunity* 14(3): 243-252.
- Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Köhler H. Levels of virus-specific CD4⁺ T cells correlate with cytomegalovirus

control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001 May 15;71(9):1287-94.

Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, Girndt M, Meyerhans A, Mueller-Lantzsch N, Schäfers HJ, Sybrecht GW, Köhler H, Sester M. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1483-9.

Sharabi Y, Sachs DH. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989; 169: 493.

Silva, H. M., M. C. Takenaka, P. M. Moraes-Vieira, S. M. Monteiro, M. O. Hernandez, W. Chaara, A. Six, F. Agena, P. Sesterheim, F. M. Barbé-Tuana, D. Saitovitch, F. Lemos, J. Kalil and V. Coelho (2012). "Preserving the B cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation." *Mol Med*.

Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, I. W. Gibson, P. C. Grimm, M. Haas, E. Lerut, H. Liapis, R. B. Mannon, P. B. Marcus, M. Mengel, M. J. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickleit, J. C. Papadimitriou, J. L. Platt, P. Randhawa, I. Roberts, L. Salinas-Madruga, D. R. Salomon, D. Seron, M. Sheaff and J. J. Weening (2007). "Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')." *Am J Transplant* 7(3): 518-526.

Socorro-Silva, A. Papel das células dendríticas no direcionamento funcional da auto-reatividade celular à Hsp60, em células humanas. 2007. Tese (Doutorado em Imunologia Clínica e Alergia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Spadafora-Ferreira M1, Caldas C, Faé KC, Marrero I, Monteiro SM, Lin-Wang HT, Socorro-Silva A, Fonseca SG, Fonseca JA, Kalil J, Coelho V. CD4+CD25+Foxp3+ indirect alloreactive T cells from renal transplant patients suppress both the direct and indirect pathways of allorecognition. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):352-61.

Spadafora-Ferreira M, Fonseca JA, Granja C, Malheiros DM, Kalil J, Coelho V. Predominant IL-10 production indirect alloreactivity is not associated with rejection. *Clin Immunol*, 2001 Dec; 101 (3):315-27.

Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:395-425. Epub 2001 Oct 4.

Strober, S., C. Benike, S. Krishnaswamy, E. G. Engleman and F. C. Grumet (2000). "Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity." *Transplantation* 69(8): 1549-1554.

- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655-69.
- Tafari A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*. 1995 Oct 27;270(5236):630-3.
- Tay SS, Plain KM, Bishop GA. Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009 Feb;14(1):16-22. doi:10.1097/MOT.0b013e32831ebdf5.
- Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*. 2005 Mar 28;579(9):1951-60.
- Thomson, A. W., G. V. Mazariegos, J. Reyes, V. S. Donnenberg, A. D. Donnenberg, C. Bentlejewski, A. F. Zahorchak, P. J. O'Connell, J. J. Fung, E. Jankowska-Gan, W. J. Burlingham, P. S. Heeger and A. Zeevi (2001). "Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients." *Transplantation* 72(8 Suppl): S13-22.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo and E. M. Shevach (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." *J Immunol* 172(11): 6519-6523.
- Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity*. 2014 Aug 21;41(2):191-206. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.006.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, Garcia-Noblejas A, Clari MA, Chilet M, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol*. 2010 Jul;82(7):1208-15. doi: 10.1002/jmv.21799.
- Toungouz, M., V. Donckier and M. Goldman (2003). "Tolerance induction in clinical transplantation: the pending questions." *Transplantation* 75(9 Suppl): 58S-60S.
- Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):241-6.
- Turvey SE, Hara M, Morris PJ, Wood KJ. Mechanisms of tolerance induction after intrathymic islet injection: determination of the fate of alloreactive thymocytes. *Transplantation* 1999; 68: 30.
- van Eden W, Hauet-Broere F, Berlo S, Paul L, van der Zee R, de Kleer I, Prakken B, Taams L. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. *Int Rev Immunol*. 2005 May-Aug;24(3-4):181-97. Review.
- van Rood JJ, Loberiza FR Jr, Zhang MJ, Oudshoorn M, Claas F, Cairo MS, Champlin RE, Gale RP, Ringdén O, Hows JM, Horowitz MH. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease

