UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Flávia Porto Pelá

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientada: Flávia Porto Pelá
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão Corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutora em Ciências no dia 24 de abril de 2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

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

Pelá, Flávia Porto.

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune. Ribeirão Preto, 2017.

122p.; 30 cm.

Tese Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Palavras-Chaves: 1. Diabetes *mellitus* tipo 1; 2. Galectina-1. 3. Antígeno Leucocitário Humano – G. 4. Imunoregulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Flávia Porto Pelá

Título do Trabalho: Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Tese Doutorado apresentada ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicado à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

"Improve, Adapt, Overcome"

Marine Corps

"Tudo o que pode fazer ou sonha que pode, comece.

A audácia contém gênio, poder e magia"

W.H.Murray

Dedicatória

“Aos meus pais, Selma e Luiz (in memoriam) por terem se dedicado,cada um ao seu modo, à minha vida e à de meus irmãos, nos permitindo acreditar, diariamente, na concretização de projetos audaciosos, sonhos “impossíveis”, em aventuras destemidas e, principalmente, no ser humano e no amor. Ainda dedico o presente trabalho ao meu filho Guilherme, meu melhor presente e maior inspiração.”

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, pela orientação do desenvolvimento do presente trabalho e pela dedicação e dom em nos ensinar. Obrigada pelos incentivos e discussões científicas.

Às colaboradoras Profa. Dra. Maria Cristina Nonato, Prof. Dr. Norberto Pepporini Lopes, Prof. Dr. José Cesár Rosa, Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz, Dra. Daniela Carlos pela disponibilização dos recursos laboratoriais para desenvolvimento de parte deste trabalho e colaboração acadêmico-científico. Muito obrigada!

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por contribuir com a minha formação profissional.

Aos Pós-Doutores Camillo Del Cistia, Ibrahim Abiodoun, Joane Rustiguel, Juliana Doblas Massaro, Lilian Cataldi Rodrigues, Luana Soares, Thalita Riul, muito obrigada por toda colaboração científica.

Aos colegas do grupo de Glicoimunobiologia que estiveram comigo durante esses quatro anos, contribuindo direta ou indiretamente na realização do presente trabalho.

Aos queridos, Wânia Tavares, Luciana Ambrósio e Luiz Chaim pelos deliciosos quitutes que nos espairecem.

Aos colegas do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sempre dispostos a me auxiliaram nos experimentos, principalmente, daqueles emergenciais.

À minha mãe, Selma Maitino Porto, sempre disposta a acalentar, ensinar e, principalmente, a me amar incondicionalmente. Gratidão eterna!

Ao meu pai, Luiz Alberto Pelá, cujo silêncio vem me ensinando a não procrastinar, seja nos projetos profissionais e pessoais, seja na demonstração dos sentimentos.

Ao meu maior e melhor amor, meu filho, Guilherme Porto Pelá Amâncio, cujo sorriso me alegra o coração, fortalece a alma e me inspira aos meus melhores sonhos.

Aos meus irmãos, Daniel Porto Pelá e Luiz Fernando Porto Pelá, pelo companheirismo e amizade de todas as horas.

Ao meu padrasto, Valdir Silva Abrão, e, ao amigo, Marcelo Puga, ambos tão providenciais em seus ensinamentos e palavras.

Aos meus amigos queridos que próximos, distantes, daqui ou dali, sempre são tão especiais e ímpares na minha vida, sejam com palavras, abraços, cafés, brigadeiros... Cada um ao seu modo complementando a diversão da vida.

Especialmente, agradeço a Deus pela vida; pelas bênçãos diárias que provêem paz e esperança, principalmente, nos momentos em que me acho insuficiente para solucionar os contratempos que a vida impõe; pelas oportunidades e desafios que me fortalecem, qualificam e me tornam um ser humano melhor.

RESUMO

Pelá, F. P. **Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune.** 2017. 122 f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O diabetes *mellitus* tipo 1A (DM1) é uma doença crônica caracterizada pela destruição imunológica das células β do pâncreas e pela incapacidade de seu portador produzir insulina. Nas últimas décadas foram descritos vários aspectos sobre a fisiopatologia do DM1 e identificado um aumento de sua incidência mundial. Entretanto, na literatura há lacunas a serem respondidas envolvendo a etiologia e a imunopatologia desta doença. No presente trabalho, foi analisado o impacto de duas moléculas endógenas imunoregulatórias, Antígeno Leucocitário Humano-G (HLA-G) e Galectina-1 (GAL-1), no DM1 humano e experimental. Para tanto, as formas recombinantes de HLA-G (-G5 e -G6) e seus respectivos anticorpos foram produzidos e/ou bioquimicamente caracterizados. A partir de amostras de pacientes diagnosticados com DM1 ou de indivíduos controle foi feita uma análise comparativa envolvendo o perfil de expressão do HLA-G e da GAL-1 e a identificação de microRNAs (miRNAs) associados a estas duas moléculas. Camundongos $Lgals^{-/-}$ ou não para o gene da GAL-1 foram tratados com estreptozotocina (STZ) para indução do DM1 experimental. As duas formas recombinantes do HLA-G foram produzidas, mas apenas o HLA-G6 foi caracterizado como uma solução polidispersa contendo um componente majoritário (99,2%) com massa molecular de 23.603,766 Da, raio hidrodinâmico de 6,0 ± 2,0 nm e imunoreatividade para diferentes anticorpos anti-HLA-G comerciais ou produzidos no laboratório. Os níveis transcricional e proteico do HLA-G e da GAL-1 não foram diferentes entre os grupos de indivíduos estudados. A análise comparativa de miRNAs mostrou que a elevada indução do miRNA modulador negativo da expressão do HLA-G (hsa-miR-16-5p) nos controles em relação aos pacientes foi a única associação robusta com a patogenia do DM1. Curiosamente, os animais selvagens apresentam maior suscetilibilidade à indução de DM1 por STZ, uma vez que os indicadores desta doença como o grau de insulite, a taxa de migração de linfócitos T CD4 e T CD8 para os linfonodos pancreáticos, o nível de redução de insulina no pâncreas e a taxa glicêmica estavam aumentados nesses animais em relação aos nocautes para GAL-1. Finalmente, este conjunto de resultados sugere que possa ocorrer uma regulação positiva da expressão de transcritos do HLA-G em pacientes com DM1 e que a presença de GAL-1 endógena pode favorecer o DM1 experimental. Estes dados abrem novas perspectivas para o melhor entendimento da imunopatologia do DM-1.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 1, Galectina-1, Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G), Imunoregulação.

ABSTRACT

Pelá, F. P. **Galectin-1 and Human Leukocyte Antigen-G: from tool** Pelá, F. P. **Study of the immunoregulatory molecules Galectin-1 and Human Leukocyte Antigen-G: from tool development to impact on autoimmune diabetes.** 2017. 122 p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Diabetes Mellitus type 1A (DM1) is a chronic disease characterized by the immune destruction of pancreatic beta cells and by the consequent inability of its bearer to produce insulin. For the last decades, several aspects of the pathophysiology of DM1 were described and an increase on its worldwide incidence has been identified.Nevertheless, there are gaps in the literature related to aspects of its etiology and immunopathology to be filled.In the present work, the impact of two endogenous immunoregulatory molecules, Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) and Galectin-1 (GAL-1), was analyzed on human and experimental DM1.To do so, the recombinant forms of HLA-G (-G5 and -G6) and its respective antibodies were produced and/or biochemically characterized. A comparative analysis involving the expression profile of HLA-G and GAL-1 and the identification of microRNAs (miRNAs) associated with these two molecules was made from samples of patients diagnosed with DM1, or control subjects. Mice deficient or not for the GAL-1 gene were treated with streptozotocin (STZ) for the induction of experimental DM1.Both recombinant forms of HLA-G were produced, but only HLA-G6 was characterized as a polydisperse solution containing a major component (99.2%), with molecular mass of 23,603,766 Da, hydrodynamic radius of 6.0 ± 2.0 nm, and immunoreactivity for different commercial or lab produced anti-HLA-G antibodies HLA-G and GAL-1. The transcriptional and protein levels were not different between the groups of subjects studied. High induction of the negative modulator miRNA expression of HLA-G (hsa-miR-16-5p) in the controls compared to the patients was the only robust association found with the pathogenesis of DM1.Interestingly, wild type animals presented more susceptibility to the induction of DM1 by STZ, once the indicators of this disease such as the degree of insulin, the migration rate of CD4 T and CD8 T lymphocytes to pancreatic lymph nodes, the level of insulin reduction in the pancreas and the glycemic rate were increased in wild type mice (Lgals-$1^{+/+}$) when compared to GAL-1-knock out mice (Lgals-$1^{-/-}$). Finally, this set of results suggests that a positive regulation of the expression of HLA-G transcripts may occur in patients with DM1 and that the presence of endogenous GAL-1 may favor the experimental DM1. These data open new perspectives for a better understanding of the immunopathology of DM-1.

Keywords: Type 1 Diabetes *mellitus*, Galectin-1, Human Leukocyte Antigen - G (HLA-G), Immunoregulation.

RESUMEN

Pelá. F. P. **Estudio de las moléculas reguladoras inmunes galectina-1 y el antígeno leucocitario humano-G: la construcción de herramientas e impacto sobre la diabetes autoinmune.** 2017. 122f. Tesis. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Diabetes mellitus tipo 1A (DM1) es una enfermedad crónica que se caracteriza por la destrucción inmune de las células beta del páncreas y la incapacidad del paciente para producir insulina. En las últimas décadas se produjo un aumento en el conocimiento de la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1 y un aumento significativo en la incidencia global de esta enfermedad. Sin embargo, en la literatura existen preguntas que deben ser respondidas acerca de esta enfermedad que implica aspectos de su etiología y la inmunopatología. Con este fin, las formas recombinantes de HLA-G (-G5 y -G6) y sus respectivos anticuerpos se produjeron y se caracterizaron bioquímicamente. A partir de muestras de pacientes diagnosticados con diabetes tipo 1 y sujetos sanos se realizó un análisis comparativo de los perfiles de expresión de HLA-G y Gal-1 y la identificación de los microARN (miRNA) asociados con estas dos moléculas. Los ratones con o sin déficit de Gal-1 fueron tratados con estreptozotocina (STZ) para inducir DM1 experimental. Las dos formas recombinantes de HLA-G se produjeron, pero sólo el HLA-G6 se caracterizó como una solución polidispersa, que comprende un componente principal (99,2%) con un masa molecular de 23,603.766 Da, radio hidrodinámico de 6,0 ± 2,0 nm e inmunorreactividad para diferentes anticuerpos anti-HLA-G comerciales o producidos en el laboratorio. Los niveles de transcripción y proteínas de HLA-G y LAG-1 no difirieron entre los grupos de individuos estudiados. El análisis comparativo de miRNAs mostró como la única asociación sólida con la patogénesis de la DM1 una alta inducción de los genes miARN moduladores negativos de la expresión de HLA-G (HSA-mir-16-5p) en los sujetos controles al compararse con los pacientes. Curiosamente, animales salvajes fueron más susceptibles a la inducción de la diabetes por STZ tipo 1. Los indicadores de la enfermedad tales como el grado de insulitis, la tasa de migración de células T CD4 + y CD8 para los ganglios linfáticos pancreáticos, la reducción de la insulina del tejido y los niveles de glucosa aumentaron en los animales salvajes al compararse con los animales con déficit de GAL-1. Por último, este conjunto de resultados sugiere que existe un incremento en la expresión de HLA-G. Transcripciones en pacientes con DM1 y la presencia de GAL-1 endógeno pueden promover la DM1 experimental. Estos datos llevan a nuevas perspectivas para una mejor comprensión de la inmunopatología de DM-1.

Palabras llave: Diabetes mellitus tipo 1, Galectina-1, Antígeno Leucocitario Humano - G (HLA-G), Inmunorregulación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O desequilíbrio do sistema imunológico é crucial para o desenvolvimento do DM1. A figura ilustra fatores responsáveis pela regulação da resposta imunológica evidenciando elementos que contribuiem para o aumento da susceptíbilidade ao DM1. O resultado é o descontrole dos mecanismos da tolerância central e periférica que associado a fatores ambientais estimulam o aparecimento desta patologia. Os principais tipos celulares envolvidos na resposta imunológica do DM1 são listados nos tópicos imunidade e regulação e, estão envidos na regulação das citocinas e proteínas. 4

Figura 2: Funções Imunorregulatórias de Gal-1 frente a diferentes leucócitos. 11

Figura 3: Esquema do locus gênico do HLA-G e das suas isoformas proteicas. A tradução do gene do HLA-G promove, por processamento alternativo de RNAm, diferentes isoformas proteicas (-G1 a -G7) com distintas caractarísticas bioquímicas/estruturais como associação ou não (formas solúveis) com a membrana celular, interação não-covalente com a proteína β2-microglobulinas, processamento proteolítico e oligomerização. 14

Figura 4: Estratégia de inserção da proteína SUMO ao vetor de expressão pET28a-c(+). A) Região de clonagem múltipla do vetor pET28a-c(+). B) Representação esquemática da construção do vetor pET28a(+)-SUMO. 20

Figura 5: Obtenção e caracterização da proteína recombinante rhGST-HLA-G5. A) Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhGST_HLA-G5. MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem transformação com o vetor pGEX-6p2, 2) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG 3) Fração solúvel do extrato proteico bacteriano, sobrenandante, com indução IPTG, 4) Fração insolúvel do extrato proteico bacteriano, botão proteico,com indução IPTG 5) Corpo de Inclusão recuperado e solubilizado com 8mM uréia (64kDa), 6,7 e 8) Amostra ultrafiltrada em amicon cut off 50kDa (64kDa). B) Caracterização imunoquímica da proteína rhGST-HLA-G5 com anticorpor comercial MEM-G1 reativo a cadeia pesada do HLA-G desnaturado. 48

Figura 6: Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6. Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhHLA-G6 MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG, 2) Extrato proteico bacteriano induzido com IPTG, 3) Sobrenadante do extrato bacteriano induzido, 4) Botão proteico do extrato bacteriano induzido, 5) Corpo de inclusão desnaturado, 6) Proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6 eluida de HisTrap FF, 7) rhHLA-G6 purificada. 50

Figura 7: Determinação da massa molecular de rhHLA-G6 por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.....51

Figura 8: Imunodetecção de rhHLA-G6, nativo ou desnaturado, reativos aos anticorpos comerciais MEM-G1 e MEM-G9. 52

Figura 9: Caracterização da reatividade dos soros imunes anti-HLA-G. A) Ensaio de Western Blotting para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de HLA-G5 e HLA-G6, B) Ensaio de Slot Blotting para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5. 53

Figura 10: Caracterização da reatividade dos anticorpos IgY anti-HLA-G e IgY anti-Gal-1. A) Ensaio de Slot Blotting para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5. B) Ensaio de Western Blotting para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de Ga-1. 54

Figura 11: Caracterização da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. A) Ensaio de imunodetecção por ELISA indireto seguido do teste estatístico One-Way Anova para identificação dos potenciais hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. B) Expansão da cultura celular do hibridoma 4H12 após 15 dias de seleção em meio HAT observado em microscopia de contraste de fase em objetiva 40X. C) Ensaio de Slot Blotting para avaliação da reatividade do pool de alíquotas do sobrenadante de cultura dos hibridomas 4H12 e 3F6 nas amostras 1) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS sem indução ao IPTG 2) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS expressando rhGST-HLA-G5 3) rhGST-HLA-G5 4) rhGST-HLA-G6 e 5) rhHLA-G5.....55

Figura 12: Perfil da expressão relativa dos transcritos gênicos HLA-G (A) e LGALS-1 (B). Representação da Expressão Relativa representativo da média dos valores de 2-ΔΔCt. (Valores de expressão relativa expressos como fold change em relação aos valores do grupo controle de valor 1). O teste de Mann Whitney foi aplicado.....56

Figura 13: Análise comparativa entre os miRNAs identificados pelo sequenciamento de nova geração (NGS) no contexto biológico do DM1 e os miRNAs preditos e/ou validados para os transcritos gênicos de HLA-G, LGALS-1, comuns a ambos e validados para o DM1 nos bancos de dados. A) Identificação de 1021 miRNAs alvos para o HLA-G. B) Identificação de 886 miRNAs alvos para o LGALS-1. C) Identificação de 21 miRNAs alvos comuns para o HLA-G e LGALS-1. D) Ausência de identificação para o DM1.....57

Figura 14: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito HLA-G contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 59

Figura 15: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito LGALS-1 no contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística

foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 63

Figura 16: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para os transcritos HLA-G e LGALS-1 no contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 66

Figura 17: Níveis proteicos de HLA-G (A) e GAL-1 (B) em plasma de pacientes DM1 e indivíduos controles. 67

Figura 18: Galectina-1 endógena favorece o desencadeamento do DM1 induzido quimicamente. A) Taxa de incidência do DM1 nos animais selvagens (Lgals-1+/+) e nocautes para GAL-1 (Lgals-1-/-) tratados com STZ (40mg/Kg do animal). B) Registro do nível glicêmico dos animais não tratados no 0, 7° e 15°dia; C) Nível glicêmico dos animais não tratados no 15° dia; D) Registro do nível glicêmico dos animais tratados no 0, 7° e 15°dia; E) Nível glicêmico dos animais tratados no 15° dia. O STZ foi diluído em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4.5) o qual foi indicado como veículo (V). 69

Figura 19: Análise da insulite e da taxa de produção insulina no pâncreas de animais tratados ou não com STZ. A) Análise histopatológica de tecido pancreático de animais selvagens (Lgals-1+/+) ou nocautes para o gene da GAL-1 tratados ou não com STZ. A detecção de insulina pancreática foi feita com anticorpo anti-insulina como descrito na seção de materiais e métodos. B) Análise semi-quantitativa da presença ou ausência de insulite nas ilhotas pancreáticas dos animais ensaiados. Ausência de insulite foi indicada por zero, a presença de leucócitos ao redor das ilhotas com o valor um e a presença de leucóticos no interior das ilhotas com o valor 2. 71

Figura 20: Perfil imunofenotípico de células dos linfonodos pancreáticos de animais deficientes ou não de galectina-1, no modelo do DM1. Os leucócitos dos linfonodos pancreáticos foram isolados e submetidos à marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3, antiCD-4 e ant-CD8, como indicado na seção de materiais e métodos. A imunofenotipagem foi realizada com auxílio de um citometro de fluxo (FACSCanto II - BDBioscience, New Jersey, EUA) e do software BD FACSCANTO CLINICAL (BDBioscience, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de positividade para os marcadores que caracterizam os leucócitos em linfócitos T CD4 ou T CD8. 72

Figura 21: Translocação bacteriana do ambiente gastro-intestinal para os linfonodos pancreáticos nos animais submetidos ao DM1 experimental. Amostras de suspensões celulares dos linfonodos pancreáticos dos animais selvagens (Lgasl-1+/+) ou nocautes (Lgasl-1-/-) previamente tratados com STZ ou tampão citrato de sódio (0.01M - pH 4,5 – veículo, V) foram transferidas para o meio ágar BHI e incubadas por 48 horas a 37°C para determinação de suas cargas bacterianas. A quantificação desta carga foi feita pela determinação de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de primers desenhados para estratégia de clonagem em sítios de restrição BamHI e XhoI. 21

Tabela 2: Sequências peptídicas resultantes da análise dos digestos trípticos em espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS.....47

Tabela 3: Lista dos digestos trípticos resultantes da caracterização da proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6. 49

Tabela 4: Análise do estado estrutural da proteína rhHLA-G6 em ensaio de dinâmica de dispersão de luz. 50

Tabela 5: Identificação dos miRNAs alvos para HLA-G comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de reads pvalue<0,01. 58

Tabela 6: Identificação dos miRNAs alvos para LGALS-1 comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de reads, pvalue<0,01. 61

Tabela 7: Identificação dos miRNAs alvos comuns para HLA-G e LGALS-1 comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados. 64

Tabela 8: Análise da informação genética de HLA-G e LGALS-1 no DM1. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - grau Celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micromolar

3'-UTR - *3'*- não traduzida

5' UTR – 5' não traduzida

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

ADA – Associação Americana de Diabetes

CD - Células dendríticas

CRD – Dominío de Reconhecimento de Carboidrato

CTLA4 - Antígeno 4 Associado com Linfócito T Citotóxico

CPS-hUCMS - Sangue de Cordão Umbilical envolvidas em microcápsulas imunes

DC-Gal-1 - Células dendríticas transgênicas para o gene da Gal-1

DM - Diabetes *mellitus*

DM1-1A- Diabetes *mellitus tipo 1* A

DM1-1B - Diabetes *mellitus tipo 1* B

DM2- Diabetes *mellitus* tipo 2

GAD-65- Ácido glutâmico decarboxilase

Gal-1 - Galectina-1

GWAS- Estudos de associação genômica

HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano – G

IA-2 - Insulinoma associada

IDDM1- *loci* Diabetes mellitus insulino-dependente 1

IDDM2 – *loci* Diabetes mellitus insulino-dependente 2

IFIH1 - Interferon induzido com o domínio C da helicase 1

IGF2 - Fator de crescimento semelhante à insulina II

INS- Insulina

IFN-γ - Interferon γ

IL-1β - Interleucina-1β

IL-2 - Interleucina-2

IL2RA - Receptor de Interleucina 2, alfa

IPTG- Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo

ITIM - Motivos intracelulares inibitórios

LADA - Diabetes autoimune latente de adulto

LGALS-1 - Ligação de galactósido de Lectina, solúvel, 1

LIR-1/ILT2 - receptores de leucócitos tipo imunoglobulina 1

LIR-2/ILT4 - receptores de leucócitos tipo imunoglobulina *2* ou ILT4

Mody - Diabetes da maturidade com início no jovem

MHC – Complexo Principal da Histocompatibilidade

NK- Células exterminadoras naturais

NOD – Diabético não obeso

PTPN22 - Proteína Tirosina Fosfatase não Receptora Tipo 22

ST3Gal1 - Glicosilação α2-3 sialiltransferases

SUS - Sistema Único de Saúde Brasileiro

SNP – Polimorfismo de base única

Treg - Células T regulatórias

TH - Tirosina Hidrolase

TNF-α - Fator de necrose tumoral

VNTR-INS - Número variável de cópias em *tandem* – insulina

ZnT8 - *Zinc transporter 8*

gL: LINE-1 Retrotransposon no promotor HLA-G

LCR: *Locus* de controle

CRE: Elemento de resposta do cAMP

RRE: Elemento de resposta do Ras

ISRE: Elemento de resposta estimulados por interferon

GAS: Sítio ativado por interferon-gama

HSE: Elemento de resposta ao choque térmico

HRE: Elemento de resposta a hipóxia

PRE: Elemento de resposta a progesterona

Enhancer A: Sitios de ligação NF-B acoplados a ISRE

SUMÁRIO

RESUMO ix
ABSTRACT x
RESUMEN xi
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE TABELAS xv
LISTA DE ABREVIATURAS xvi
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Aspectos gerais do diabetes mellitus 1
1.2. Diabetes mellitus tipo 1: uma doença autoimune. 3
1.3. Galectina-1: Estrutura e Funções. 9
1.4. Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G): Estrutura e Funções. 12
1.5. As moléculas imunorregulatórias (HLA-G e Galectina-1) e a doença autoimune DM1. 15
2. OBJETIVOS 18
2.1. Geral 18
2.2. Específicos 18
3. MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1. Desenvolvimento de ferramentas técnico-científicas: Proteínas Recombinantes e Anticorpos 19
3.1.1. Produção de proteínas recombinantes HLA-G5 e HLA-G6 19
3.1.2. Clonagem Molecular 19
3.1.2.1. Vetor de clonagem 19
3.1.3. Expressão proteica de HLA-G5 e HLA-G6 em sistema procarioto 22
3.1.4. Isolamento e solubilização dos corpos de inclusão. 24
3.1.5. Purificação e refolding da proteína recombinante rhHLA-G6. 26
3.1.6. Caracterização Bioquímica e Imunoquímicas das proteínas recombinantes humanas HLA-G5 e HLA-G6. 27
3.2. Produção de anticorpos anti-HLA-G e anti-GAL-1 31
3.2.1. Animais 31
3.2.2. Obtenção de soro imune anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6. 31
3.2.3. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6. 32
3.2.4. Obtenção de anticorpos policlonais IgY anti-HLA-G5, anti-HLA-G6 e anti-GAL-1. 33
3.2.5. Ensaios de Imunodetecção para validação da reatividade dos anticorpos... 34
3.3. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes DM-1. .. 36

3.3.1. Casuística e População de Estudo 36
3.3.2. Síntese de cDNA (DNA Complementar).....36
3.3.3. Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativa (Real Time – PCR). 37
3.3.4. Sequenciamento de Nova Geração dos miRNAs 39
3.3.5. Análise in silico de identificação dos miRNAs alvos para LGALS-1 e HLA-G. 39
3.3.6. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA. 40
3.4. Análise do efeito imunorregulatório de GAL-1 e HLA-G em modelo experimental induzido quimicamente ao DM1. 41
3.4.1. Animais 41
3.4.2. Indução química por estreptozotocina (STZ) ao diabetes mellitus tipo 1 experimental. 41
3.4.3. Imunofenotipagem das células dos linfonodos pancreáticos. 42
3.4.4. Análise Histoquímica e Imunohistoquímica 43
3.4.5. Detecção de translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos. 44
3.5. Análise Estatística 44
4. RESULTADOS 46
4.1. Desenvolvimento de ferramentas experimentais 46
4.1.1. Obtenção da proteína recombinante rhGST-HLA-G5 46
4.1.2. Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6 48
4.1.1. Obtenção de anticorpos reativos às proteínas HLA-G.....52
4.1. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes diagnosticados com DM-1. 55
4.1.1. Perfil de expressão gênica de HLA-G e LGALS-1 no DM1 analisada por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). 55
4.1.1. Identificação, in silico, de miRNAs para LGALS-1 e HLA-G e associados ao DM1 a partir dos miRNAS sequenciados de pacientes e indivíduos controles. 56
4.1.1. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA. 67
4.1.1. Análise comparativa, parcial e preliminar, dos padrões de expressão das moléculas HLA-G e LGALS-1 no DM1 humano. 67
4.1. GAL-1 e HLA-G no modelo experimental do DM1. 68
4.1.1. Impacto da deficiência do gene da Gal-1 na evolução do DM-1 experimental. 68
4.1.1. Análise histoquímica do pâncreas de animais tratados ou não com STZ.....70
4.1.1. Identificação dos tipos celulares presentes nos linfonodos pancreáticos. 71
4.1.2. Análise da ocorrência da translocação bacteriana no desencademanto do DM1. 72

5. DISCUSSÃO 74
6. CONCLUSÃO 82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
ANEXOS 99
ANEXO 01: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 99
ANEXO 02: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....100
ANEXO 03: Predição da estrutura complexa do rhHLA-Gproteína-proteína por rearranjo multimérico a partir da sequência da proteína recombinante.....101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia resultante da falha no processo de secreção da insulina e/ou falha na atividade funcional da insulina cujas causas estão associadas ao comprometimento da síntese desta proteína pelas células β pancreáticas ou pela destruição de células β pancreáticas por imunomediação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; RICCI *et al.*, 2017).

O DM é tido como uma epidemia em pleno curso o qual, em 2014, acometia, mundialmente, 422 milhões de indivíduos, com estimativa de 471 milhões em 2035. No Brasil, em 2014, a estimativa foi de 11,9 milhões de indivíduos diabéticos, com estimativa de 19,2 milhões, em 2035 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015-2016, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Os avanços decorridos da última década no conhecimento da patogenia, epidemiologia, heterogeneidade, marcadores preditivos, proposição de terapêuticas, dentre outros, favoreceram a busca da padronização do diagnóstico da doença bem como a melhor classificação mesma (ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014).

De modo geral, o DM pode ser diagnosticado com base nos critérios do nível de glicose plasmática, em que, o teste de glicemia casual ≥ 200 mg/dλ; glicemia de jejum ≥ 126 mg/dλ (7 mmol/λ); glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dλ e critérios de hemoglobina glicada A1c ≥ 6.5% (48 mmol/mol) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015-2016, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Segundo *American Diabetes Association* (ADA), 2016, as classificações estabelecidas para o DM1 são da ordem imuno-associadas: tipo 1A; e, idiopáticas: tipo 1 B, Diabetes do Adulto de Início no Jovem (*Maturity-Onset Diabetes of the Young* - Mody); e Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto (*Latent autoimmune diabetes of adult* - LADA). Quanto às classificações idiopáticas essas podem ser resultantes de: alterações genéticas as células β pancreáticas e da ação da insulina, processos de doenças que danificam o pâncreas, diabetes relacionado a outras

endocrinopatias e os casos decorrentes do uso de medicamentos (GROSS *et al*., 2002, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

O Diabetes *mellitus tipo 1* A define-se por ser doença crônica autoimune de caráter multifatorial caracterizada pelo comprometimento da produção de insulina endógena pelas células β pancreáticas em decorrência da destruição das mesmas dado à imunomediação desencadeada por células T auto reativas responsáveis pelo processo de infiltração das ilhotas pancreáticas (EISENBARTH, 1986, EISENBARTH & JEFFREY, 2008; WU *et al.,* 2013, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

As causas do Diabetes *mellitus tipo 1* B são múltiplas e ainda não completamente elucidadas, mas se correlacionam com anormalidades metabólicas associadas a mutação de receptores de insulina, resultando na redução da secreção de insulina pelas células β pancreáticas com consequente hiperinsulinemia a hiperglicemia modesta conforme a severidade do diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004; DIB, 2008, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes tipo *Mody* caracteriza-se pelo caráter genético da doença, em que a transmissão autossômico-dominante de pelo menos um dos seguintes genes *HNF-4α, GCK, HNF-1α, IPF-1, HNF-1β, NEUROD*, desencadeia diferentes modulações da secreção de insulina. Desta forma, o *Mody* é classificado como diabetes familiar, cujo diagnóstico é feito precocemente (infância, adolescência ou adultos jovens) (OLIVEIRA, FURUZAWA & REIS, 2002; CORREIA *et al,* 2011, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes do tipo *Lada* define-se por ser uma doença incidente em adultos, característica típica do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), associada a fatores metabólicos, genéticos e imunológicos típicos do DM1, os quais desencadeiam a autoimunidade decorrente da presença de auto-antígenos nas ilhotas pancreáticas. Pode progredir na falência das células pancreáticas e a sucessiva dependência de insulina exógena (ZIMMET, P. *et al.,*1994; LESLIE D. & VALERI C., 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004, FOURLANOS S., *et al* 2005; STRENSTRÖM G.*et al,* 2005, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

As manifestações clínicas iniciais do DM1 tais como, polidipsia, polifagia e poliúria, associadas à hiperglicemia, favorecem o rastreamento geográfico da

incidência da doença no âmbito mundial, evidenciando a variabilidade do mesmo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Cita-se como exemplo, apresentando taxas por 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade, a Finlândia com >60, Sardenha com ~40, Brasil com 7,6, China, Índia e Venezuela com 0,1 e Coréia com 0,5 (EKOÉ, 2008, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Dado a variabilidade da incidência, particularmente, com as perspectivas de aumento da indicidência do DM, associada à carga da doença, ou seja, o impacto da mortalidade cuja estimativa é de 1,5 milhões de mortes diretamente associadas ao DM e, 2,2 milhões de mortes atribuídas ao alto nível de glicose; e dos problemas de saúde tais como nefropatias, retinopatias, neuropatias, lesões cardíacas e hipertensão, obesidade, dentre outras, que são classificadas como doenças secundárias ao DM, que afetam a qualidade de vida de seus portadores, se faz necessário medidas eficazes de saúde pública aliada aos incentivos à pesquisa e a tecnologia para desenvolvimento de diretrizes e terapêuticas a um melhor custo benefício (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014, KNOWLER *et al.,* 2009, IBGE, 2014).

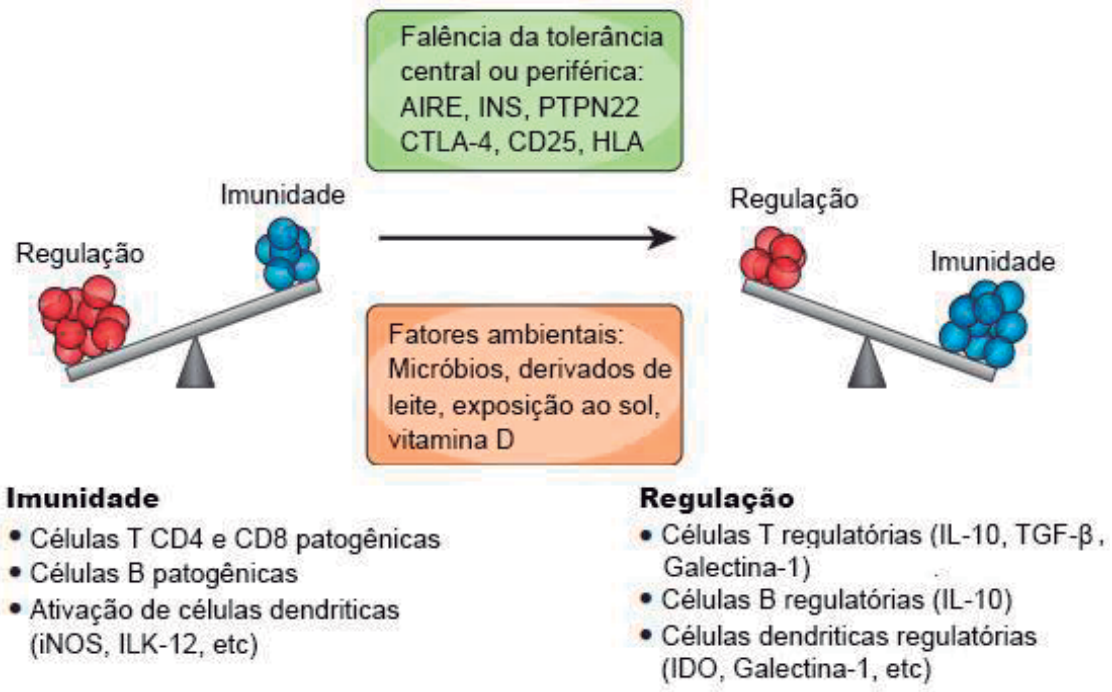
Os gastos públicos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde de um país. Como exemplo, o Brasil, cujo Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) tem o dispêndio da ordem de US$2.108,00 por paciente, o que evidencia a necessidade do planejamento e alocação de recursos de modo racional (ALBERTI, 1999; IBGE, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

1.2. Diabetes *mellitus* tipo 1: uma doença autoimune.

Representa a segunda maior causa de diabetes *mellitus* (DM) cuja incidência acomete 5-10% dos indivíduos portadores dessa desordem metabólica (HALIMI & BENHAMOU, 2004) de um total de 387 milhões de pacientes em todo o mundo. No Brasil, há cerca de 19,2 milhões de pacientes diagnosticados com DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011).

Apesar dos progressos consideráveis na compreensão dos fatores genéticos de susceptibilidade e do mecanismo da autoimunidade que precedem o aparecimento clínico do DM1, a origem da autoimune, em si, apresenta lacunas a serem respondidas, dentre elas, a atividade de moléculas imunorregulatórias, principalmente, de padrão anti-inflamatório, no contrapeso do exacerbado padrão inflamatório desencadeado no processo etiológico da doença (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Bluestone e colaboradores, 2010, descrevem o desequilíbrio do sistema imune desencadeado por exposição de fatores externos em associação ao efeito genético predisposto no indivíduo durante o desenvolvimento desta patologia (Figura 1).

Figura 1: O desequilíbrio do sistema imunológico é crucial para o desenvolvimento do DM1. A figura ilustra fatores responsáveis pela regulação da resposta imunológica evidenciando elementos que contribuiem para o aumento da susceptíbilidade ao DM1. O resultado é o descontrole dos mecanismos da tolerância central e periférica que associado a fatores ambientais estimulam o aparecimento desta patologia. Os principais tipos celulares envolvidos na resposta imunológica do DM1 são listados nos tópicos imunidade e regulação e, estão envidos na regulação das citocinas e proteínas.



Fonte: Adaptado de Bluestone *et al.*, 2010 e Arthur *et al.,* 2015.

Ao que concerne aos fatores genéticos, 18 regiões genômicas já foram descritas e associadas ao risco de susceptibilidade ao DM1. Essas regiões gênicas denominadas de IDDM, IDDM1 a IDDM18, são responsáveis por promoverem alterações na codificação e no nível da expressão das respectivas proteínas (SCHRANZ & LERNMARK, 1998, MAAHS, 2010).

Dentre as regiões mais evidenciadas, estão os genes de *HLA*, localizados na região cromossômica 6p21, "Insulin dependent diabetes mellitus 1" (IDDM1), responsáveis por codificar proteínas efetoras da resposta imune, as proteínas do complexo principal de imunohistocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC). Atualmente, sabe-se que genótipos do *HLA* estão relacionados à susceptibilidade, dentre eles: DQA1*0501–DQB1*0201/DQA1*0301–DQB1*0302 e DRB1*03/DRB1*04, os quais promovem alterações no resíduo de aminoácido na posição 57 da cadeia β e na posição 52 da cadeia α, afetando assim o reconhecimento e a apresentação de antígenos para as células T CD4, elevando para 40% o risco de desenvolvimento do DM1. Em contrapartida, também está descrito genótipo que contribui na proteção ao DM1, o DQA1*0102–DQB1*0602–DRB1*1501 (FAUSTMAN, 1993, FAUSTMAN, 1993, SCHRANZ & LERNMARK, 1998, BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, HEROLD *et al.,* 2013) .

São descritas mutações na região cromossômica 11p15.5, IDDM2, composta pelos genes, tirosina hidrolase (*TH*), número variável de cópias em *tandem* – insulina (*VNTR-INS*) e fator de crescimento semelhante à insulina II (*IGF2*), compreendendo o *locus* insulina (*INS)*. A principal descrição quanto aos polimorfismos presentes neste *locus* remete aos efeitos transcricionais quanto ao nível de expressão gênica da insulina. O alelo de classe III do *VNTR-INS* possui efeito protetor ao DM1, pois mantem o nível de expressão de insulina, enquanto, o alelo de classe I confere efeito de susceptibilidade o qual contribui com 10% no risco ao DM1, pois reduz o nível de expressão de insulina (BENNET *et al*., 1996, PUGLIESE *et al*., 1997, SCHRANZ & LERNMARK, 1998, ANJOS *et al*., 2004, NEPOM & BUCKNER, 2012).