- after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1572-7.
- Vasto S, Colonna-Romano G, Larbi A, Wikby A, Caruso C, Pawelec G. Role of persistent CMV infection in configuring T cell immunity in the elderly. *Immun Ageing*. 2007 Mar 21;4:2.
- Victora GD, Bilate AM, Socorro-Silva A, Caldas C, Lima RC, Kalil J, Coelho V, Victora CG. Mother-child immunological interactions in early life affect long-term humoral autoreactivity to heat shock protein 60 at age 18 years. *J Autoimmun*. 2007 Aug;29(1):38-43. Epub 2007 May 23.
- Vogel I, Verbinnen B, Maes W, Boon L, Van Gool SW, Ceuppens JL. Foxp3+ regulatory T cells are activated in spite of B7-CD28 and CD40-CD40L blockade. *Eur J Immunol* (2013) 43:1013–23. doi:10.1002/eji.201242737
- Volsi, E. C. F. R. Células dendríticas e a proteína de Choque térmico 60KDA (Hsp60): estratégias para imunorregulação do sistema imune murino. 2008. Tese (Doutorado em Imunologia Clínica e Alergia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.
- Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Müller A, Vella JP, *et al*. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest* 2001;107(7):909-16.
- Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:821-50.
- WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological reviews*, Bethesda, v. 72, no. 4, p. 1063-1081, oct. 1992.
- Wells, A. D., X. C. Li, T. B. Strom and L. A. Turka (2001). "The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1409): 617-623.
- Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, Sester M. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One*. 2008;3(11):e3634. doi: 10.1371/journal.pone.0003634. Epub 2008 Nov 4.
- Xiao Q, Mandal K, Schett G, Mayr M, Wick G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Xu Q. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Stroke*. 2005 Dec;36(12):2571-6. Epub 2005 Oct 27.
- Young BK, Fogelson JL, François-Bongarçon V, Benson BA, Dalmaso AP. IL-4 and IL-13 induce protection of porcine endothelial cells from killing by human complement and from apoptosis through activation of a phosphatidylinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Immunol*. 2005 Aug 1; 175(3):1903-10.

- Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2022-32. Epub 2006 Jun 8.
- Zanin-Zhorov A, Nussbaum G, Franitza S, Cohen IR, Lider O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J*. 2003 Aug;17(11):1567-9. Epub 2003 Jun 17.
- Zhao Y, Swenson K, Wekerle T, Rodriguez-Barbosa JI, Arn JS, Skykes M. The critical role of mouse CD4⁺ cells in the rejection of highly disparate xenogeneic pig thymus grafts. *Xenotransplantation*. 2000 May; 7(2):129-37
- Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP, Zarek PE, et al. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2163-70.
- Zügel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases." *Clin Microbiol Rev* 12(1): 19-39.

Anexos

Anexo 1. Tabelas dos dados clínicos e demográficos dos sujeitos de pesquisa

Tabela 20. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo TO

Grupo TO	Sexo	Idade *	Origem do enxerto	Doença base	Nº Total Disparidades HLA	nº TX	nº TX IE	TX* Tempo - Anos	Função retardada do enxerto	Indução	RA (Cel / Hum)
Ltx03	M	55	Fal	GMP	3	1	1	27	Não	Não	Não
Ltx10	F	42	VA (irmã)	nd	1	1	1	12	Não	Não	Não
Ltx16	F	48	VA (irmã)	GC	0	1	1	28	Não	Não	Não
Ltx62	M	32	VA	Glomerulonefrite esclerose segmentar focal	3	1	1	17	Não	Não	Não
Ltx90	F	31	VA	nd	0	1	1	11	Não	Não	Não
Ltx91	M	57	VA	Nefroesclerose Hipertensiva	0	1	1	31	Não	Não	Não