Estudos do genoma completo (*GWAS- Genome wide association studies*) descrevem a influência de outros genes de susceptibilidade ao DM1, os quais em associação são tidos como fatores de risco ao desencadeamento da doença

(MAAHS *et al.,* 2010, STECK & REWERS, 2011, NEPOM & BUCKNER, 2012).. Dentre eles citam-se o *AIRE (Autoimmune Regulator Factor*) cuja regulação negativa do transcrito gênico altera o mecanismo de tolerância periférica reduzindo a garantia da seleção negativa de clones de células T autoreativas, favorecendo assim, a maturação de células hiperreativas (GEENEN *et al.,* 2012, OLIVERIA *et al.,*2013, MITRE *et al*., 2016)*, o CTLA4* (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)* cuja mutação afeta a interação do receptor CD28 expresso em células T ativadas (ANJOS *et al.*, 2004, LING *et al*., 2001, UEDA *et al.*, 2003), o *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) cuja mutação provoca uma única substituição da arginina pelo triptofano na proteína codificada, conduzindo a uma diminuição no receptor das células T e na sinalização dos receptores das células B, o que pode resultar num estabelecimento desequilibrado de tolerância tanto em células T como em células B (SHARP *et* al., 2015, ABDELRAHMAN *et* al., 2016, GOMES *et al*., 2017), o *IL2RA* (*interleukin 2 receptor, alpha*) cuja mutação de base única T/A (rs11594656) afeta a expressão do receptor em células T regulatórias o que reduz a atividade supressora de destas a autoantígenos, aloantígenos, antígenos tumorais e antigenos derivados de patogenos. (CHISTIAKOV *et al*., 2008, ABDELRAHMAN *et* al., 2016).

O perfil transcricional dos genes envolvidos na suceptibilidade ou proteção ao DM1 pode ser controlado pela regulação negativa via micro RNAs (miRNAs), os quais inibem a tradução do RNAm por pareamento às sequências nucleotídicas presentes, predominantemente, na 3'UTR (SEBASTIANI *et al*., 2011). Dentre os miRNAs que favorecem o desencademanto do DM1 seus alvos, em geral, são genes relacionados à autoimunidade e as células β pancreáticas, como o miRNA-181a que regula negativamente o transcrito *SMAD7* interferindo na função das células β pancreáticas (NABIH & ANDRAWES, 2016). O mir-26a é descrito como repressor da expressão da histona metiltransferase *EZH2* e *FOXP3*, consequentemente, reduzindo o número de células Treg virgens ativadas (ZHANG *et al*., 2016). Ainda, foram identificados os mir-375, miR-21, miR-24.1, miR-30d, miR-34a, miR-126, miR-146 e miR-148a em pacientes DM1 quando comparados aos indivíduos controles. Esses foram correlacionados à função das células β, resistência à insulina dentre outros parâmetros do DM1 (SEYHAN *et al*., 2016).

Seguindo os estágios do desenvolvimento do DM1, os eventos que precedem a desordem metabólica e o processo autoimune remetem aos fatores ambientais os quais influenciam no desencadeamento da doença: *i*) ocorrência de sazonalidade tanto para meses de nascimento quanto para os diagnósticos do DM1, sendo os meses de nascimento de abril a julho os mais relatados entre pacientes diagnosticados cuja hipótese explicativa remete aos níveis de variação de vitamina D materna os quais promovem efeito nas células β pancreáticas e células imunológicas (JONGBLOET *et al.,* 1998, MCKINNEY, 2001, VAISERMAN *et al.,* 2007, KAHN *et al,* 2009); *ii*) exposição precoce insuficiente aos microorganismos reduz a regulação do sistema imune ao processo de maturação de células T, o que proporcionaria maior risco ao DM1 (PUNDZIUTE-LYCKA *et al*, 2000); *iii*) exposição a infecções virais como, por exemplo, *coxsackie B1* (LAITINEM *et al.,* 2014), enterovírus (BERGAMIN *et al.,* 2015, RODRIGUEZ-CALVO, 2015); *iv*) fatores nutricionais como a inserção precoce na dieta infantil de alimentos derivados do leite de vaca (NORRIS *et al.,* 1996, VIRTANEN *et al.,* 1998).

As evidências das anormalidades imunológicas remetem à detecção de autoanticorpos reativos a diferentes antígenos que podem iniciar o processo de insulite como ao *Zinc transporter 8* (ZnT8), a insulina, a ácido glutâmico decarboxilase (GAD65) e ao insulinoma associada (IA-2) (EISENBARTH & JEFFREY, 2008, PIETROPAOLO *et al.,*2012, ATKINSON *et al*, 2014, MORRAN *et al.,* 2015). Diferentes estudos descrevem que apesar de ocorrer majoritariamente o processo inflamatório, o mesmo, não ocorre de maneira uniforme, pois no pâncreas podem coexistir ilhotas normais, ilhotas pseudoatrofiadas as quais não sofrem insulite e, ilhotas com insulite, o que resultará no desenvolvimento temporal crônico da doença (FOULIS, MCGIL & FARQUHARSON, 1991, BUTLER *et al.,* 2007).

Delineia-se o início da patogênese do DM1 com o processamento e apresentação de autoantígenos de células β pancreáticas por células apresentadoras de antígeno (APCs) para linfócitos T autoreativos do tipo CD4 e CD8. Dados na literatura evidenciam que tal mecanismo de apresentação às APCs de células β pancreáticas pode, também, ter origem em um processo de infecção viral (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, ATKINSON *et al.,* 2014).

A apresentação de auto-antígenos e a co-estimulação das APCs promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4 em linfócitos T $CD4^+$efetoras autoreativas, as quais tendem a potencializar sua expansão e função com ação de células derivadas do complemento, C3a e C5a, as quais são ativadas durante a interação célula T – APCs (CABRERA *et al.,* 2012).

As células T efetoras autoimunes que infiltram nas ilhotas pancreáticas secretam citocinas associadas ao padrão de resposta imune do tipo Th1, como interferon γ (IFN-γ) e interleucina-2 (IL-2). Estas citocinas próinflamatórias auxiliam no recrutamento de macrófagos e linfócitos T $CD8^+$, consequentemente, desencadeando o processo denominado de insulite. Ainda, a secreção de quimiocinas favorece a exacerbação do recrutamento de células mononucleares e, consequente, *loop* positivo para destruição das células β pancreáticas (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010).

A morte das células β pancreáticas é resultado direto da ação das perfurinas/granzinas mediada por células T $CD8^+$ e da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IFN-γ, fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-1β (IL-1β) (CAO *et al.,* 2007). Estudos têm demonstrado a relevância de células T regulatórias (Treg) na patogênese do DM1, particularmente, devido à alta afinidade por autoantígenos contribuindo assim para supressão das células Th1 efetoras por mecanismos dependentes da secreção de citocinas IL-10 e TGF-β (ASSEMAN *et al,* 1999, FALHEN *et al.,* 2005, MARIE *et al.,* 2005, CABRERA *et al.*, 2012).

No entanto, no contexto do DM1, a função regulatória das células Treg esta comprometida e isto favorece a resposta pró-inflamatória exacerbada das células T efetoras autoreativas. Desta forma, há uma incapacidade de manter a autotolerância, o que favorece a resposta pró-inflamatória mediada por células com padrão de resposta imune Th1 e, consequente destruição das células β (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, CABRERA *et al.,* 2012).

Dentre as teorias propostas para justificar a prejudicada função de Treg está a ineficaz sinalização de IL-2 / IL-2R a qual confere redução ao estímulo de Treg, consequentemente, exacerbando a proliferação das células T efetoras e possível prejuízo à sinalização das células dendríticas (CD) (FURTADO *et al.,* 2002, MALEK, 2008, TANG *et al.,* 2008). Ainda, descreve-se o efeito prejudicado da apresentação

das CD imaturas ou defeituosas às células $CD8^+$Tregs na patogenia do DM1 em decorrência do defeito de reconhecimento proteína de choque térmico Hsp60sp pela molécula de MHC de classe II, o HLA-E, cuja interação é necessária para ativação das células T $CD8^+$ (YAMAZAKI *et al.*, 2003, VUCKOVIC *et al.,* 2007). Vários leucócitos estão envolvidos na imunopatologia do diabetes tipo 1, sendo os linfócitos T CD4 e CD8 autorreativos críticos no desenvolvimento desta doença promovendo a destruição das células β presentes nas ilhotas pancreáticas (HASKINS & McDUFFIE, 1990, PETERSON & HASKINS, 1996, MILLER *et al.,* 1988, BAYRY *et al.,*2016, BLUESTONE *et al.,* 2015).

1.3. Galectina-1: Estrutura e Funções.

A galectina-1 (Gal-1) pertence a uma família de proteínas que se ligam de modo específico as glicanas, "*Glycan-binding proteins*", encontradas nos animais. Esta família de proteínas é composta por 15 membros e as duas características estruturais que permitem seu agrupamento são a conservação de resíduos de aminoácidos no domínio de reconhecimento de carboidratos (*Carbohydrate recognition domain - CRD*) e a afinidade por β-galactosídeos. Estas proteínas são multifuncionais e apresentam atividades intra e extracelulares (BARONDES *et al.,* 1994, HUGHES, 1997, BARONDES *et al.,* 2004, STOWEEL & CUMMINGS, 2014, ARTHUR *et al.,* 2015).

A Gal-1 é uma proteína ácida constituída por N-terminal acetilado, ausência de peptídeo sinal, presença de resíduos de cisteínas livres e massa molecular aparente de aproximadamente 15 kDa. A Gal-1 pode formar homodímeros, associados de modo não-covalente, apresentado uma constantes de associação entre 1,25 a 7,0 μM em função de sua origem animal (CHO & CUMMINGS, 1995, COOPER & BARONDES, 1999, LOPEZ-LUCENDO *et al*., 2004, RUBINSTEIN *et al*., 2004, CAMBY *et al.*, 2006, CHIANG *et al.,* 2008). A formação de homodímeros não-covalentes classifica a Gal-1 como prototípica na família das galectinas (CHO & CUMMINGS, 1995; COOPER & BARONDES, 1999; RUBINSTEIN *et al*., 2004; CAMBY *et al.*, 2006; CHIANG *et al.,* 2008). Dados da literatura sobre a estrutura da Gal-1 mostraram que a sua topologia molecular é do tipo *jelly-roll* (LOPEZ-LUCENDO *et al*., 2004).

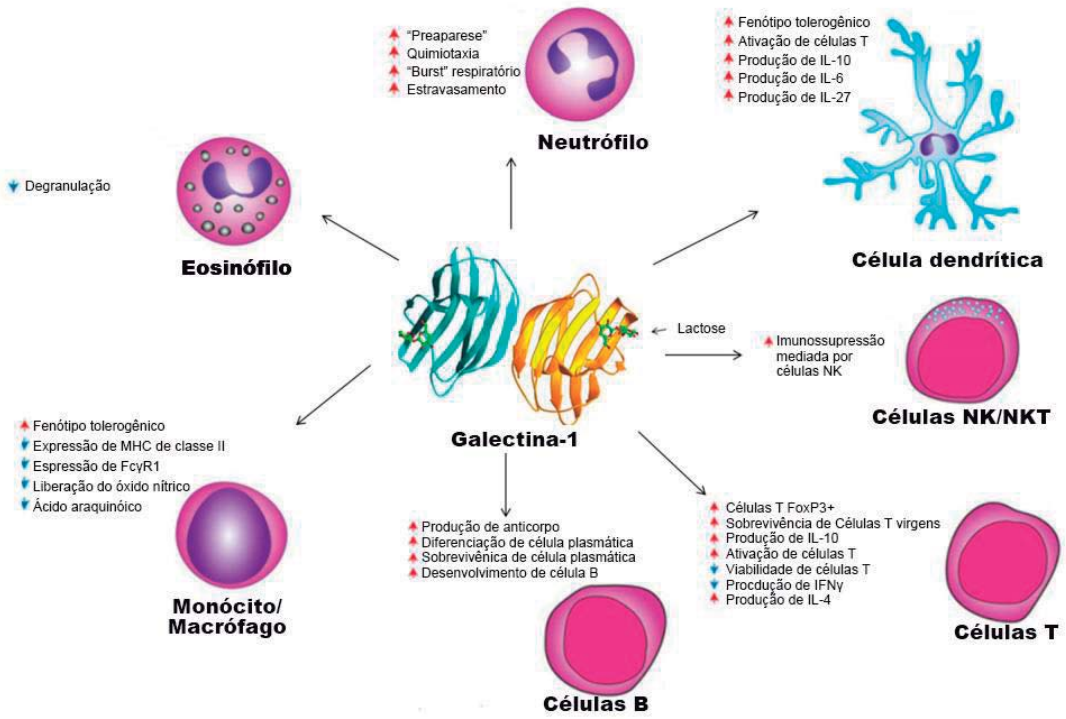
O gene da galectina-1 humana é denominado por *Lectin galactoside-binding, soluble, 1 - LGALS1*, localizado no cromossomo 22q12, constituído por 4 éxons e 3 íntrons, o qual totaliza 4397pb, altamente conservado e, com poucas descrições de polimorfismos, atualmente, apenas 14 SNPs e 2 variações gênicas distribuídos na região 5'UTR (8), em regiões intrônicas (4) e na região 3'UTR (4). Portanto, a prevalência dos SNPs na região 5'UTR delineia maior variabilidade à quantidade dos transcritos a serem codificados (CHIARIOTTI *et al.*, 2004, IIDA *et al,* 2005). Enquanto, em camundongos, o gene da galectina-1 é denoninado *Lgals-1*, localizado no cromossomo 15, constituído por 4 éxons e 3 íntrons, o qual totaliza 3741 pb. As sequências de aminoácidos entre as duas proteínas mostra uma identidade de 88,15% de homologia com a sequência gênica humana (WILSON *et al.*, 1989). Poucos miRNAs foram descritos como tendo alvo a GAL-1, White e colaboradores (2014) identificaram o mir-22 como um regulador negativo da expressão do RNAm de LGALS-1, fato que desfavorece a progressão e metátase de tumor renal.

A Gal-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos como baço, músculos, cérebro, fígado, rins, pele, endométrio, pulmão, estômago, intestino e outros (CAMBY *et al.,* 2006, DIAS BARUFFI *et al.*, 2010). Esta proteína ligante de glicanas apresenta a capacidade de regular uma variedade de processos biológicos, incluindo a homeostase da célula T, a resolução de respostas inflamatórias (RABINOVICH *et al.* 1999, 2002), interações hospedeiro-patógeno (ZUNIGA *et al.* 2001), eliminação seletiva de timócitos específicos durante o desenvolvimento de células T (PERILLO *et al*. 1997, SOTOMAYOR & RABINOVICH 2000), apoptose (DIAS-BARUFFI *et al.,* 2003), a tolerância e a embriogênese feto-materna(VAN DEN BRULE *et al.*, 1997, BLOIS *et al.*, 2007), dentre outros.

A Gal-1 já foi detectada em alguns tipos celulares como em células epiteliais do timo (BAUM *et al.,* 1995), células T primadas com antígeno (BLASER *et al.,* 1998), macrófagos ativados (RABINOVICH *et al.,* 1996), células B ativadas (ZUNIGA *et al*., 2001), células endoteliais (LA *et al.,* 2003), e células do estroma e órgãos linfóides murinos como o timo e linfonodo (CHIARIOTTI *et al.,* 1999, RABINOVICH *et al.,* 2002). Além disso, participa do controle do tráfico de células T (NORLING *et al.,* 2008), favorece a apoptose seletiva de células Th1 e Th17 dado o padrão de

glicosilação α2-3 sialiltransferases (ST3Gal1) destas células (TOSCANO *et al.,* 2007), participa do mecanismo regulatório das células Treg naturais (GARIN *et al.,* 2007), e estimular a expansão de células Treg induzíveis (Figura 2) (TOSCANO *et al*., 2006). Ainda, a Gal-1, pode induzir a secreção de IL-10, IL-2 e inibir a liberação de IFN-γ (VAN DER LEIJ *et al.,* 2007, TOSCANO *et al*, 2007, STOWELL *et al*., 2008, CEDENO-LAURENT *et al*., 2012). Um possível mecanismo molecular de regulação de células Th1 por galectina-1 envolve a inibição da sinalização da via do NF-kB (TOSCANO *et al.,* 2011). Basicamente, células Th1 ativadas e pró-inflamatórias produzem e secretam Gal-1 via ativação do NF-kB, entretanto, a interação da Gal-1 com glicanas das superfícies de células Th1 ativada bloqueia a liberação de citocinas inflamatórias via a inibição da via do NF-kB (TOSCANO *et al.,* 2011).

Figura 2: Funções Imunorregulatórias de Gal-1 frente a diferentes leucócitos.



Fonte: Adaptado de Arthur *et al*., 2015.

Portanto, essa lectina tem um papel imunorregulatório (VAN DER LEIJ *et al.,* 2004; VAN DER LEIJ *et al.,* 2007) e isto, provavelmente estaria correlacionado com o efeito benéfico da presença de GAL-1 em doenças autoimunes, no processo de

tolerância materno-fetal, no processo de interação patógeno-hospedeiro. Por outro lado, a presença da Gal-1, pode favorecer a progressão de tumores e infecções virais (CAMBY *et al.,* 2006, TOSCANO et al., 2006, PERONE *et al.,* 2006, 2009, WANG *et al.*, 2009, WU *et al*., 2011).

1.4. Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G): Estrutura e Funções.

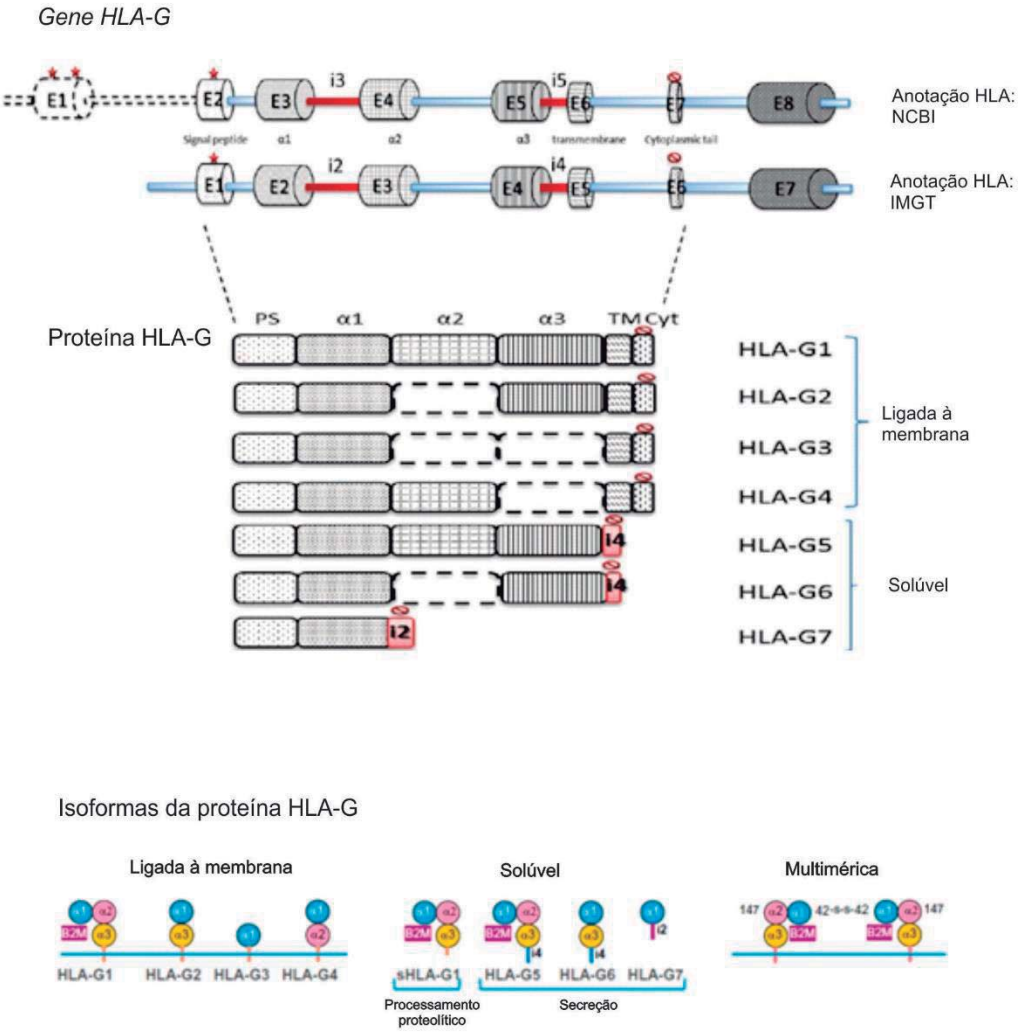
O Antígeno Leucocitário Humano –G (HLA-G) é uma moléula não clássica Ib do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) identificada, em 1986, por Ellis e colaboradores, em células trofoblásticas com atividade imunoregulatória no processo de tolerância materno-fetal. Em 1987, Geraghty e colaboradores a descreveram geneticamente como sendo uma molécula com similaridade gênica aos genes do MHC de classe I clássicos (MHC classe Ia) excetuando pelo número limitado de polimorfismos em sua região codificadora. Sendo assim, o HLA-G foi classificado como sendo uma glicoproteína codificada pelo MHC de classe Ib com função tolerogênica à resposta imunológica (CAROSELLA *et al.,* 2003, CAROSELLA *et al.,* 2008).

Codificado pelo cromossomo 6p.21 o gene *HLA*-G é constituído por 8 éxons e 7 íntrons dos quais o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, éxons 2- 4 codificam os domínios extracelulares α1 – α3, éxon 5 codifica região transmembrana e, os íntrons 2 e 4 e o éxon 6 contém códons de finalização “stop códon” (CASTELLI *et al.,* 2014, DONADI et al., 2014, CAROSELLA et al., 2015). A ocorrência de “splicing” alternativos torna possível a codificação de 7 isoformas, sendo quatro isoformas, HLA-G1, G2, G3 e G4, ligadas a membrana, e três isoformas, HLA-G5, G6 e G7, solúveis, em que G1 e G5 são compostas por uma cadeia pesada de 3 domínios globulares ligados não covalentemente a β2-microglobulina, enquanto, as demais isoformas possuem uma estrutura mais simples que carecem de um ou dois domínios globulares e não se ligam covalentemente a β2-microglobulina. Ainda, o HLA-G pode existir em estruturas oligoméricas por meio de ligações dissulfeto estabelecidas entre os resíduos de cisteínas nas posições 42 e 147, Cys42-Cys42 ou Cys42-Cys147 (Figura 3) (BOYSON *et al.,*2002, GONEN-GROSS *et al.,*2003, SHIROISHI *et al*., 2006, ALEGRE *et al.,* 2014, CAROSELLA et al., 2015).

O gene do HLA-G apresenta um limitado número de polimorfismos geralmente presentes nas regiões promotora 5'UTR (UTR- *unstralated region*) e 3'UTR como elementos gênicos regulatórios e na regulação gênica pós-traducional, respectivamente (CASTELLI *et al.,* 2014). Os elementos gênicos regulatórios, 5'UTR, implicam diretamente no padrão de expressão proteica tecido-restrita do HLA-G, o qual apresenta-se constitutivo nas células trofoblásticas, no timo, na córnea, no pâncreas, na matriz proximal das unhas, nos eritroblastos e nas células mesenquimais (MOREAU *et al.,* 2003, VAN DER ELSEN, 2011, CASTELLI *et al.,*2014, CAROSELLA *et al*., 2015).

Quanto ao perfil de regulação gênica pós-transcricional do HLA-G os miRNAs: miR-133a, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-365, miR133, miR-139-5p, mir-548, mir-608, mir-628 interferem na estabilidade do transcrito gênico do HLA-G, inibindo sua expressão proteica, o qual possui função relevante na modulação da resposta imune. Foi observado que elevados níveis de miRNAs específicos para o *HLA-G* restaura a citototoxicidade mediada por células NK contra alvos celulares (CASTELLI *et al.,* 2014, MORI *et al.,* 2016, SELIGER *et al*, 2016).

Figura 3: Esquema do locus gênico do HLA-G e das suas isoformas proteicas. A tradução do gene do HLA-G promove, por processamento alternativo de RNAm, diferentes isoformas proteicas (-G1 a -G7) com distintas caractarísticas bioquímicas/estruturais como associação ou não (formas solúveis) com a membrana celular, interação não-covalente com a proteína β2-microglobulinas, processamento proteolítico e oligomerização.



Fonte: Adaptado de Carosella *et al.,* 2015.

A atividade imunossupressora do HLA-G se dá pela interação específica de cada domínio globular presente na molécula aos receptores CD85J (ILT-2), CD85D (ILT-4), CD158d (KIR2DL4) e CD160 (BY55), os quais estão presentes, respectivamente, em células B, células Natural Killers (NK) e células T; macrófagos; células NK; e, em células endoteliais, células NK e células T, promovendo assim a indução da apoptose em linfócitos T $CD8^+$ antígeno específicos (LILA *et al.*, 2001, CONTINI *et al.,* 2003), inibição da atividade de citotoxicidade de células CTL e NK (CAROSELLA *et al.*, 1999), (LEMAOULT *et al.,* 2003, BORTOLOTTI *et al.*, 2014), a

regulação da adesão vascular transendotelial (DORLING *et al*., 2000), inibe a ativação e amadurecimento de DCs (LIANG *et al.,* 2003) e de linfócitos T $CD4^+$ (BAINBRIDGE, 2000), induz a formação de células T regulatórias por meio da trogocitose ou da diferenciação de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ virgens para células com função imunossupressora sobre demais linfócitos T por secretarem IL-10 e TGF-β (LILA *et al*, 2001), inibição da angiogênese (MENIER *et al*., 2004, FONS *et al*., 2006, CAROSELLA *et al.,* 2011).

Devido a todas estas propriedades imunorregulatórias, o HLA-G tem sido reconhecido como uma molécula tolerogênica cuja regulação positiva pode proteger ou prejudicar o indivíduo. Contextos patofisiológicos em que a regulação positiva do HLA-G acarreta em proteção ao indivíduo são: o sucesso da aceitação do aloenxerto transplantado (BIELDRON *et al.,* 2015), a implantação do embrião no início da gestação (CLARK *et al*., 2013), evolução clínica de doenças autoimune e inflamatórias cuja progressão ocorre de maneira mais lenta quando comparada com pacientes com baixos níveis de expressão de HLA-G (MURDACA *et* al., 2016, ZAHEDNASAB *et al*., 2016). De modo contrário, os prejuízos acarretados pela regulação positiva do HLA-G são descritos na infecção viral do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (VIGANO *et al.,* 2017), vírus da hepatite C (VHC) (AMIOT *et al*., 2014), infecção bacteriana por Helicobacter pylori (SOUZA *et al*., 2016) e, em diferentes níves de expressão em doenças cancerígenas tais como como glioblastoma, mieloma múltiplo, carcinoma de ovário, leucemia linfocítica e pulmão (PISTOIA *et al.,* 2007).

1.5. As moléculas imunorregulatórias (HLA-G e Galectina-1) e a doença autoimune DM1.

A Gal-1 e o HLA-G desempenham papéis importantes na modulação do sistema imune conferindo tolerância imunológica (CEDENO-LAURENTA *et al*., 2012, BARRIENTOS *et* al., 2014, CAROSELLA *et* al., 2015, GREGORI, 2016, SASAGURI *et al*., 2016, FERREIRA *et al*., 2017). No entanto, atualmente, são escassas as informações sobre a presença e/ou função de Gal-1 e do HLA-G no processo de modulação da resposta imune no desenvolvimento do DM1 humano e experimental.

Dados da literatura mostram que células dendríticas obtidas de camundongos diabéticos "*Non-Obese Diabetic* - NOD" e transgênicas para o gene da Gal-1 (DC-Gal-1) foram capazes de induzir apoptose em clone "diabetogenic" de células T. Ainda, quando estas células DC-Gal-1 foram injetadas nos camundongos NOD (modelo experimental para DM1), em estágios subclínicos do DM1, ocorreu uma deleção de células T periféricas autoreativas, aumento de células T secretoras de IL-4 e IL-10, retardo nos sintomas do diabetes e na insulite (PERONE *et al.* 2006). O mesmo grupo demonstrou que o tratamento de animais NOD com Gal-1 solúvel previne a instalação da hiperglicemia, impede a invasão das ilhotas pancreáticas por células Th1 anti-células β e aumenta a porcentagem de células T secretoras de IL-1, IL-5 e IL-10 no pâncreas (PERONE *et al.,* 2009). De modo interessante, a administração de Gal-1 exógena foi também capaz reverter a autoimunidade para células β e a hiperglicemia de animais NOD com DM 1 em curso (PERONE *et al.,* 2009).

Ainda nessa linha, foi sugerido por outros que células T autoreativas ($CD4^+$ ou $CD8^+$) de camundongos NOD podem ser resistentes ao efeito supressor de células T regulatórias mediado por Gal-1 (WU *et al.,* 2011). O mecanismo dessa resistência pode estar associado à redução da expressão de um ligante para esta lectina, o gangliosídeo GM1, nas superfícies de células T específicas para antígenos de células *β* (WANG *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

Jiang e colaboradores (2009) propuseram que a Gal-1 poderia compor um protocolo de tratamento de pacientes com DM1 uma vez que esta lectina seria capaz de induzir a apoptose de células T autorreativas e específicas para células β. Assim, desta forma, a Gal-1 poderia cooperar para a restauração da tolerância a antígenos próprios destas células em pacientes com DM1. Curiosamente, monócitos do sangue periférico de pacientes com DM1, estimulados ou não, secretam baixos níveis de Gal-1 em comparação com células de indivíduos sadios (GÓMEZ-TOURIÑO *et al.,* 2011). Segundo estes pesquisadores esta baixa capacidade de síntese da molécula imunoreguladora Gal-1 pode auxiliar na manutenção de um cenário de inflação autoimune em pacientes com DM1.

Em relação ao HLA-G foi descrito a associação de polimorfismos na região 3'UTR aumentar as taxas de risco ao DM1. Cita-se os genótipos del/del ou del/ins

presente no polimorfismo 14pb inserção/deleção, o polimorfismo de base única (“Single Nucleotide Polymorphism – SNP”). Ainda, o alelo +3001 T presente exclusivamente em pacientes DM1, o qual em desequilíbrio de ligação como o genótipo +3010 CC e o haplótipo 14pb DEL / + 3001C / + 3003T / + 3010C / + 3027C / + 3035C / + 3142G / + 3187A / + 3196C , conferiram baixa e moderada expressão do HLA-G nos pacientes DM1 avaliados (ALBUQUERQUE *et al.,*2016).

Montanucii e colaboradores, 2012, ao avaliarem os efeitos do padrão de resposta Th17 e de células Treg de células PBMCs oriundas de pacientes DM1 e de indivíduos saudáveis quando submetidas ao tratamento com IFN-γ ou com células-tronco mesenquimais derivadas de Sangue de Cordão Umbilical envolvidas em microcápsulas imunes (CPS-hUCMS), observaram o aumento da expressão de transcritos e de proteína do HLA-G5 quando PBMCs foram co-cultivadas com CPS-hUCMS. A expressão do HLA-G5 foi superior nas PBMCs de indivíduos saudáveis do que nos pacientes DM1. No entanto, o desencadeamento da expressão de HLA-G5 sugere a correlação do mesmo na atividade imunossupressora do DM1, a qual reduz a ação de células Th1 efetoras, favorece a expansão de Treg e assim, promove o reequilíbrio da razão células T efetoras / células Treg no contexto do DM1. Quanto às células Th17, os autores não encontraram associação de indução do HLA-G pelas CPS-UCMS favorecendo a expressão dessas células.

Portanto, o desequilíbrio na resposta imunológica associado a atividade de células T (CD4 e/ou CD8) autoreativas com padrão imunofenotípico relacionado a uma resposta proinflamatória contribui para destruição de células β pancreáticas, com consequente insulite. Logo, no presente trabalho buscamos investigar a potencial participação de duas moléculas imunoregulatórias endógenas, GAL-1 e HLA-G, no diabetes *mellitus* autoimune.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar uma potencial associação da presença ou ausência da Gal-1 e/ou HLA-G na evolução do DM1 humano e experimental.

2.2. Específicos

I. Desenvolvimento de ferramentas experimentais:

a. Isoformas recombinantes de HLA-G5 e –G6.

b. Anticorpos anti-HLA-G (-G5 e -G6) e anti-Gal-1.

II. Detecção do perfil de expressão de Gal-1 e HLA-G em pacientes DM-1.

III. Analise da evolução do diabetes autoimune experimental em camundongos Lgals$^{-/-}$ do gene da Gal-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de ferramentas técnico-científicas: Proteínas Recombinantes e Anticorpos

3.1.1. Produção de proteínas recombinantes HLA-G5 e HLA-G6

Todas as estratégias de clonagem, expressão, solubilização, *refolding* e purificação das isoformas proteicas recombinantes de HLA-G, -G5 e -G6, em sistema procarioto, foram possíveis dado a concessão dos vetores de expressão em mamíferos pcDNA3.1Hygro(-) (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) e em procariotos pGEX-6p2 clonados com as respectivas sequências dos transcritos gênicos de HLA-G5 e HLA-G6 pelo Prof. Dr. Benoit Favier do “Insitute of Emerging Diseases and Innovative Therapy – CEA/IMVA -University Paris-Sud - Inserm – France”, conforme descrito em Paul *et al*., 2000.

3.1.2. Clonagem Molecular

3.1.2.1. Vetor de clonagem

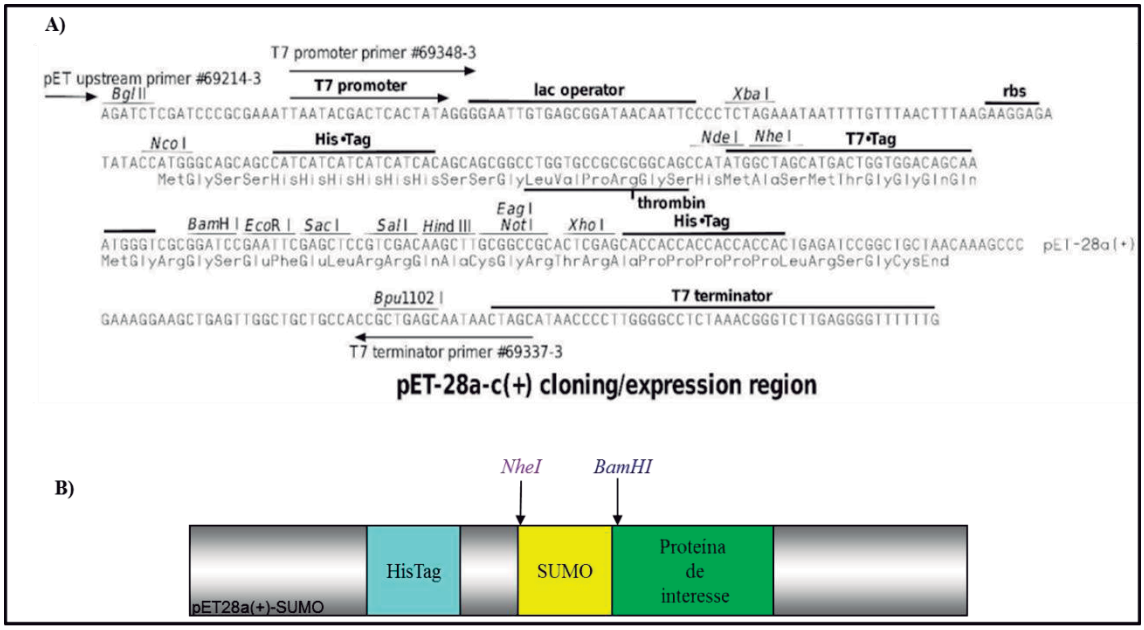
As estratégias de clonagem e expressão das isoformas recombinantes de HLA-G5 e HLA-G6 em sistemas procariotos foram delineadas conforme a disponibilidade das endonucleases no laboratório segundo os sítios múltiplos de clonagem para o vetor pET-28a(+)-SUMO. Dentre as principais características desse plasmídeo há o gene *lacI* que codifica o repressor lac, a sequência promotora T7 que é reconhecida pela enzima T7 RNA polimerase para a realização da transcrição, o operador *lac* que é o sítio de ligação do repressor *lac* capaz de regular o processo transcricional,o gene de resistência ao antibiótico à canamicina e o sítio múltiplo de clonagem, região onde há a inserção do gene de interesse.

a) Vetor pET_28a(+)-SUMO

A estratégia de realizar a clonagem dos transcritos primários de HLA-G5 e HLA-G6 no vetor de expressão pET_28a(+)-SUMO advém do propósito da proteína de fusão SUMO, ~ 11 kDa, vir a favorecer o processo de solubilização das isoformas –G5 e –G6 associado ao processo de purificação por afinidade da cauda de poli histidina à resina de níquel, a qual a proteína SUMO está fusionada.

O vetor de expressão pET-28a(+)-SUMO, gentilmente cedido pela profa. Dra. Maria Cristina Nonato, representa uma versão modificada do vetor pET-28a(+) no qual foi inserido o fragmento gênico de *Smt3* entre os sítios de restrição 5'... GCTAGC... 3' (*NheI*) e 5'...GGATCC...3' (*BamHI*), com a finalidade de expressar a proteína SUMO em fusão a extremidade N-terminal da proteína de interesse. Com a devida expressão proteica, o processo de clivagem da proteína de interesse a proteína SUMO ocorre pela ação da protease *ULP1* (*Ubequitin like specific protease 1* – EC 3.4.22.680) de *Saccharomyces cerevisae* por meio do reconhecimento do motivo Gly-Gly na região C-terminal da proteína SUMO, permitindo, assim, a obtenção da proteína de interesse em sua forma livre (Figura 4).

Figura 4: Estratégia de inserção da proteína SUMO ao vetor de expressão pET28a-c(+). A) Região de clonagem múltipla do vetor pET28a-c(+). B) Representação esquemática da construção do vetor pET28a(+)-SUMO.