TX:transplante; F:feminino; M: Masculino; TO: tolerância operacional, VNA:vivo não aparentado; VA:vivo aparentado; FAL: falecido;Sem informação: Sem inf. NA: não se aplica; Cel: celular; Hum: humoral; Imunoglobulina G;SCD: sem causa definida; GEST. Gestação; HLA: human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano); HD – hemodiálise; DPI: Diálise Peritoneal. * No tempo da coleta

Tabela 21. Histórico clínico dos indivíduos do grupo TO (IS/ Infecções e Comorbidades)

Grupo TO	terapia IS inicial TX	Terapia IS atual	Mudança de terapia no estudo	Comorbidades	Infecções	Creatinina sérica(mg/100ml)	Sorologia CMV
Ltx03	Sem inf.	Sem IS desde 2002	Sem inf.	Hipertensão arterial; obesidade	Não	1,15 (04/11/09)	CMV+
Ltx10	Cya; Aza; Pred	Sem IS desde 22/07/06	20/10/01: tomou Cya / 16/03/03: parou c/ Cya 30/10/01: tomou Pred / 11/06/03: parou Pred 10/06/03 - parou Aza;	Múltiplos abscessos perianal; jan/2004 - Infarto agudo miocardio com angioplastia; 10/03/08 - Abscesso de mama; 10/08/08 - Infarto agudo miocardio; 04/10/08 - Infartou; tem diabetes	Não	0,89	CMV+
Ltx16	Pred; Aza	Sem IS desde 01/03/00	15/04/98: parou Aza; 30/10/98: parou Cya; 30/10/98: parou MMF	HCV e HBV	Não	0,74	CMV+
Ltx62	Pred; Aza; Cya	Sem IS desde 2005. Em 15/09/09, relata ter voltado com IS corretamente	08/05/01: parou Aza; 08/06/01: parou MMF; 02/10/97: parou Pred; 15/09/09: voltou c/ os IS	Recidiva GESF no rim tx	Não	1,71	CMV IgG+
Ltx90	Sem inf.	Sem IS desde 2012	Sem inf.	30/06/92 – Rejeição Aguda; 12/03/98 – Biópsia renal: nefropatia crônica / fibrose e atrofia tubular; Tem Arterite Takayasu ; 02/06/11 – uveíte.Tentou fazer auto transplante, porém não deu certo. 16/05/12 – Má aderência; Não se sabe se é por Herpes ou a doença de Takayasu;	Não	1,4	CMV IgG+
Ltx91	Sem inf.	Sem IS desde 1984	Inicial: Aza: 125mg / Pred: 1ºmês:30mg; 2ºmês: 15mg; 3º- 12ºmês:10mg / Manutenção: Aza: 1ºsno: 125mg / Pred: 1ºano: 10mg	Hipertensão arterial	Não	1,3	CMV IgG+

X:transplante; TO: tolerância operacional, Aza:azatioprina; Cya:ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MPS: micofenolato sódico; Rapa:rapamicina; Tacro:tacrolimus; Pred:prednisona; CMV:citomegalovírus; ITU:infecção do trato intestinal; Basiliximab:anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Daclizumab:anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG:timoglobulina anti-timocitária; IVIG:imunoglobulina intra-venosa; IE: inclusão do estudo; GESF: glomérulo esclerose segmentar focal; NCE: nefropatia crônica do enxerto; Sem inf: sem informação