Legenda: Roxo: identificação da endonuclease *NheI*;

Azul: identificação da endonuclease *BamHI*;

Desta forma, a estratégia de clonagem delineada para o vetor pET28a(+)-SUMO consistiu em adicionar os transcritos gênicos de HLA-G5 e HLA-G6 nos sítios de restrição 5'...GGATCC...3' e 5'...CTCGAG...3', respectivamente, de ação das endonucleases de restrição *BamHI* e *XhoI,* ambas enzimas disponíveis em nosso laboratório. Para tal intento, oligonucleotídeos iniciadores (*primers)* foram desenhados manualmente para amplificar a sequência gênica de interesse e

introduzir nas extremidades 5' e 3' os sítios de restrição para as endonucleases e, ainda, apresentarem temperaturas de *melting* e de anelamento semelhantes para garantir a eficácia da reação de polimerase em cadeia (PCR) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de *primers* desenhados para estratégia de clonagem em sítios de restrição *BamHI* e *XhoI.*

Oligonucleotídeo iniciadores (*primer*)	**Sequência**
***Forward* 5'-3'**	CTAGGATCCGCTCCCAGACGC
***Reverse* 5'-3'**	CTACTCGAGGTTAAAGGTCTTCAGAGAGGCT

A amplificação ocorreu em reação em PCR, em solução contendo 100 ng do plasmídeo (pcDNA_HLA-G5 ou pcDNA_HLA-G6), 5 µL do tampão de PCR 10X, 0,5 µM *primer forward*, 0,5 µM *primer reverse*, 1 µL de 10mM de deoxinucleotídeos (dNTP), 0,02 U/µL *Taq Phusion DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e H_2O miliQ autoclavada *q.s.p.* 50µl de solução, sob condições de desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e, extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e, confirmados os padrões de peso molecular aparente, 990bp HLA-G5 e 716pb HLA-G6, esses foram extraídos, purificados por meio do *kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Heathcare Life Sciences, Pittsburgh, EUA) conforme instruções do fabricante e, quantificados em espectofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) em comprimento de onda de 260nm.

Em seguida, os transcritos primários de HLA-G5, HLA-G6 e o vetor de expressão pET28a(+)-SUMO foram clivados em reação de digestão enzimática, em solução contendo 1µg de amostra, 5µl de tampão 10X (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA), 10U das enzimas *BamHI e XhoI* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) e, H_2O miliQ autoclavada *q.s.p*. 50µl, sob condições, 37°C por 40 minutos e 65°C por 5 minutos. Os fragmentos digeridos foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%, subtraídos e purificados conforme as instruções do fabricante do *kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Heathcare Life Sciences, Pittsburgh, EUA). Tais fragmentos foram quantificados em espectofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

Em seguida, houve a reação de ligação entre os transcritos gênicos de interesse ao vetor de expressão em solução contendo 2 µL tampão 10X *T4 DNA Ligase* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA), 200ng de pET28a(+)-SUMO digerido, 95,28 ng *HLA-G5* digerido ou 72,3 ng *HLA-G6* digerido (proporção molar inserto:vetor 3:1), 1µL T4 DNA Ligase (3U/µL) (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) e H_2O miliQ autoclavada *q.s.p*. 20 µL de solução, sob as condições, 25°C por 40 minutos e 65°C por 10 minutos. Alíquota da reação de ligação, 5 µL, foi utilizada para transformar, por choque térmico, 50 µL de células bacterianas competentes, *Escherichia coli* (*E. coli*) XL10-Gold conforme descrito por Sambrooks, Fritcsch e Maniatis, 1989. Fração da suspensão celular foi semeada em 10 mL de meio LB ágar contendo 10 µL de antibiótico tetraciclina (20mg/mL) e 10 µL de antibiótico canamicina (50mg/mL) sob condições de incubação em estufa a 37°C, *overnight*. Os clones positivos foram selecionados e inoculados em meio LB com os respectivos antibióticos. A confirmação quanto a presença do inserto, plasmídeo pET28a(+)-SUMO_HLA-G5 ou pET28a(+)-SUMO_HLA-G6, ocorreu com a extração do plasmídeo com o *kit illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, EUA) conforme recomendações do fabricante, seguido, da reação digestão enzimática dos transcritos gênicos de *HLA-G5* e *HLA-G6* por *BamHI* e *XhoI*. Os padrões moleculares dos fragmentos digeridos foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%, conforme, descrito anteriormente e, assim, os plasmídeos clonados foram quantificados e armazenados em freezer a -20°C.

3.1.3. Expressão proteica de HLA-G5 e HLA-G6 em sistema procarioto

Os procedimentos da expressão das proteínas recombinantes HLA-G5 e HLA-G6 foram realizados em bactérias de expressão termo-competentes, *Escherichia coli (E. coli) Rosetta (DE3)pLYS* as quais foram transformadas por choque térmico, conforme descrito por Sambrooks, Fritcsch e Maniatis, 1989, com os plasmídeos pET28a(+)-SUMO_HLA-G5, pET28a(+)-SUMO_HLA-G6, pGEX_HLA-G5 e pGEX_HLA-G6, respectivamente.

Os procedimentos de seleção das colônias bacterianas, produção de pré-inóculo e do inóculo ocorreram com a adição aos pares de antibióticos, um selecionando a espécie bacteriana e o outro o plasmídeo de interesse. Sendo assim,

a adição do antibiótico cloranfenicol (50 mg/mL) selecionou as *E. coli Rosetta (DE3)pLYS*, o antibiótico canamicina (50 mg/mL) selecionou os plasmídeos pET28a(+)-SUMO e o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) selecionou os plasmídeos pGEX-6p2.

A seleção das colônias bacterianas transformadas ocorreu com o plaqueamento da suspensão celular em 10 mL de meio LB ágar contendo 10 µL de seus respectivos antibióticos e, incubadas em estufa a 37°C, *overnight*, seguido do isolamento das mesmas. Individualmente, as colônias bacterianas foram analisadas quanto à expressão das proteínas recombinantes de interesse, sendo submetidas ao crescimento em 25mL de meio LB contendo e 25µL de de seus respectivos antibióticos e, incubadas em agitador a 37°C, rotação de 180 rpm, até atingir intervalo de 0,3 – 0,6 nm de densitometria óptica (D.O.) em comprimento de onda de 600nm. Ao atingirem o intervalo de DO, frações de 5mL do inóculo foram feitas para realizar o teste de expressão proteica a partir do uso de diferentes concentrações molares de Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo (IPTG), 0M, 100µM, 250 µM, 500 µM e 1mM. Concomitantemente, 500 µL da suspensão celular foram coletados nos períodos de 0 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 12 horas, de modo a avaliar o melhor intervalo de indução à expressão proteica.

Finalizado o intervalo de expressão em análise, as amostras foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos e, o botão celular foi ressuspendido com 50 µL de tampão de amostra 1X composto por 2% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 mM Tris:Bicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 2% dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Synth, Diadema, Brasil), 8 M ureia (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e azul bromofenol (0,008%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e submetidos a fervura por 10 minutos. As amostras, volume de 10 µL, foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida de sulfato de docecilo de sódio 15% (SDS-PAGE), amperagem de 20mA e voltagem livre por 1hora e 20 minutos e, posteriormente, corados em solução de azul de comassie composta por 50% de metanol (Synth, Diadema, Brasil), 10% ácido acético glacial (Synth, Diadema, Brasil) e 0,1% corante azul de comassie (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA).

Certificado a análise do processo de expressão das proteínas recombinantes por *Rosetta (DE3)pLYS*, padronizamos o processo de indução no inóculo formado a partir de 1mL pré-inóculo o qual foi transferido para 1L de meio LB contendo 1mL

dos respectivos antibióticos e, incubado e mantido sob condição de agitação a 180 rpm, a 37°C, até atingir o crescimento celular em intervalo de 0,3 – 0,6 nm de D.O. (600nm). A indução proteica ocorreu com adição do IPTG em concentração final 100µM e, a cultura celular foi incubada em agitador a 18°C, sob rotação a 180 rpm, *overnight*. Por fim, a suspensão celular será centrifugada a 8000g por 10 minutos e, o botão celular armazenado em freezer -20°C.

3.1.4. Isolamento e solubilização dos corpos de inclusão.

Em decorrência das proteínas recombinantes His6-tagged SUMO-HLA-G6, rhGST-HLAG5 e rhGST-HLAG6 permanecerem insolúveis mesmo com toda adequação do procedimento de expressão proteica, se fez necessário a realização do protocolo adaptado de isolamento e solubilização dos corpos de inclusão do *kit Protein Refolding* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O botão celular obtido pelo processo de expressão proteica foi ressuspendido em tampão de ressuspensão celular 1X na proporção de 1g de botão célular para 10mL de tampão composto por: 50mM de Tris-HCl (Synth, Diadema, Brasil), 50 mM NaCl (Synth, Diadema, Brasil), 1 mM ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 5% Glicerol (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), 0,5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Synth, Diadema, Brasil) pH 8,0, adicionado de; 200µL de lisozima (1mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em seguida, a suspensão celular foi submetida à inversão em temperatura ambiente por 15 minutos e1cp de inibidor de protease livre de EDTA (Roche Life Science, Penzberg, Alemanha) foi adicionado. A suspensão celular foi sonicada em condições de potência de 15W, 10 segundos pulso, 50 segundos em repouso, amplitude 50% , por intervalo de 1 minuto. Seguindo, a amostra His6-tagged SUMO-HLA-G6 foi tratada com 1% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e o material mantido sob agitação em gelo por 15 minutos, enquanto, as amostras rhGST-HLA-G5 e rhGST-HLA-G6 foram tratadas com 5% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) sob agitação em gelo por 2 horas.

A suspensão proteica foi centrifugada a 8.000g por 15minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o botão proteico ressuspendido com tampão de lavagem 1X, na proporção de 1g de botão proteico: 10mL de tampão de lavagem,

composto por 50mM de Tris-Cl (Synth, Diadema, Brasil), 50 mM NaCl (Synth, Diadema, Brasil), 1 mM DTT, 5% Glicerol (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), 0,5 mM EDTA(Synth, Diadema, Brasil), 1% Triton (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) em pH8,0. A suspensão celular foi centrifugada a 8.000g por 15minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e, novamente, o botão proteico ressuspendido com tampão de lavagem 1X. Este procedimento se repetiu por mais duas vezes.

Após as etapas de lavagem, o botão proteico foi novamente ressuspendido com tampão de ressuspensão celular 1X, nas mesmas proporções, centrifugado a 8.000g por 15minutos a 4°C e, o sobrenadante descartado. Esta etapa foi realizada por mais duas vezes para que o detergente Triton X-100 fosse removido da amostra.

O botão proteico foi então ressuspendido com tampão de desnaturação 1X, na proporção de 0,5g de botão celular: para 10mL de tampão de desnaturação, composto por 50mM de Tris-Cl (Synth, Diadema, Brasil), 50 mM NaCl (Synth, Diadema, Brasil), 5% Glicerol (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), 0,5 mM EDTA (Synth, Diadema, Brasil), pH8,0, e, submetido a sonicação sob as condições de potência de 15W, 10 segundos pulso, 50 segundos em repouso, amplitude 50%, por intervalo de 1 minuto. Houve a centrifugação da amostra a 8.000g por 15minutos a 4°C e, o sobrenadante foi descartado e o botão proteico ressuspendido com tampão de desnaturação 1X, na proporção de 0,5g de botão proteico para 1,75mL de tampão de desnaturação, acrescido de 3% de detergente N-laurilsarcosine (SLS) para as amostras His6-tagged SUMO-HLA-G6, enquanto para as amostras rhGST-HLA-G5 e rhGST_HLA-G6 foi adicionado uréia 8M na proporção de 0,5g de botão proteico para 1,75mL uréia 8mM.

O botão proteico foi mantido sob agitação, em gelo, *overnight*. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 12000g por 20 minutos. O sobrenadante de His6-tagged SUMO-HLA-G6 foi recuperado e armazenado em geladeira a 4°C e, o botão proteico descartado, enquanto, os sobrenadantes de rhGST-HLA-G5 e rhGST-HLA-G6, dado a ocorrência do procedimento realizar a desnaturação de demais proteínas insolúveis, foram submetidos a uma etapa de ultrafiltração em amicon (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) de cut-off de 50kDa e, posteriormente, a solução proteica retida foi recuperada e armazenada em geladeira a 4°C.

O peso molecular aparente das amostras solubilizadas His6-tagged SUMO-HLA-G6 (44kDa), rhGST-HLA-G5 (64kDa) e rhGST-HLA-G6 (56kDa) foi avaliado por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado em solução de azul de comassie conforme descrito anteriormente e, estimado a partir do plot de Rf *versus* o logaritmo da massa molecular, onde, Rf=distância migrada/tamanho do gel. O peso molecular das proteínas que compõem o marcador molecular são os parâmetros para construção do gráfico de dispersão.

3.1.5. Purificação e *refolding* da proteína recombinante rhHLA-G6.

A purificação da proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6 se deu em coluna comercial de afinidade HisTrap HP 1mL (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), conforme instruções do fabricante, com a aplicação do sobrenadante final da etapa de isolamento e solubilização dos corpos de inclusão cuja afinidade da porção proteica de histidina ao níquel, permitiu a imobilização da proteína recombinante às *beads* de agarose acopladas em sua superfície com íons de níquel (Ni^{+2}).

A coluna foi equilibrada com 40mL de tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio, 0.5 M cloreto de sódio e 20 mM imidazole, pH 7.4), em fluxo médio de 3mL/min, a amostra aplicada e lavada com 20mL de tampão de ligação em fluxo médio de 1mL/min e eluída em gradiente de concentração com tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio, 0.5 M cloreto de sódio e 500 mM imidazole, pH 7.4), em fluxo médio de 1mL/min, em alíquotas de 0,5µL conforme variações de pressão na coluna. As amostras eluídas foram quantificadas por espectrofotômetro em comprimento de onda a 280nm e, analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

De modo a remover a *tag* fusão HisTagged-SUMO da fração HLA-G6 foi realizado digestão proteica com a enzima ULP1, em solução contendo 250µg His6-tagged SUMO-HLA-G6 e 0,2µL ULP1 (3mg/mL), incubada em geladeira a 4°C, sob gelo, *overnight*. Em seguida, a solução foi purificada em coluna HisTrap HP 1mL, conforme descrito anteriormente, com a diferença de que a amostra de interesse, rhHLA-G6, é recuperada no estágio de *flow through* dado a ausência da *tag* de afinidade ao Ni^{+2} à mesma, o que inviabiliza o processo de imobilização desta às *beads*. A alíquota de rhHLA-G6 foi quantificada em espectrofotômetro em

comprimento de onda a 280nm, analisada em gel SDS-PAGE 15% e seu peso molecular estimado, 27,8kDa, conforme descrito anteriormente.

3.1.6. Caracterização Bioquímica e Imunoquímicas das proteínas recombinantes humanas HLA-G5 e HLA-G6.

Amostras das proteínas rhGST-HLA-G5 e rhHLA-G6 foram validadas por meio da dinâmica de dispersão de luz (*Dynamic light scattering* – DLS), espectrometria de massa *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC MS/MS – Laboratório de pesquisa do Prof. José César Rosa), espectrometria de massa *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF – Laboratório de pesquisa do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes) e ensaio de imunodetecção por anticorpo comercial MEM-G1 (Abcam, Cambrigde, Reino Unido) e MEM-G9 (Abcam, Cambrigde, Reino Unido).

a) Dinâmica de Dispersão de Luz (DLS)

A dinâmica de dispersão de luz (DLS) teve como objetivo avaliar o estado de agregação das proteínas rhGST-HLA-G5 e rhHLA-G6 de modo a confirmar a eficácia do processo de solubilização das mesmas.

A partir de alíquotas das amostras rhGST-HLA-G5 e rhHLA-G6 essas foram concentradas por ultrafiltração em amicon (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) de *cut-off* de 10kDa até atingir concentração mínima de 5mg/mL, aproximadamente, 40 µL das amostras foram analisados a 16°C, em cuvetta Zen2112, em equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

b. Digestão tríptica das proteínas recombinantes, *in situ* e em solução, por análise de espectropetria de massas.

Visando a identificação dos aminoácidos que compõem as proteínas recombinantes rhGST-HLA-G5 e rhHLA-G6 de modo a confirmar a homologia das proteínas recombinantes às isoformas nativas, foi realizado a análise dos digestos trípticos por espectropetria de massas a partir de bandas de gel de SDS-PAGE correspondentes às proteínas recombinantes as quais foram excisadas e tratadas como se segue.

Inicialmente, o detergente aniônico SDS e o corante azul de coomassie foram removidos por lavagem, realizadas por três repetições, com 400 µL de solução composta de 0,1 M NH_4HCO_3 e 50% de acetonitrilo. A amostra foi desidratada com acetonitrilo puro e seca em centrífuga rotativa sob vácuo (Savant SpeedVac, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) para ,em seguida, ser reidratada com solução de tripsina (0,5 µg / 20 µL) (Promega, Madison, WI, EUA) a qual após hidratação completa foi coberta com uma solução de 0,1 M NH_4HCO_3 e, incubada durante 24 h, a 37 ° C. A reação foi paralisada com adição de 5 µL de ácido fórmico e, a mistura foi incubada à temperatura ambiente para extração peptídica. O extrato foi mantido congelado a -20°C até análise de espectrometria de massa.

Os péptidos trípticos da amostra foram preparados em ponteira de coluna contendo resina de fase invertida (POROS R2, Perseptive Biosystems, EUA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. A amostra foi carregada na coluna e purificada a partir de sais e outros componentes hidrofílicos por meio de três lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%. Os peptídeos foram eluídos da resina utilizando 30 µL de uma solução de metanol a 60% em 5% de ácido fórmico, secos em *speed vac* e preparados para LC-ESI-Q-TOF-MS.

Cinco µg de cada uma das amostras foram adicionados em solução 0,1 M de NH_4HCO_3 / 50% de acetonitrilo, reduzidos com 45 mM de DTT e alquilados com 100 mM de iodoacetamida. A solução foi diluída 5 vezes com 0,1 M NH_4HCO_3 e 1 µg de tripsina foi adicionado e, mantida a 37ºC durante 18 h. Os péptidos foram dessalinizados na ponta da coluna como anteriormente mencionado e submetidos a LC-ESI-Q-TOF-MS / MS.

Os péptidos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas com quadrupolo de transmissão por analisador de tempo de vôo (Q-TOF-Ultima, Waters, Manchester, UK) acoplado a cromatografia capilar nanoAccquity utilizando uma fase inversa 10cm x 75µm i.d. 3 µm partícula (Waters, EUA) controlado com gradiente linear de 5% de acetonitrilo/0,1% de ácido fórmico para 80% de acetonitrilo/0,1% de ácido fórmico a um fluxo de 300 nL através de uma fonte de *electrospray*, equipado com um emissor constituído de sílica fundida de 20 µm i.d., tensão voltáica de 3,5 kV e 40 V e uma temperatura de 100 ° C. A amostra foi injetada a coluna C18 (5µm) em

fluxo de 2µL/min e, os espectros de massa coletados com a aquisição de dados dependentes (*data dependent accquisiton* – DDA) dos 3 picos superiores no modo MS e MS / MS e, processados no *software* MassLynx v. 4.1 (Waters, Manchester, UK) com a finalidade de gerar a lista de picos a qual será utilizada para identificar as proteínas no banco de dados *SwissProt*. A determinação dos dados de massa molecular foram gerados com varredura MS1 (400-1500 amu) e, cada íon peptídeo detectado foi submetido ao CID-MS / MS através de DDA de modo a produzir os tipos de fragmentos de íon *b* e *y* os quais foram utilizados para coincidir com as sequências de aminoácidos e seus respectivos peptídeos. O *software* MassLynx 4.1 gerou um arquivo de lista de picos os quais foram analisados nos bancos de dados, submetidos ao MASCOT v.2.4.2 e pesquisados no SwissProt 2014_03 usando parâmetros: 1,2 Da para íon precursor e 0,6 Da para a tolerância aos íons de produto, carbamidometilação para modificação fixa e oxidação de metionina modificação variável.

b) Determinação do peso molecular por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de vôo (MALDI-TOF).