Tabela 22. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo RC

Grupo RC	Sexo	Idade *	Origem do enxerto	Doença base	Nº Total Disparidades HLA	nº TX	nº TX IE	TX* Tempo - Anos	Função retardada do enxerto	Indução	RA	nº episódios rejeição	RC	Histopatologias
Ltx04	M	51	Fal	GC	6	1	1	9	Sim	Basiliximab	Sim		Sim	NCE Banff II, fibrose focal; BIÓPSIA C4+
Ltx05	M	40	Fal	GC	6	1	1	13	Sim	ATG	Não	0	Sim	NCE grau I - Banff I arteriosclerose hialia BIÓPSIA C4+
Ltx13	F	33	VA (pai)	GC	2	1	1	15	Sim	Não	Sim	nd	Sim	Fez Biópsia da medula – Não tinha células neoplásicas / 06/11/06 - NCE com glomerulopatia do transplante, C4d positivo
Ltx24	M	26	Fal	IS renal SCD	5	1	1	11	Não	Daclizumab	Sim	nd	Sim	NCE Banff I, fibrose focal; atrofia tubular; 12/03/07 – nefropatia crônica do enxerto – Banff Ia / RC mediada por anticorpos BIÓPSIA C4+ 30/05/05 – NCE Grau 1 – Banff I com infiltrado plasmocitário / 08/06/2005, RC Banff I, melhora do quadro plasmocitário
Ltx26	M	55	VNA	NH	5	1	1	9	Não	Daclizumab B	Não	0	Sim	05/07/06 – NCE com C4d positivo, atrofia e fibrose focais com capilarite de capilares peritubulares; anticorpo DAS negativo) / 18/01/07 – C4d a 20%; espessamento da cápsula, glomerulopatia do Tx, esclerose glomerular, nefropatia Banff I) BIÓPSIA C4+
Ltx79	M	50	VNA	GC	3	1	1	13	Não	Basiliximab	Sim	1	Sim	sem inf
Ltx80	M	42	VA	GC	0	2	2	10	Não	Não	Sim	0	Sim	Disfunção crônica do enxerto; glomerulopatia
Ltx87	F	48	VA (mãe)	GC	0	1	1	13	Não	Não	Não	0	Sim	sem inf

TX:transplante; R: Receptor; D: Doador; F:feminino; M: Masculino; RC:rejeição crônica; RA:rejeição aguda; EST: indivíduos com função estável do enxerto; SAU:saudável; VNA:vivo não aparentado; VA:vivo aparentado; FAL: falecido;Sem informação: Sem inf. NA: não se aplica; CeL: celular; Hum: humoral; Imunoglobulina G;SCD: sem causa definida; GEST. Gestação; IGG: HLA: human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano); HD – hemodiálise; DPI: Diálise Peritonial. * No tempo da coleta

Tabela 23. .Histórico clínico dos indivíduos do grupo RC (IS/ Infecções e Comorbidades)

Grupo RC	terapia IS inicial TX	Terapia IS atual	Mudança de terapia no estudo	Comorbidades	Infecções	Creatinina sérica(mg/100ml)	Sorologia CMV
Ltx04	MMF; Pred; Tacro	Aza (100mg) / Tacro (3mg) / Pred (5mg)	04/05/11 = suspensão de MPS (720mg) por Aza (100mg)	Nd	23/04/09 – teve herpes zoster; 03/11 começou a ter diarreia	1,21 / 11/12/13: 1,39 (boa) Sem proteinúria Clearance: 49,53	13/10/05 CMV IgG+
Ltx05	Pred; MMF; Ciclo	26/02/13-Pred (7,5mg) / Ciclo (100mg) / Micofenolato Sódico (1440mg)	16/10/01 – suspensão Micofenolato Sodico / 07/11/05 voltou c/ Micofenolato / Pred (5mg) passou para 7,5mg Micofenolato Sodico (1500mg) passou para 1440mg	08/2013 carcinoma papilífero de células renais (no rim transplantado) / Está fazendo radioablação	HCV; Herpes simples-12/01 - Candidíase genital; Amidalite / 19/03/01 teve CMV / 01/2014 – pneumonia	1,41	IgM negativo - Soro conversão a partir 2001 IgG+
Ltx13	Cya; Aza; Pred	11/12/08 – Pred (7,5mg) / Tacro (8mg) / MPS (720mg)	ATG (tratamento da rejeição) / 15/06/2004 – Suspensão de Aza introdução MMF / 11/12/06 – Suspensão de Ciclos começou c/ Tacro / 2008: Pred (5mg) passou p/ 7,5mg Nada: início, 3m MMF, Pred, Tacro: 6m, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 Pred, Tacro: 7, 8	1999-Condiloma acuminado / 06/04/99 – proteinúria, eletroforese de proteína – paraproteína / 12/07/99 hipergamoglobulinemia / 28/03/2005 – Desenvolveu pseudo tumor cerebral / 04/05/05 – transfusão de sangue - anemia	27/10/98 – infecção por CMV / 12/07/99 – HPV / 29/04/05 – pneumonia / 2008- Herpes simples / 12/01/09 – Infecção urinária (pielonefrite) / 15/05/09 – traquiobronquite + tuberculose / 06/08/09 – pneumonia e várias associações de doenças, como a tuberculose / 10/09/09 – Tuberculose disseminada / 09/11/10 – erisipela	1,64	HbsAg; CMV IgG+
Ltx24	Pred; Tacro; MMF	Pred; MPS; Tacro	Nada: início, 3m MMF, Pred, Tacro: 6m, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 Pred, Tacro: 7, 8	Nd	Amidalite; CMV IgG negativo, a partir de 14/04/10, tornou-se CMV +. / 25/08/2009 – Infecção por H1N1	1,81	CMV IgG negativo no tx / 14/04/10, tornou-se CMV +