A amostra rhHLA-G6 foi dessanilizada por ponteiras *Zip Tip* C18 (40-65µM) previamente ativadas por carregamento e descarte de metanol e, equilibradas por carregamento e descarte de solução 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA). A dessanilização ocorreu com o carregamento e descarte da amostra, procedimento repetido dez vezes, cujas *beads* imobilizaram as proteínas na resina presente na ponteira, seguido, da lavagem das amostras pelo carregamento e descarte de solução 0,5% TFA. A eluição ocorreu pelo carregamento e descarte de solução 80% acetonitrila (ACN) e 0,5% TFA e, as soluções finais das amostras foram armazenadas em geladeira.

O preparo da placa de MALDI inicialmente ocorreu com a lavagem seguida em metanol, H_2O deionizada e, imersão em solução 50% etanol por 10 minutos. Confirmada a remoção de resíduos, a placa foi seca à temperatura ambiente. Posteriomente, solução saturada de ácido sinapítico, a qual foi preparada em solução saturada com ACN e H_2O deionizada contendo 0,1% TFA na proporção de 3:7 (v/v), foi depositada à placa no poço definido de modo a constituir uma fina camada de matriz, local em que amostra foi depositada.

A amostra rhHLA-G6 foi diluída em 0,1%TFA e, 1µL da solução proteica foi misturado à 1µL da solução da matriz, para assim, ser aplicado 1µL da solução final em seus repectivos poços na placa de MALDI. Para calibração externa e calibração do equipamento foi, também, depositado na placa de MALDI 1µL de solução padrão de calibração constituída por 1µL de proteínas padrões, *protein calibration standard II* (BRUKER Daltonics, Massachusetts, EUA) e 1µL da solução de matriz.

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme (BRUKER Daltonics, Massachusetts, EUA) cujos parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: 2000 *laser shots* por espectro, extração de íons pulsados (*Pulsed ion extraction* - PIE) de 500 ns, modo positivo, modo linear, frequência de laser de 1000 Hz, voltagem de IS1 (*ion source* 1) de 25.00 kV e IS2 (*ion source* 2) de 23.20kV. A faixa de massa molecular proteica analisada foi de 20kDa a 70kDa.

c) Ensaio de Imunodetecção

Por fim, foi analisado o reconhecimento das proteínas recombinantes rhGST-HLA-G5 e rhHLA-G6, respectivamente, pelo anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G1 (Abcam, Cambridge, UK) por técnica *Wertern* Blot e MEM-G9 (Abcam, Cambridge, UK) pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (*ELISA)*.

Para a realização do *Western Blotting,* 10µg da proteína recombinante rhGST-HLA-G5 foram desnaturadas em tampão de amostra 5x, corridas em eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada por 2 horas a 4°C com leite desnatado a 5% em tampão Tris-salino (TBST) (20 mM Tris, 0,5M NaCl, 0,05% de Tween), seguido, da incubação com o anticorpo MEM-G1 diluído em solução de leite desnatado 3% em tampão TBST na proporção 1:10.000, *overnight*, à 4°C. A membrana foi lavada em tampão TBST, com trocas a cada 5 minutos em um intervalo de 30 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado de ovelha ECL™ Anti-Camundongo IgG HRP *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), diluído na proporção 1:20.000, por 2 horas, sob agitação. A análise da imunodetecção ocorreu em reação quimioluminescente promovida pela exposição da membrana em solução de volumes equivalentes do ECL do kit *Amersham™ ECL™ Western blotting detection*

reagents (Amersham, UK), seguida da exposição da membrana ao filme auto-radiográfico.

Para a realização do ELISA, 10µg da proteína recombinante rhHLA-G6 nativas ou desnaturantes por ação de temperatura (95ºC por 5 minutos) e detergente (SLS, 3%) foram adsorvidas em placa de 96 poços, bloqueadas com 3% de albumina de soro bovino (BSA) a 37°C, por 2 horas, e, lavadas em tampão fosfato salino contendo 0,05%Tween (PBST) por 4 vezes. Os anticorpos monoclonais comerciais MEM-G9 (reativo a forma nativa de HLA-G) ou MEM-G1 (reativo a forma desnaturada de HLA-G) foram incubados em volume final de 50µL, por 2 horas, na proporção 1:100, cuja diluição foi realizada em PBST contendo 1% BSA. Seguido as etapas de lavagem, o anticorpo secundário conjugado ovelha ECL™ Anti-Camundongo IgG, *Horseradish Peroxidase Linked* (HPL) *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) foi adicionado, em volume final de 50µL, diluído na proporção 1:5000 também diluído em PBST contendo 1% BSA, por 1 hora. Para revelação foi feita adição de 50µl de substrato 3,3,5,5 tetrametilbenzidina (TMB) composto por 10mg de TMB diluídos em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 µl de água oxigenada 30% (H_2O_2) em 5mL de solução tampão TMB (0,1M ácido cítrico e 0,2M Na_2HPO_4). Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de solução de 2M de H_2SO_4. O resultado foi analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm.

3.2. Produção de anticorpos anti-HLA-G e anti-GAL-1.

3.2.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados conforme aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, protocol n°15.1.636.60.2 (Anexo 1).

3.2.2. Obtenção de soro imune anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6.

Camundongos da linhagem BALB/C, fêmeas, com peso aproximado de 20-25g, foram sedados via intraperitoneal (iP) com solução de volume final de 200µL composta de 80mg/Kg do animal de Ketamina (50mg/mL) e 10mg/Kg do animal de Xilazina (20mg/mL) seguido da coleta de sangue pela veia facial anterior do animal

para obtenção do soro pré-imune e, posterior, procedimento de imunização ao qual ocorreu em cinco etapas de imunização, em intervalos de 15 dias.

Os camundongos foram desafiados com solução de 100µL contendo 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias da linhagem *Rosetta(DE3)pLYS* expressando proteína recombinante, rhGST-HLA-G5 ou rhGST-HLA-G6, diluídas em PBS1X, atenuadas em temperatura de 65°C por 3horas (MAGNANI *et al*.,2009).

Constatado a eficiência no procedimento de imunização nos ensaios de imunodetecção, os animais foram eutanasiados conforme Resolução Normativa n.13, de 20 de setembro de 2013, Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, 2013 o qual sugere a utilização da solução de 100mg/kg corpóreo do animal de Tiopental Sódico e 100mg/kg corpóreo do animal de Lidocaína, aplicado em via intraperitoneal e, o soro imune foi coletado por meio da punção cardíaca.

3.2.3. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6.

Finalizada a coleta do soro imune por punção cardíaca, os animais foram esterilizados e linfonodos poplíteos foram coletados para seguirmos com o procedimento de fusão das células poplíteas às células mielóides.

Previamente a fusão, as células SP2-O/Ag14 (mieloma) foram cultivadas em meio DMEM contendo 15% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (40mg/mL) e tetraciclina (10mg/mL) durante 15 dias. Após esse período as células de mieloma foram devidamente lavadas com PBS1X para completa remoção do SFB e, posteriormente, contadas em câmera de *Neubauer*. Quanto às células poplíteas, essas foram maceradas em peneira *Tamis Cellular, cell strainer* 70µm, com a utilização de êmbolo de seringa, a peneira foi lavada com PBS1X e, a suspensão celular coletada. As células foram então centrifugadas a 1.500rpm por 10 minutos e, também, quantificadas em câmera de *Neubauer*.

No procedimento de fusão foram utilizados para o HLA-G6 $27x10^6$ células do poplíteo e $3,25x10^6$ células do mieloma SP2-O/Ag14, totalizando em $300x10^5$ células, cuja fusão ocorreu na proporção de 9 células do poplíteo : 1 célula de mieloma. Para o HLA-G5 havia $26x10^6$ células do poplíteo e $3,25x10^6$ células do

mieloma SP2-O/Ag14, totalizando em $282x10^5$ células, que resultou na fusão celular em proporção de 8 células do poplíteo : 1 célula de mieloma. As células poplíteas e do mieloma foram adicionadas em tubo falcon de 15mL, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos. Em seguida, os botões celulares foram ressuspendidos com 1mL de solução polietilenoglicol (5%) Hybrimax e, submetidos a ciclos de banho-maria a 37°C, por 50 segundos, com adição de 1mL de meio de cultura DMEM contendo 15% SFB; totalizando a adição de 8mL de meio de cultura. Após a última adição de meio, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os botões celulares ressuspendidos com 30mL de meio DMEM suplementado com HAT (Hipoxantina 0,1mM, Aminopterina 0,0004mM, Timidina 0,016mM) (meio HAT) e 20% de SFB e distribuídos em placas de 96 poços de fundo chato em volume de 100µL.

As células híbridas foram mantidas em meio HAT para seleção dos hibridomas, por 15 dias, com trocas do meio de cultura a cada 48 horas. Posteriormente, os hibridomas foram mantidos em meio DMEM suplementado com HT (Hipoxantina 0,1mM e Timidina 0,016mM) (meio HT) e, após detecção dos hibridomas de interesse, as células foram transferidas para placa de 24 poços e, posteriormente, 6 poços para crescimento dos hibridomas. As células dos hibridomas selecionados foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para testes posteriores. Os sobrenadantes da suspensão celular foram armazenados em geladeira.

3.2.4. Obtenção de anticorpos policlonais IgY anti-HLA-G5, anti-HLA-G6 e anti-GAL-1.

Galináceos da linhagem *Gallus Gallus domesticus*, fêmeas, 18-20 semanas e peso aproximado de 1,4-1,6Kg, foram anestesiados em via subcutânea com 80-100mg por kg do animal Ketamina (50mg/mL) e 10mg por kg do animal de Xilazina (20mg/mL) (*Guide to the care and use of experimental animals*, 1993 e *Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific proporse*, 2008) e imunizados com suspensão de macerados do gel SDS-PAGE 15% dos respectivos padrões moleculares aparentes de rhGST-HLA-G5 e a rhGST-HLA-G6 homogeneizados em 200 µL adjuvante completo de *Freund* ou imunizados com suspensão de 100µg de

proteína recombinante humana Gal-1 (rhGal-1) diluídas em PBS 1x estéril contendo 150 µL adjuvante completo de *Freund*.

Os procedimentos de imunização foram repetidos cinco vezes, em um intervalo de 15 dias, sendo que 2° a 5° imunização a suspensão proteica foi homogeneizada com adjuvante incompleto de *Freund*. Em todas as etapas, ovos eram diariamente coletados, suas gemas separadas, liofilizadas e o IgY purificado pela metodologia de precipitação com sulfato de amônio conforme descrito em Polson*et al*., 1990.

No final do procedimento de imunização e devida confirmação da reatividade dos anticorpos aos antígenos nos ensaios de imunodetecção, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica conforme Resolução Normativa n.13, de 20 de setembro de 2013, Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, 2013, e, de acordo com o *Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific proporse*, 2008, o qual sugere a utilização de uma solução de 100mg/kg corpóreo do animal de Tiopental Sódico e 100mg/kg corpóreo do animal de Lidocaína, aplicado em via intraperitoneal.

3.2.5. Ensaios de Imunodetecção para validação da reatividade dos anticorpos.

a) Western Blot

Para o ensaio de *Western Blotting*, 10µg das proteínas recombinantes desnaturadas em tampão de amostra 5x foram corridas em eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com leite desnatado a 3% em tampão Tris-salino (TBST) (20mM Tris, 0,5M NaCl, 0,05% de Tween), por 2 horas, a 4°C e lavada com TBST, seis vezes, em intervalo de 30 minutos. Em seguida, houve a incubação dos respectivos anticorpos em análise, soro imune anti-HLA-G5 ou soro imune anti-HLA-G6, IgY anti-HLA-G5 ou IgY anti-HLA-G6, diluídos em solução de leite desnatado 3% em tampão TBST na proporção 1:10.000, *overnight*, à 4°C, sob agitação. As membranas foram novamente lavadas e, as membranas foram incubadas com seus rescpetivos anticorpos secundários, conjugado de ovelha ECL™ Anti-Camundongo IgG HRP *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK)

ou conjugado ovelha anti-galinha *IgY H&L* (HRP) (Abcam, Cambridge, UK), diluídos na proporção 1:20.000, em temperatura ambiente, por 2 horas, sob agitação. A análise da imunodetecção ocorreu em ECL do kit *Amersham™ ECL™ Western blotting detection reagents* (Amersham, UK), seguida da exposição das membranas ao filme auto-radiográfico.

b) Slot Blotting

O ensaio de *Slot Blotting* ocorreu com 10µg das proteínas recombinantes depositadas em membrana de nitrocelulose por sistema *slot blotter*, sem sofrerem qualquer ação redutora e/ou desnaturante. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 3% em tampão TBST, por 2 horas e, lavadas com TBST por seis vezes, para então serem incubadas com o soro imune anti-HLA-G5 ou soro imune anti-HLA-G6, IgY anti-HLA-G5 ou IgY anti-HLA-G6, diluídos em solução de leite desnatado 3% em tampão TBST na proporção 1:10.000, *overnight*, à 4°C, sob agitação. As membranas foram lavadas com tampão TBST por três vezes e, incubadas com seus respectivos anticorpos secundários, conjugado de ovelha ECL™ Anti-Camundongo IgG HRP *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) ou conjugado ovelha anti-galinha *IgY H&L* (HRP) (Abcam, Cambridge, UK), diluídos na proporção 1:20.000, em temperatura ambiente, por 2 horas, sob agitação. A análise da imunodetecção ocorreu em ECL do kit *Amersham™ ECL™ Western blotting detection reagents* (Amersham, UK), seguida da exposição das membranas ao filme auto-radiográfico.

c) *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*- ELISA

Para a realização do ensaio ELISA indireto, 10µg das proteínas recombinantes foram adsorvidas em placa de 96 poços, bloqueadas com 3% BSA a 37°C, por 2 horas e, lavadas em PBST por 4 vezes. Posteriormente, foram incubados em volume final de 50µL com soro imune anti-HLA-G5 ou soro imune anti-HLA-G6, IgY anti-HLA-G5 ou IgY anti-HLA-G6, todos diluídos na proporção 1:1.000 ou incubados com 50µL dos sobrenantes dos potencias clones dos hibridomas anti-HLA-G5 ou anti-HLA-G6, por 2 horas, a 37°C. Os poços foram lavados em PBST e, os anticorpos secundários conjugados, ovelha ECL™ anti-camundongo IgG (HPL) *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life

Science, Little Chalfont, UK) ou ovelha anti-galinha *IgY H&L* (HRP) (Abcam, Cambridge, UK) foram incubados em seus respectivos poços, em volume final de 50µL diluídos na proporção 1:5000, por 1 hora à 37°C. A revelação foi feita em solução TMB conforme descrito anteriormente e, a placa foi analisada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm.

3.3. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes DM-1.

3.3.1. Casuística e População de Estudo

Os pacientes foram recrutados nos Ambulatórios de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), coordenados pelos professores Milton César Foss e Maria Cristina Foss-Freitas, conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, em 24 de setembro de 2012, de acordo com o Processo HCRP nº 12541/2012 (Anexo 02). Enquanto os indivíduos controles foram recrutados por convites realizados à comunidade local. O ensaio totalizou em 61 indivíduos amostrados.

3.3.2. Síntese de cDNA (DNA Complementar)

Amostras biológicas de RNA total foram doadas pela Dra. Juliana Massaro do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP, de modo a ser realizado a síntese de cDNA. Parâmetros de qualidade, como razões 260/230 e 280/230 entre 1,8 e 2,2, RIN (*RNA Integrity Number*) > 8,5 e integridade do material foram certificados pela colaboradora.

A reação de transcrição reversa foi realizada com o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems®,* Califórnia, EUA) cuja solução de reação foi constituída de 1 µg de RNA total, 2,5 µL de 10X RT *buffer*; 1 µL de 25X dNTP *Mix*; 2,5 µL de 10X RT *Random Primers*; 1,25 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50U/µL); 0,63 µL de *RNAse OUT Inhibitor* (110U/ µL) e água *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* qsp. 25 µL, sob condições no termociclador de 1 *Hold*: 25°C por 10 minutos, 1 *Hold*: a 37°C por 120 minutos e, 1 *Hold:* a 85°C por 5 segundos. Finalizada as sínteses de cDNA, essas foram diluídas em soluções de trabalho a 10ng/µL cDNA e armazenadas a -20°C.

3.3.3. Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativa (*Real Time* – PCR)

A quantificação da expressão gênica de *HLA-G* e *LGALS-1* por qPCR foi realizada em aparelho *StepOnePlus™ System* (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA).

a) Condições de reação para quantificação do transcrito gênico de *HLA-G.*

As reações para quantificação do *HLA-G* ocorreram pelo sistema *Taqman®* através do conjunto de sondas e primers pré-formulados do *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA) - *HLA-G:* Hs00365950_g1 e, o *Taqman® Endogenous Control* (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA) - *GAPDH:* Hs01922876_u1, os quais foram otimizados para reação de solução de volume final 10 µL constituída por 5 µL de 2x *TaqMan® PCR Universal Master Mix* (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA); 0,5 µL de sonda 20x *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA), 25ng de cDNA e H_2O *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) qsp. 10 µL, a qual ocorreu de acordo com as condições de ciclagem universal: 1 *Hold*: 50°C por 2 minutos, 1 *Hold:* 95°C por 10 minutos e 40 ciclos: 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto.

b) Condições de reação para quantificação do transcrito gênico de *LGALS-1.*

As reações para quantificação do *LGALS-1* ocorreram por sistema *Syber® Green* através dos *primers* desenhados manualmente conforme sequências dos transcritos gênicos, gene alvo e o gene endógeno. No caso, para o alvo de *LGALS-1* os *primers* utilizados foram 5' – CCTGGAGAGTCCCTTCGAGT e 3'- CACACGATGGTGTTGGCGTC e, para o transcrito endógeno *GAPDH* os *primers* utilizados foram 5'- AACAGCCTCAAGATCATCAGC e 3'- CTGTTGCTGTAGCCAAATTCG-.

A reação de solução foi composta de 10 µL da solução 2X *iQ™ Syber® Green SuperMix* (Bio-Rad) o qual é composto por *Syber® Green I dye*, iTaq™ *DNA*

polymerase, dNTPs (0,4mM de cada nucleotídeo: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 6mM $MgCl_2$, 40mM Tris-HCl, 100mM KCl, 20nM fluoresceína e estabilizadores, em pH 8.4; 300nM *primers* alvo e 300nM *primers* endógeno, 25ng cDNA e H_2O *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) qsp. 20 µL, a qual ocorreu de acordo com as condições de ciclagem universal: 1 *Hold*: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e *Melt curve stage*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minutos e 72°C por 15 segundos.