X:transplante; RC: rejeição crônica, Aza:azatioprina; Cya:ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MPS: micofenolato sódico; Rapa:rapamicina; Tacro:tacrolimus; Pred:prednisona; CMV:citomegalovírus; ITU:infecção do trato intestinal; Basiliximab:anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Daclizumab:anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG:timoglobulina anti-timocitária; IVIG:imunoglobulina intra-venosa; IE: inclusão do estudo; GESF: glomérulo esclerose segmentar focal; NCE: nefropatia crônica do enxerto; Sem inf: sem informação

Tabela 23 (Continuação). Histórico clínico dos RC (IS/ Infecções e Comorbidades)

Grupo RC	terapia IS inicial TX	Terapia IS atual	Mudança de terapia no estudo	Comorbidades	Infecções	Creatinina sérica(mg/100ml)	Sorologia CMV
Ltx26	Cya; Pred; MMF	09/02/09 – Pred (5mg) / Tacro (3mg) / MPS (1440mg)	26/11/08 – Trocou Ciclo por Tacro; 2008 - Cya (150mg) / 2009 - trocou Cya (150mg) por Tacro (3mg)	30/09/07-Apendicite aguda com choque séptico; insuficiência renal aguda; cutâneo/ pancreatite aguda / 29/04/09 – cirurgia de vesícula (colecistectomia)	27/02/08-Herpes zoster / pancreatite aguda / 10/01/09 – Teve pneumonia /	1,61	CMV+
Ltx79	sem inf	Traco; MMF; Pred	19/05/11 – Conversão FK para everolimus 5/11- Suspensão de traco 25/06/12 Everolimo; 03/06/2013 introdução de traco	Glomerulite aguda ; Disfunção crônica do enxerto; GNMP tipo1; 01/16 Infecção de pele 03/04 febre e sudorese, Hipercolesterolemia pós EVR; G- nefrectomia bilateral; HAS; anastomose art-polar; inflamação epigástrica	2011 Polioma vírus ; Herps zoster cutânea; 21/03tuberculose	1,4	CMV+
Ltx80	MMF	sem inf	16/10/13: suspensão de Rapa e introdução de MMF	Disfunção crônica do enxerto Nefropatia crônica do TX Glomerulite; Obesidade; HAS ; Deslocamento de retina; Decoy Cells; ptíriase vesicolor e pericapilarite	Pneumonia; Choque séptico; Polioma vírus; Herpes Zoster	1,3	CMV+
Ltx87	sem inf	sem inf	MMF, Tacro	traqueobronquite, litíase renal bilateral, hipertensão severa	CMV , EBV, rubéola, hepatite A; pneumonia; litíase renal bilateral; infecção do trato urinário	1,2	CMV+

TX:transplante; RC: rejeição crônica, Aza:azatioprina; Cya:ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MPS: micofenolato sódico; Rapa:rapamicina; Tacro:tacrolimus; Pred:prednisona; CMV:citomegalovírus; ITU:infecção do trato intestinal; Basiliximab:anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Daclizumab:anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG:timoglobulina anti-timocitária; IVIG:imunoglobulina intra-venosa; IE: inclusão do estudo; GESF: glomérulo esclerose segmentar focal; NCE: nefropatia crônica do enxerto; Sem inf: sem informação

Tabela 24. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do grupo EST

Grupo EST	Sexo	Idade *	Origem do enxerto	Doença base	Nº Total Disparidades HLA	nº TX	nº TX IE	TX* Tempo em anos	Indução	Função retardada do enxerto	TI	RA
Ltx12	M	55	Fal	NH	6	na	18	1	7	Não	Daclizumab	Não
Ltx14	F	44	Fal	sem inf	3	2	24 (início: 15/01/04)	1	7	Não	Basilixmab	Não
Ltx19	F	30	Fal	Nefrite lúpica	3	0	14	1	7	Não	Daclizumab	Sim
Ltx22	F	34	Fal	GC	3	2	16	1	6	Não	Basilixmab	Não
Ltx31	M	57	VA (irmã)	IS renal a esclerocer	3	na	26 (início: 02/01/01)	1	10	Não	Daclizumab	Sim
Ltx33	F	45	Fal	Esclerose tuberosa (angiomiolipoma+ doença cística adquirida)	5	1	58 (início: 03/11/00)	10	8	Não	Daclizumab	Não
Ltx71	F	24	Fal	GC	2	0	9	13	4	Não	Basiliximab/D; Aclizumab	Não

TX:transplante; R: Receptor; D: Doador; F:feminino; M: Masculino; EST:estável; RA:rejeição aguda; EST: indivíduos com função estável do enxerto; SAU:saudável; VNA:vivo não aparentado; VA:vivo aparentado; FAL: falecido;Sem informação: Sem inf. NA: não se aplica; CeL: celular; Hum: humoral; Imunoglobulina G;SCD: sem causa definida; GEST. Gestação; IGG: HLA: human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano); HD – hemodiálise; DPI: Diálise Peritonal. * No tempo da coleta

Tabela 25. Histórico clínico dos indivíduos do grupo EST(IS/ Infecções e Comorbidades)

Grupo EST	terapia IS inicial TX	Terapia IS atual	Mudança de terapia no estudo	Comorbidades	Infecções	Creatinina sérica(mg/100ml)	Sorologia CMV
Ltx11	Pred; Tacro; MMF	12/03/13 – Pred (10mg) / Tacro (12mg) / MPS (1440mg)	19/02/08 – Troca do MMF pelo MPS– doses equivalentes	22/03/04 e 28/10/04: ITU	CMV IgG positiva / HbsAg	1.51	CMV IgG+
Ltx12	Pred; Tacro; MPS	Pred; MPS; Tacro	sem inf	nd	14/07/06-Candidíase esofágica; 04/07/08- Infecções vias aéreas superior; CMV	1.15	CMV+
Ltx14	Pred; Tacro; MMF	12/03/13 – Pred (5mg)/ Tacro(5mg) / MPS (1440mg)	11/12/08 – de MMF passou a tomar MPS / 2008 MPS (1080mg) passou para 1440 mg / 2008 Tacro (4mg) passou para 5mg	Sem intercorrências	Sem intercorrências	0.88	CMV IgG+
Ltx19	Pred; Tacro; MPS	Pred; MMF; Tacro	sem inf	Traqueibronquite; sinusite; ITU	Herpes	0.8	CMV+

X:transplante; EST: estável, Aza:azatioprina; Cya:ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MPS: micofenolato sódico; Rapa:rapamicina; Tacro:tacrolimus; Pred:prednisona; CMV:citomegalovírus; ITU:infecção do trato intestinal; Basiliximab:anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Daclizumab:anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG:timoglobulina anti-timocitária; IVIG:imunoglobulina intra-venosa; IE: inclusão do estudo; GESF: glomérulo esclerose segmentar focal; NCE: nefropatia crônica do enxerto; Sem inf: sem informação