Para validação do experimento realizado por SyberGreen foi realizado o cálculo de eficiência da reação através da montagem de uma curva padrão para cada um dos primers de *LGALS-1*, utilizando-se diluições seriadas (1/2 a 1/16) das amostras de cDNA de células JEG-3. Os valores de eficiência da reação (E) foram calculados a partir dos valores obtidos de *Slope* e R^2 fornecidos pelo software *StepOne Software v2.0.2*. A eficiência (E) foi calculada pela fórmula E = 10(-1/slope). O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de Cts foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis dadas pelo R^2 (APPLIED BIOSYSTEMS APLICATION NOTE, 2006). Os valores de eficiência da reação, corrigidos para porcentagem, foram entre 97 e 99% de eficiência.

c) Quantificação relativa dos transcritos gênicos

Para a quantificação relativa dos transcritos, cada amostra foi avaliada em triplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cuja diferença de amplificação, valores de Cts, não excedeu meio ciclo (LIVAC & SCHMITTGEN, 2001). Em todas as placas foram realizados controles negativos das reações para os genes estudados, sendo que nessas reações adicionou-se 2 µL de água *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) em substituição da amostra. Assim, as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas. Ainda, foram desconsideradas amostras que não amplificaram ou amplificaram com Ct ≥ 38. O valor de *threshold* e a linha de base (*Baseline*) foram determinados automaticamente pelo *StepOne Software v2.0.2*. do aparelho *StepOne* ™ System (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA).

A normalização e a quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAC & SCHMITTGEN, 2001). A média dos valores da expressão dos genes endógenos (ACTB e GAPDH) foi utilizada para obtenção do valor do ΔCt [ΔCt = Ct (Gene alvo) – Ct (Endógenos) em cada amostra. Os resultados (ΔCt) foram utilizados para o cálculo das diferenças dos valores de expressão entre as amostras e o calibrador obtendo-se os valores de ΔΔCt. Assim, para reportar os valores do grupo controle comparado ao grupo de pacientes foi aplicada a seguinte fórmula:

$$RQ\ (\text{Quantificação Relativa}) = 2{-}\Delta Ct$$

Onde:

$$\Delta Ct(\text{Controle}) = [Ct\ (\text{Gene-alvo}) - Ct\ (\text{Endógenos})]$$

Usando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, os dados são representados como a diferença (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada para o gene endógeno de referência, sendo relativa ao calibrador (controle). Para o calibrador, o valor de ΔΔCt é igual a zero, sendo $2^0 = 1$. Assim, mudanças na expressão gênica relativa ao calibrador são relativas ao valor 1 (LIVAC & SCHMITTGEN, 2001).

3.3.4. Sequenciamento de Nova Geração dos miRNAs

O sequenciamento das amostras de miRNAs foi realizado utilizando equipamento *MiSeq-Ilumina System* (Illumina) a partir de amostras de RNA total dos grupos amostrados, cujo resultado foi cedido pela Dra Juliana Massaro do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP-USP.

3.3.5. Análise *in silico* de identificação dos miRNAs alvos para *LGALS-1* e *HLA-G.*

Foram realizadas buscas nos seguintes bancos de dados microRNA.org, mirDIP, mirGATOR, mirWALK, PICTAR, mirBase, TargetScan, RepTar para identificação dos possíveis miRNAs alvos para as sequências de *LGALS-1* e HLA-G. Dentre os parâmetros definidos estão complementariedade à região 3'UTR, 5'UTR, e regiões do mRNA. Ainda foi realizada a busca destes miRNAs alvos para as

sequências de *LGALS-1* e HLA-G já descritos e validados para o diabetes *mellitus* tipo 1 em banco de dados como miR2Disease, mirDISEASE.

3.3.6. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA.

As quantificações proteicas de HLA-G e GAL-1 foram realizadas em amostras de plasma dos pacientes diagnosticados com DM1 e indivíduos controles diluídas na proporção 1 amostra: 2 PBS 1x estéril por meio da técnica ELISA de captura. Como referência padrão do ensaio, curva de diluições seriadas das proteínas recombinantes humanas, HLA-G e GAL-1, nas concentrações 2,4 µg/mL, 1,2 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,15 µg/mL, 0,075 µg/mL e 0,0325 µg/mL e amostras biológicas de indivíduos controles positivos, no caso, gestante no 5° mês de gestação e indivíduo com prescrição de consumo diário e contínuo de dexametasona, foram utilizados como referências do ensaio.

Para quantificação proteica de Gal-1, 50µL anticorpo primário de captura na proporção 1:1.000 do soro imune anti-Gal-1 diluído em PBST com 1% BSA, foi adsorvido em de placa de alta afinidade de fundo chato, *overnight*. Em seguida, foi adicionado 150µL de 3%BSA, por intervalo de 2 horas, sob agitação, em temperatura ambiente e, quatro etapas de lavagem com PBST foram realizadas. Posteriormente, as amostras biológicas foram dispostas em seus respectivos poços sendo mantidas em agitação por 2 horas. Novamente, as etapas de lavagem foram realizadas e, adicionamos 50µL de anticorpo primário, na proporção 1:1.000, de purificado de IgY anti-Gal-1 diluído em PBST com 1%BSA, por 2 horas. Seguido as etapas de lavagem houve a incubação do anticorpo secundário conjugado coelho ECL™ Anti-Galinha IgY, HPL *Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) na proporção de 1:5000, por 1 hora. Por fim, as etapas de lavagem se repetiram e realizamos o procedimento de revelação com solução TMB conforme descrito anteriormente, e os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 450nm.

A quantificação proteica de HLA-G procedeu com as mesmas etapas descritas anteriormente, excetuando os reagentes que foram 50µL de anticorpo primário de captura, na proporção 1:1.000 do soro imune anti-HLA-G5 diluído em

PBST com 1%BSA; 50µL de anticorpo primário, na proporção 1:1.000, de purificado de IgY anti-HLA-G5 diluído em PBST com 1% BSA e, 50µL de anticorpo secundário conjugado coelho ECL™ Anti-Galinha IgY, *HPL Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), na proporção 1:5.000, por 1 hora. O procedimento de revelação, também, foi realizado como descrito anteriormente.

3.4. Análise do efeito imunorregulatório de GAL-1 e HLA-G em modelo experimental induzido quimicamente ao DM1.

3.4.1. Animais

Para o presente ensaio foram utilizados 12 machos da linhagem C57BL/6 ($LGALS^{+/+}$) isogênicos criados no biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto e, 12 machos da linhagem C57BL/6 *knockout LGALS-1* ($GAL\text{-}1^{-/-}$) (Protocolo CTNBio 0019/97-013), criados no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto. Todos com peso aproximado de 15-25g, glicemia ≤ 200mg/dL, foram mantidos isolados em câmara isoladora (Alesco®, São Paulo, Brasil) contendo poros de 0,45 mm para a filtragem do ar, em temperatura constante de 25 °C, ciclo de iluminação de 12 horas, com maravalha, água e ração *ad libitum*, divididos em grupos de 4 e 8 animais para cada uma das linhagens.

Os procedimentos experimentais foram realizados conforme aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto protocolo n°15.1.636.60.2, no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto ,.

3.4.2. Indução química por estreptozotocina (STZ) ao diabetes *mellitus* tipo 1 experimental.

O diabetes *mellitus* tipo 1foi induzido quimicamente pela administração intraperitoneal da solução de 40mg/dL de estreptozotocina (STZ) diluída em 0,01M citrato de sódio, pH 4,5, enquanto, os grupos controles receberam injeção de tampão de solução 0,01M citrato de sódio, pH 4,5. A indução química ocorreu

diariamente por cinco dias e as aferições dos níveis de glicose, em glucosímetro *Accu-Chek Go* (Roche, Penzberg, Alemanha), ocorreram nos dias 0, 7° e 15° dia após a indução experimental. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram duas determinações consecutivas de níveis glicêmicos ≥ 200 mg/mL após a indução experimental. No 15° dia os animais foram eutanasiados conforme descrito anteriormente e os órgãos pâncreas, rim, timo, baço e linfonodos pancreáticos foram coletados.

3.4.3. Imunofenotipagem das células dos linfonodos pancreáticos.

Linfonodos pancreáticos foram extraídos e macerados em peneira *Tamis Cellular, cell strainer* 70µm, com a utilização de êmbolo de seringa, nas quais as células foram coletadas em meio RPMI 1640 e, posteriormente, centrifugadas a 300g por 10minutos, à 4°C. O botão celular foi ressuspendido em meio RPMI 1640, as células foram contadas em câmera de *Neuarbauer* e, cerca de 0,5 x 10^6 células dos linfonodos pancreáticos foram obtidas de cada grupo de animais.

Os anticorpos utilizados para a imunofenotipagem foram CD3ε (145-2C11), APC-Cy7; CD4 (RM4-5), PerCP; CD8a (53-6,7), FITC; CD19 (1D3), PE; CD49b (HMα2), APC; CD11b (M1 / 70), FITC; F4/80 (T45-2342) PE, CD11c (HL3), Pe-Cy7; Ly6G (1A8) APC, os quais foram incubados com as células dos linfonodos pancreáticos, previamente lavadas em solução contendo PBS 1x com 0,1% BSA para remoção do meio de cultura, durante 30 minutos, a 4°C. Todos os anticorpos foram obtidos de BD Bioscience ou eBioscience.

Posteriormente ao período de incubação, as células foram novamente lavadas e fixadas em solução contendo 1% de formaldeído 37% em PBS 1x e centrifugadas a 1600 rpm, durante 5 minutos, à 4°C. As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BDBioscience, New Jersey, EUA) utilizando o software BD FACSCANTO CLINICAL (BDBioscience, New Jersey, EUA) para aquisição dos dados. Os índices de fluorescência específico (SFI) foram calculados a partir da divisão da média de fluorescência do anticorpo alvo pela média de fluorescência do anticorpo controle. SFI de 1,5 foi considerado como positivo. Os dados de citometria foram analisados utilizando o *software* FlowJo versão 7.6.3

3.4.4. Análise Histoquímica e Imunohistoquímica

Porção da cabeça do pâncreas foi coletada, fixada em formalina a 10% por 24horas, incorporada em parafina, submetida a cortes seriados de 5 µm e fixadas em lâminas para análise histoquímica e imunohistoquímica.

a) Coloração de Hematoxilina e Eosina

As secções pancreáticas devidamente fixadas em lâminas foram desparafinadas com 3 banhos de xilol por 10 minutos cada banho, hidratadas pela sequência decrescente de álcool na solução de banho: álcool absoluto por 2 minutos, álcool absoluto por 5 minutos, álcool 95% por 2 minutos, álcool 85% por 2 minutos, álcool 70% por 2 minutos, água corrente, ácido pícrico, água corrente, solução de hematoxilina por 15 minutos, água corrente, solução de eosina por 2 minutos e hidratação pela sequência crescente de álcool, álcool 70% por 2 minutos, álcool 85% por 2 minutos, álcool 95% por 2 minutos, álcool absoluto por 5 minutos e 3 banhos de xilol por 10 minutos para diafanização das secções.

As alterações morfológicas das secções coradas foram examinadas em microscópio óptico e classificadas quanto à insulite, conforme Anderson & Bluestone, 2005, em 0: não insulite, 1: peri-insulite, definida pela presença dos infiltrados mononucleares ao redor das ilhotas de Langerhans e, 2: insulite, definida pelo progresso e invasão dos infiltrados mononucleares .

b) Imunodetecção de Insulina no tecido pancreático

As lâminas das secções pancreáticas foram desparafinadas em 3 banhos de xilol, sendo 10 minutos para cada banho, hidratadas em série alcoólica a 100%, 95%, 85% e 70% até água destilada conforme descrito anteriormente e, incubadas em banho maria em solução tampão citrato de sódio 10mM pH6,0, a temperatura de 90°C, por 30 minutos, para ocorrência da recuperação antigênica. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS pH7,4 e incubados com ~200µL de reagente de bloqueio da peroxidase (Dako) por secção, por 15 minutos, para inibição da atividade da peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas com PBS pH7,4 e secas, para assim, realizar o bloqueio de reações inespecíficas às secções com solução 3% BSA em PBS por 30 minutos. Novamente, as secções foram lavadas e foi adicionado anticorpo primário monoclonal de coelho anti-mouse de insulina

(Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluído na proporção 1:200 em 3% BSA em PBS, *overnight,* em câmara úmida. As secções foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado burro ECL™ anti-coelho, *HPL Species-Specific Whole Antibody* (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK), diluído na proporção 1:200 em 3% BSA em PBS, por 1 hora, em câmara úmida. As secções foram coradas com diaminobenzidina (DAB) conforme instruções do fabricante, coradas com hematoxilina por 40 segundos, hidratadas pela série alcoólica 70%, 85%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, montadas e analisadas em microscópio óptico.

3.4.5. Detecção de translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos.

As suspensões celulares compostas por linfonodos pancreáticos foram obtidas de animais Lgals-1$^{+/+}$ ou Lgals-1$^{-/-}$, previamente tratados com STZ ou tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5 – veículo). Estas suspenssões (0,5 x 10^6 células totais) foram transferidas para placas de cultura contendo o meio ágar BHI e incubadas por 48 horas a 37°C para determinação de suas cargas bacterianas. A quantificação destas cargas foram feitas pela determinação de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL).

3.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizados com o *software SPSS statistics* versão 22.0 e os dados plotados em gráficos no *software GraphPad Prism* versão 5.0. Todos os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de Normalidade, Teste de *Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov* (*K-S test*). Em caso afirmativo, foram aplicados testes paramétricos de acordo com o número dos grupos de variáveis: (i) dois grupos: teste *t-student two tailed*; (ii) três grupos: teste *One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison*. Para as amostras que não passaram pelo teste de normalidade foi adotado testes estatísticos não paramétricos de acordo com o número dos grupos de variáveis: (i) dois grupos: teste *Mann-Whitney two-tailed*; (ii) três ou mais grupos: teste *Kruskal Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison*. Com o intuito de correlacionar as variáveis amostradas foram realizados análise de

regressão múltipla linear e estatísticas descritivas. O nível de significância estatística adotado foi definido para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento de ferramentas experimentais

Neste tópico serão expostos os resultados cujas estratégias obtiveram êxito ou atingiram o maior grau de refinamento possível para obtenção das proteínas recombinantes humanas HLA-G5 e HLA-G6 e, seus respectivos anticorpos.

4.1.1. Obtenção da proteína recombinante rhGST-HLA-G5

A proteína recombinante rhGST-HLA-G5 foi obtida em estado de agregados em corpos de inclusão e em presença de proteína contaminante não reativa ao anticorpo monoclonal MEM-G1 que reconhe a cadeia pesada de todas as isoformas de HLA-G (MENIER *et al.,* 2003).

A expressão proteica de rhGST-HLA-G5 foi realizada em bactérias da linhagem *E. coli Rosetta(DE3)pLYS* transformadas ou não com o plasmídeo contendo o fragmento gênico do GST-HLA-G5, sob condições de indução a 100µM IPTG, a 18°C, *overnight* (Figura 5A, linhas 2 e 1). A presença de corpos de inclusão no material não soluvel (Figura 5A, linha 4) nos direcionou para realização de procedimento de desnaturação por meio das etapas de lavagem como descrito no item 3.1.1.3 da seção de material e métodos. A Figura 5A (linha 5) ilustra o perfil eletroforético da solução obtida com resultado do processo de desnaturação dos corpos de inclusão.

Para caracterização bioquímica, amostra de rhGST-HLA-G5 extraída do gel de SDS-PAGE 15% de peso molecular aparente, 64kDa, foi submetida a análise dos digestos trípticos em espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS resultando na homologia de 35% de cobertura de rhGST-HLA-G5 à isoforma nativa. As sequências peptídicas foram K.DYLALNEDLR.S (611.3096 m/z na posição 146 a 155), R.SWTAADTAAQISK.R (675.3474 m/z na posição 156 a 168), R.YLENGKEMLQR.A + Oxidation (M) (466.2474 m/z na posição 195 a 205), K.WAAVVVPSGEEQR.Y (714.377 m/z na posição 268 a 280), R.FIAMGYVDDTQFVR.F (831.4206 m/z na posição 46 a 59), R.FIAMGYVDDTQFVR.F + Oxidation (M) (839.3848 m/z na posição 46 a 59); R.APWVEQEGPEYWEEETR.N (1067.9679 m/z na posição 73 a 89), R.GYEQYAYDGKDYLALNEDLR.S (799.3692 m/z na posição 136 a 155),

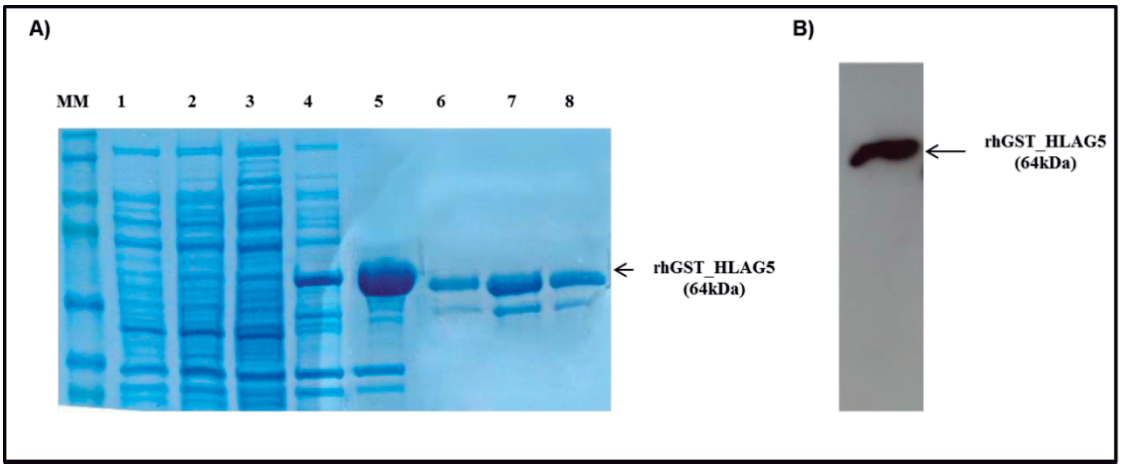
R.DGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQK.W (879.0785 m/z na posição 244 a 267) conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2: Sequências peptídicas resultantes da análise dos digestos trípticos em espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS.

Descrição da proteína	Peptídeo esperado mr	Peptídeo _calc_mr	Peptídeo Score	Peptídeo esperado	Resíduo anterior ao peptídeo	Sequência Peptídica
			Homologia à sequência HLA-G			
rhGST-HLA-G5	1220.6046	1220.6037	0.0010	60	0.0027	K.DYLALNEDLR.S
rhGST-HLA-G5	1348.6802	1348.6623	0.0180	55	0.0073	R.SWTAADTAAQISK.R
rhGST-HLA-G5	1395.7204	1395.6816	0.0388	26	5.5	R.YLENGKEMLQR.A + Oxidation (M)
rhGST-HLA-G5	1426.7408	1426.7206	0.0204	63	0.0012	K.WAAVVVPSGEEQR.Y
rhGST-HLA-G5	1660.8266	1660.7919	0.0347	76	5.4e-005	R.FIAMGYVDDTQFVR.F
rhGST-HLA-G5	1676.7550	1676.7869	-0.0318	55	0.0067	R.FIAMGYVDDTQFVR.F + Oxidation (M)
rhGST-HLA-G5	2133.9212	2133.9279	-0.0067	79	2e-0.05	R.APWVEQEGPEYWEEETR.N
rhGST-HLA-G5	2395.0858	2395.0968	-0.0110	81	9.9e-0.06	R.GYEQYAYDGKDYLALNEDLR.S
rhGST-HLA-G5	2634.2137	2634.2046	0.0091	81	8.5e-0.06	R.DGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQK.W
			Homologia à sequência GST			
rhGST-HLA-G5	1531.8118	1531.7916	0.0203	90	2.4e-006	R.AEISMLEGAVLDIR.Y + Oxidation
rhGST-HLA-G5	1817.0041	1816.9353	0.0688	50	0.019	K.ERAEISMLEGAVLDIR.Y + Oxidation

Com o objetivo de enriquecer a preparação de rhGST-HLA-G5 foi realizada diálise por meio do uso de um sistema de ultradiafiltração (Amicon® - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) de *cut-off* de 50kDa, o que nos gerou uma preparação proteica contendo a proteína de interesse e uma proteína contaminante (Figura 5A, linha 6,7 e 8).

Figura 5: Obtenção e caracterização da proteína recombinante rhGST-HLA-G5. A) Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhGST_HLA-G5. MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem transformação com o vetor pGEX-6p2, 2) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG 3) Fração solúvel do extrato proteico bacteriano, sobrenandante, com indução IPTG, 4) Fração insolúvel do extrato proteico bacteriano, botão proteico,com indução IPTG 5) Corpo de Inclusão recuperado e solubilizado com 8mM uréia (64kDa), 6,7 e 8) Amostra ultrafiltrada em amicon *cut off* 50kDa (64kDa). B) Caracterização imunoquímica da proteína rhGST-HLA-G5 com anticorpor comercial MEM-G1 reativo a cadeia pesada do HLA-G desnaturado.



Por fim, realizamos a caracterização imunoquímica de rhGST-HLA-G5, por meio de um ensaio de *Western Blotting* com o uso de anticorpo comercial MEM-G1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), o qual resultou na detecção exclusiva da proteína recombinante (Figura 5B).

4.1.2. Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6

Obtivemos a proteína recombinante rhHLA-G6 em condições solúveis e de levado grau de homogeneidade quando expressa em vetor pET28a_Sumo modificado.

O protocolo de expressão de rhHLA-G6 foi feito com o auxílio de bactérias da linhagem *E. coli Rosetta(DE3)pLYS* como descrito no item 3.1.1.2 da seção de materiais e métodos. A linha 2 da figura 6A mostra que foi possível induzir a expressão da proteína recombinante His6-tagged SUMO-HLA-G6, entretanto, esta proteína esta preferencialmente localizada na fração insolúvel (Figura 6, linha 4) e apresentou massa molecular aparente de 44,41 kDa. O material insolúvel foi recuperado por etapas de incubação e lavagem em detergente Triton X e desnaturada em solução contendo 3% detergente aniônico SLS, sob condições de inversão, a 20°C, *overnight* (Figura 6, linha 5).

Concluido o processo de desnaturação, a preparação da proteína recombinante His6-tagged SUMO-HLA-G6 foi submetida à purificação em coluna de afinidade em Ni^{+2}, cuja afinidade da cauda de histidina ao metal promoveu a imobilização da proteína e favoreceu o processo de *refolding* durante a troca dos tampões, da solução desnaturante 3% SLS para solução de ligação da coluna. A nte purificação de His6-tagged SUMO-HLA-G6 foi feita em gradiente de concentração de 0 a 100% de imidazol e sua eluição da coluna ocorreu a 32% deste reagente (160mM) (Figura 6, linha 6).

Com o êxito da obtenção de uma preparação homogênea de His6-tagged SUMO-HLA-G6, foi realizada a caracterização bioquímica por analise em espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS que confirmou a homologia da proteína recombinante à isoforma nativa de HLA-G6 em 42% de cobertura das sequências de aminoácidos analisadas. Essas foram GYYNQSEANPPK (684.3108m/z na posição 107 a 118), WAAVVVPSGEEQR (714.3174 m/z na posição 176 a 188), FIAMGYVDDTQFVR (831.3739 m/z na posição 46 to 59), THVTHHPVFDYEATLR (641.6508 m/z na posição 119 a 134), APWVEQEGPEYWEEETR (1067.9755 m/z na posição 73 a 89), DGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQK (879.0861 m/z na posição 152 a 175), QNCYNPSYESTYR (1625.07 m/z na posição 249 a 261) e SGVYQHNFGDSIGLHAVR (1957.32 m/z na posição 303 a 320) conforme Tabela 3.

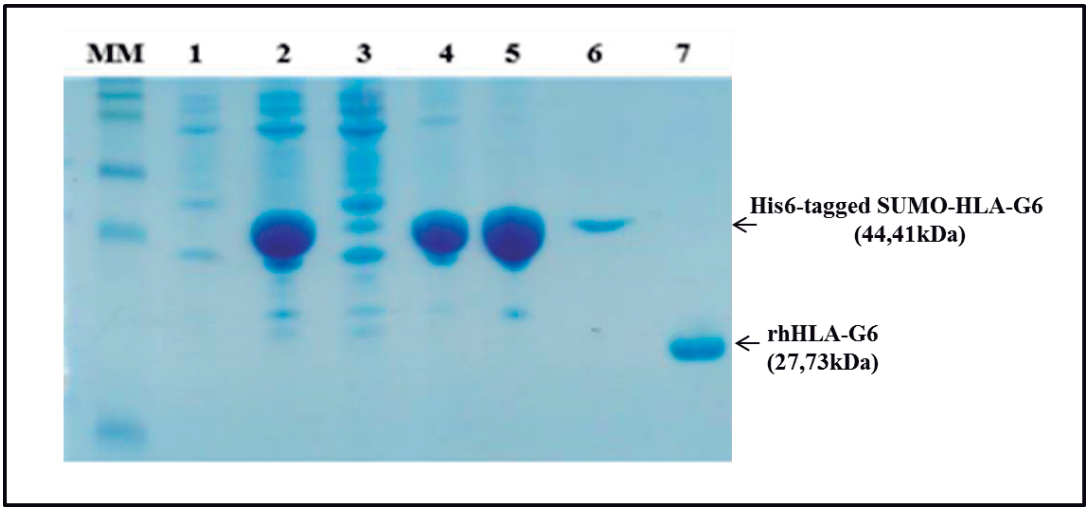
Tabela 3: Lista dos digestos trípticos resultantes da caracterização da proteína His_6-tagged SUMO-HLA-G6.

Descrição da proteína	Peptídeo esperado mr	Peptídeo _calc_mr	Peptídeo Score	Peptídeo esperado	Resíduo anterior ao peptídeo	Sequência Peptídica
rhHLA-G6	1366.6070	1366.6153	61.25	0.0018	R	GYYNQSEANPPK
rhHLA-G6	1426.6202	1426.7205	71.88	0.00016	K	WAAVVVPSGEEQR
rhHLA-G6	1660.7332	1660.7919	81.29	1.6e-005	R	FIAMGYVDDTQFVR
rhHLA-G6	1921.9306	1921.9435	45.24	56	K	THVTHHPVFDYEATLR
rhHLA-G6	2133.9364	2133.9279	78.79	2.1e-005	R	APWVEQEGPEYWEEETR
rhHLA-G6	2634.2365	2634.2046	68.92	0.00016	R	DGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQK

Seguindo o processo de obtenção da isoforma recombinante, a proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6 foi dialisada e submetida à clivagem enzimática pela ULP1, cuja digestão ocorreu nos motivos Gly-Gly na região C-terminal de SUMO, o que gerou a proteína rhHLA-G6 livre da fusão, a qual foi recuperada no *flow throught*

da de etapa de purificação em coluna de afinidade em Ni^{+2}, cujo massa molecular aparente foi de 27,8 kDa (Figura 06, linha 7).

Figura 6: Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6. Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhHLA-G6 MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG, 2) Extrato proteico bacteriano induzido com IPTG, 3) Sobrenadante do extrato bacteriano induzido, 4) Botão proteico do extrato bacteriano induzido, 5) Corpo de inclusão desnaturado, 6) Proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6 eluida de HisTrap FF, 7) rhHLA-G6 purificada.



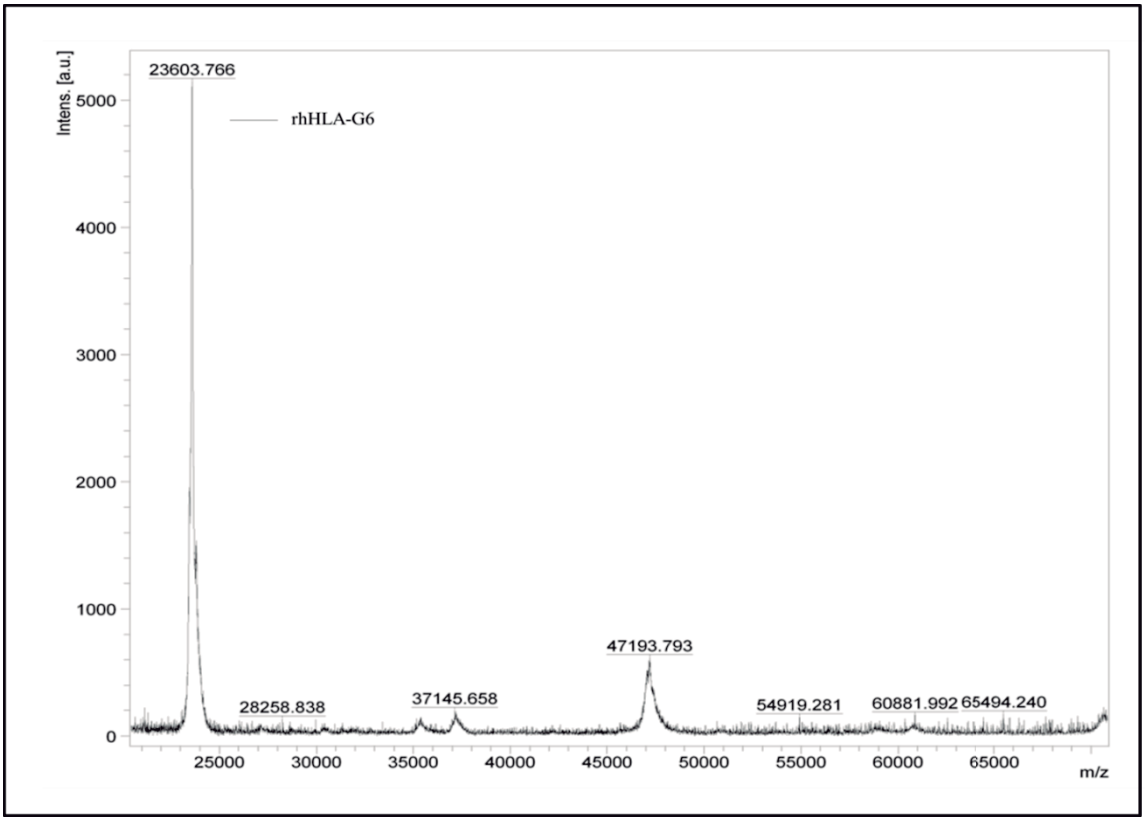
Por meio do ensaio de dispersão dinâmica de luz o estado estrutural da proteína rhHLA-G6 foi definido como solúvel e polidisperso apresentando raio hidrodinâmico de 6 ± 2 nm, índice de polidispersividade (PDI) de 24%±5 contendo um componente majoritário correspondente a 99.95 % da preparação (Tabela 4). Estes achados indicam que o procedimento de solubilização dos corpos de inclusão da rhHLA-G6 foi eficiente e que a preração obtida é homogênea e flexível. A ausência de depósitos cristalográficos referentes ao HLA-G6 inviabilizou a caracterização do padrão oligomérico do rhHLA-G6 a partir do diâmetro da proteína nativa de HLA-G6.

Numa próxima etapa foi determianda a massa molecular da forma recombinante do rhHLA-G6 por espectrometria de massas por MALDI-TOF/TOF. Os resultados indicaram a de 23.600,865 *m/z* (Figura 07).

Tabela 4: Análise do estado estrutural da proteína rhHLA-G6 em ensaio de dinâmica de dispersão de luz.

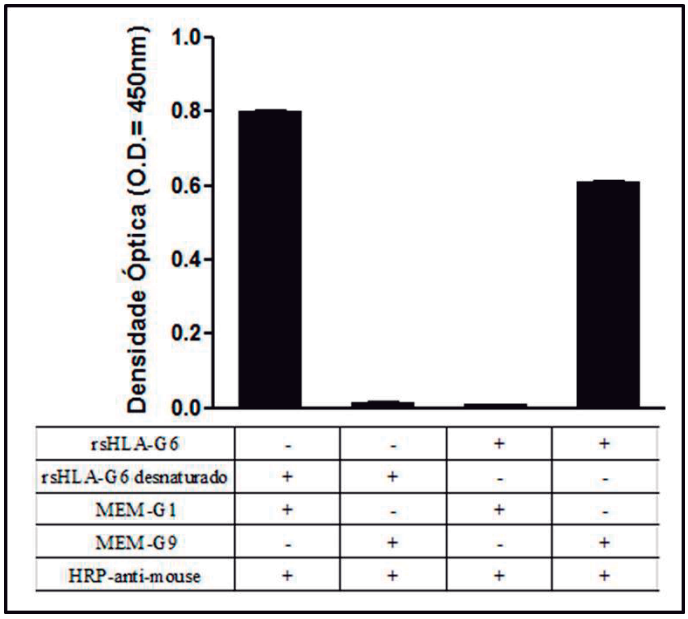
Raio Hidrodinânimco (nm)	%Polidispersividade	% Massa	Polidispersividade
6 ± 2	24±5	99.95	polidispersa

Figura 7: Determinação da massa molecular de rhHLA-G6 por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.



Por fim, realizamos a caraterização imunoquímica, por ensaio de *ELISA*, utilizando formas nativas e desnaturadas da proteína rhHLA-G6. O anticorpo monoclonal MEM-G9 apresentou reatividade à proteína em seu estado conformacional nativo, enquanto, o anticorpo monoclonal MEM-G1 detectou o rHLA-G6 em condições desnaturantes (Figura 08). Esse resultado sugere que a proteína rhHLA-G6 pode apresentar atividade biológica funcional semelhante à proteína nativa, sendo necessários a realização de futuros experimentos para validação desta hipótese.

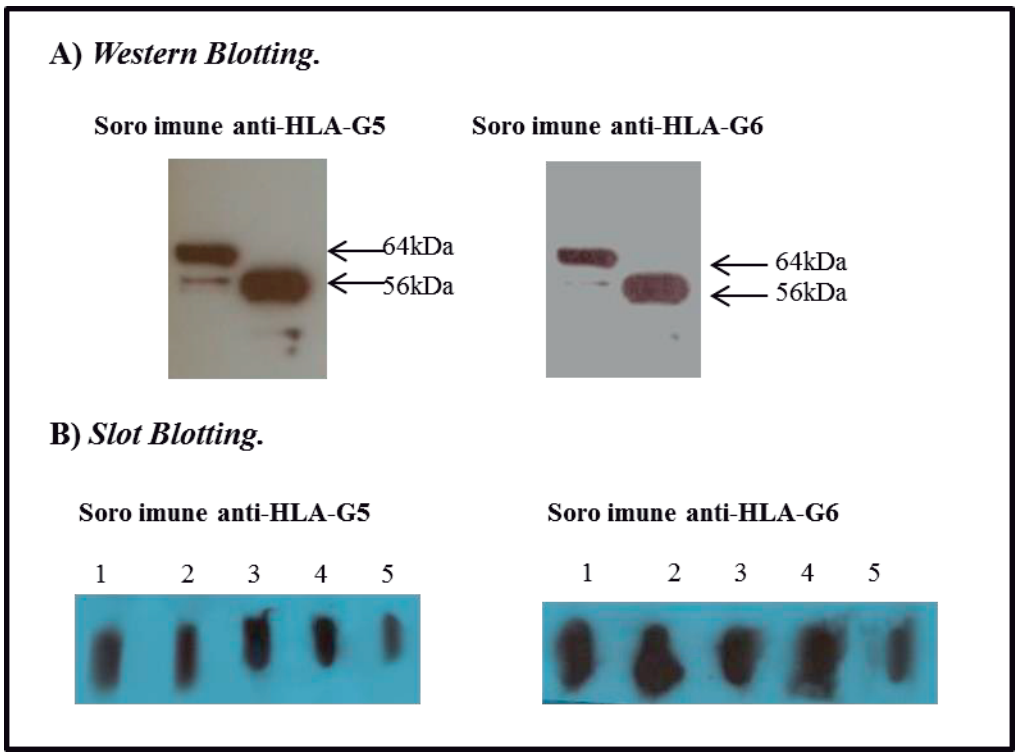
Figura 8: Imunodetecção de rhHLA-G6, nativo ou desnaturado, reativos aos anticorpos comerciais MEM-G1 e MEM-G9.



4.1.1. Obtenção de anticorpos reativos às proteínas HLA-G.

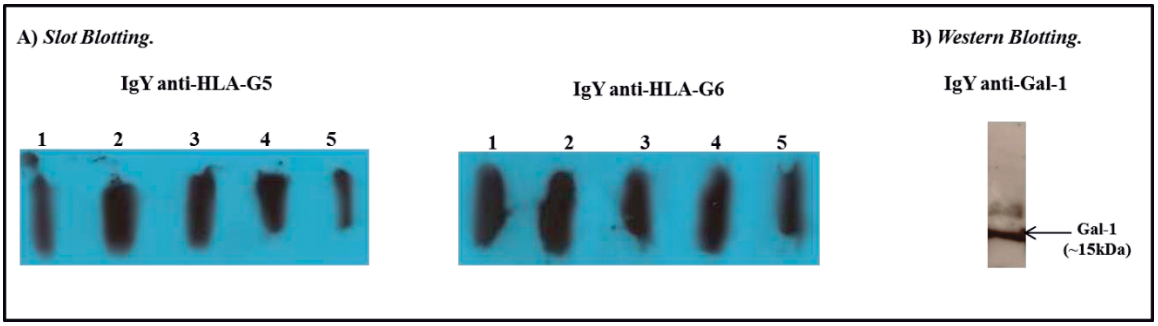
A reatividade dos anticorpos anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6 produzidos em nosso laboratório evidencia o reconhecimento de epitopos comuns a ambas isoformas proteicas de HLA-G5 e HLA-G6. Preparações de IgY anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6 reconheceram apenas as forma nativas destas proteínas (Figura 10) enquanto soroimunes de camundongo ou anticorpos monoclonais anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6 reconheceram estas proteínas recombinantes em condições nativas e/ou desnaturantes (Figuras 9 e 11).

Figura 9: Caracterização da reatividade dos soros imunes anti-HLA-G. A) Ensaio de *Western Blotting* para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de HLA-G5 e HLA-G6, B) Ensaio de *Slot Blotting* para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria *Rosetta(DE3)*pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria *Rosetta(DE3)*pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5.



É observado que os anticorpos policlonais também apresentaram reatividade a algumas proteínas bacterianas, contexto este esperado dado ao uso de bactérias da linhagem *Rosetta(DE3)*pLYS atenuadas ou macerado proteico de extrato bacteriano no processo de imunização. Esses foram utilizados com a finalidade de potencializar a resposta imune humoral e celular contra imunógenos co-administrados nos animais.