Tabela 25 (continuação). Histórico clínico dos RC (IS/ Infecções e Comorbidades)

Grupo EST	terapia IS inicial TX	Terapia IS atual	Mudança de terapia no estudo	Comorbidades	Infecções	Creatinina sérica(mg/100ml)	Sorologia CMV
Ltx22	Pred; Tacro; MMF	Pred; MPS; Tacro	sem inf	nd	Sem intercorrências	1,04	CMV+
Ltx31				30/04/08-Adenocarcinoma de próstata Refluxo da urina Grau 4 do rim transplantado 16/03/06 – Miopatia 30/01/06 – biópsia com alterações discretas que não podem ser classificadas para Banff. 21/02/08 – Trocou o Mofetil micofenolato pelo Sódico 30/04/08 –Adeno carcinoma de Próstata (classificação Gleason 6) 19/12/08 – Lesão óssea em vértebras – provavelmente metástase 23/12/08 – foi feito orquiectomia Em 2008, quando foram realizadas as coletas, o paciente tinha tumor com metástase óssea Teve adenocarcinoma de próstata	Candidíase	1.28	CMV+
Ltx33	Pred; Tacro; MPS	Pred; MMF; Tacro	sem inf	Hipotireoidismo; sem intercorrências importantes	Sem intercorrências	0.85	CMV+
Ltx71	Pred; Tacro; MPS	MPS; Tacro; Pred	sem inf	02/04/2007-hipertensão arterial sistêmica;	22/08/08 – 10/10/08 era IgG negativo para CMV 19/01/11 – Ficou IgG positiva, teve citomegalia (infecção por citomegalovírus)	0.79	CMV IgG+

X:transplante; EST: estável, Aza:azatioprina; Cya:ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MPS: micofenolato sódico; Rapa:rapamicina; Tacro:tacrolimus; Pred:prednisona; CMV:citomegalovírus; ITU:infecção do trato intestinal; Basiliximab:anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25; Daclizumab:anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG:timoglobulina anti-timocitária; IVIG:imunoglobulina intra-venosa; IE: inclusão do estudo; GESF: glomérulo esclerose segmentar focal; NCE: nefropatia crônica do enxerto; Sem inf: sem informação

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

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
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “*Estudo da Resposta Imune Celular e Humoral na Terapia Celular para Tratamento de Pacientes com Doença Isquêmica Crônica do Coração*”.

PESQUISADOR: Dra. Verônica Coelho

CARGO/FUNÇÃO: Médica pesquisadora do Laboratório de Imunologia do InCor-HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N°45907

PESQUISADOR: Dr. Luis Henrique Wolff Gowdak

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e Unidade Clínica de Coronariopatia, InCor, HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 72627

PESQUISADOR: Dr. Isolmar Schetttert

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, InCor, HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 77418

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Neste projeto de pesquisa, estudaremos algumas modificações no sistema de defesa (sistema imune) que possam ocorrer devido ao tratamento da doença isquêmica crônica do coração utilizando células tronco. O tratamento com células tronco é feito com uma infusão no coração de células tronco próprias obtidas da medula óssea durante a cirurgia para colocação de uma “ponte” no coração (revascularização). Estas células podem ajudar na melhora da função do coração. Alguns centros médicos utilizam células tronco para o tratamento de várias doenças cardíacas. Apesar de observarmos uma melhora da doença, não é conhecido direito como funciona este tratamento. Com este projeto de pesquisa pretendemos contribuir para a compreensão destes

mecanismos e com isso poder oferecer um melhor tratamento para os pacientes. Neste projeto serão incluídos três diferentes grupos de estudo, sendo que o Grupo 1 será composto por portadores de doença isquêmica crônica do coração que receberão as células tronco da medula óssea durante a cirurgia de revascularização; o Grupo 2 será composto de portadores de doença isquêmica crônica do coração que não receberão tratamento com células tronco e serão mantidos com o tratamento padrão para a cardiopatia, sendo assim utilizados como grupo controle para o estudo. E por último o Grupo 3 composto por indivíduos sadios que serão utilizados também como controle para comparação dos resultados e não receberão nenhum tipo de tratamento. O Sr.(a) está sendo convidado a participar deste trabalho de pesquisa por ser portador de doença isquêmica crônica do coração e por ter indicação de cirurgia de revascularização (“ponte”) juntamente com infusão ou não de células tronco, logo se enquadraria no Grupo 1 ou Grupo 2, respectivamente do nosso estudo. Para este estudo precisamos coletar o seu sangue para obter células chamadas linfócitos e também soro. Com esse material faremos nossos estudos, analisando anticorpos e substâncias produzidas pelas células. Além disto, usaremos uma pequena quantidade do seu sangue de medula óssea (já coletada para a cirurgia) para cultivarmos outro tipo de células tronco chamadas células mesenquimais e estudarmos a capacidade destas células de inibir a resposta imunológica de outros tipos celulares. Caso aceite participar deste estudo, o Sr.(a) deverá assinar este documento concordando que sejam colhidos 3 a 5 ml de medula óssea durante a cirurgia e também 35 ml de sangue de uma veia do seu braço. A coleta de sangue da veia do seu braço será realizada no momento da sua inclusão no protocolo de estudo e depois após 1, 3, 6 e 12 meses. O desconforto durante a coleta de sangue da veia do seu braço será somente o de uma picada da agulha e a coleta do sangue de medula óssea será realizada quando o Sr.(a) estiver sob efeito da anestesia durante a cirurgia, evitando assim qualquer tipo de dor. Todas as coletas serão previamente agendadas no momento do seu ingresso na pesquisa e estão vinculadas ao protocolo de pesquisa ““Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias – Módulo: Doença Isquêmica Crônica do Coração”, ao qual o Sr.(a) já é participante. Assim, suas coletas de sangue serão realizadas junto com os retornos de consulta já agendados com a Unidade Clínica de Coronariopatias Crônicas, InCor. É importante lembrar que o Sr.(a) não é obrigado a participar desta pesquisa e que, se não quiser participar, nada afetará o seu tratamento e acompanhamento neste hospital. Além disto, o Sr.(a) poderá sair deste protocolo de estudo a qualquer momento e isto também não vai trazer nenhum prejuízo para o seu tratamento. O Sr.(a) vai receber todos os tratamentos disponíveis e necessários para o seu caso. Também é importante dizer que esta

pesquisa não garante qualquer benefício direto para o seu tratamento. No entanto, esse estudo poderá ajudar no tratamento de outros pacientes no futuro.

A principal investigadora é a Dra Verônica Coelho, médica pesquisadora do Instituto do Coração – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que pode ser encontrada no endereço: Laboratório de Imunologia – InCor - Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44, bloco II 9andar. São Paulo, SP. Telefone(s) 11-3069-5905.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a você a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgado nenhuma identificação. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Essas células serão utilizadas em experimentos exclusivamente feitos em laboratório. No entanto, elas poderão ser armazenadas e utilizadas futuramente em outros experimentos também feitos no laboratório, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o “*Estudo da Resposta Imune Celular e Humoral na Terapia Celular para Tratamento de Pacientes com Doença Isquêmica Crônica do Coração*”

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o meu médico sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a informações sobre a pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 3. Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq

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

2731/05/151

Nº Protocolo: 1097/05

Título: "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 Responsável: Verônica Coelho

Pesquisador Executante: a mesma

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 11/12/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Cartas datadas de 10.07.13 – Solicitação de prorrogação do estudo para dezembro/2018 + Inclusão de Priscila Carmona como executante do subprojeto "Perfil da resposta imunológica celular na tolerância operacional frente a autoantígenos, aloantígenos e antígenos de microrganismo" + Inclusão de Yordanka Medina Armenteros como executante do subprojeto "Tolerância operacional no transplante renal humano – a via de sinalização mTOR faz parte dos caminhos imunorreguladores?" + Relatório parcial da pesquisa

CAPPesq, 11 de Dezembro de 2013

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

08/01/14

Letícia

Alfredo José Mansur

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR

Vice-Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq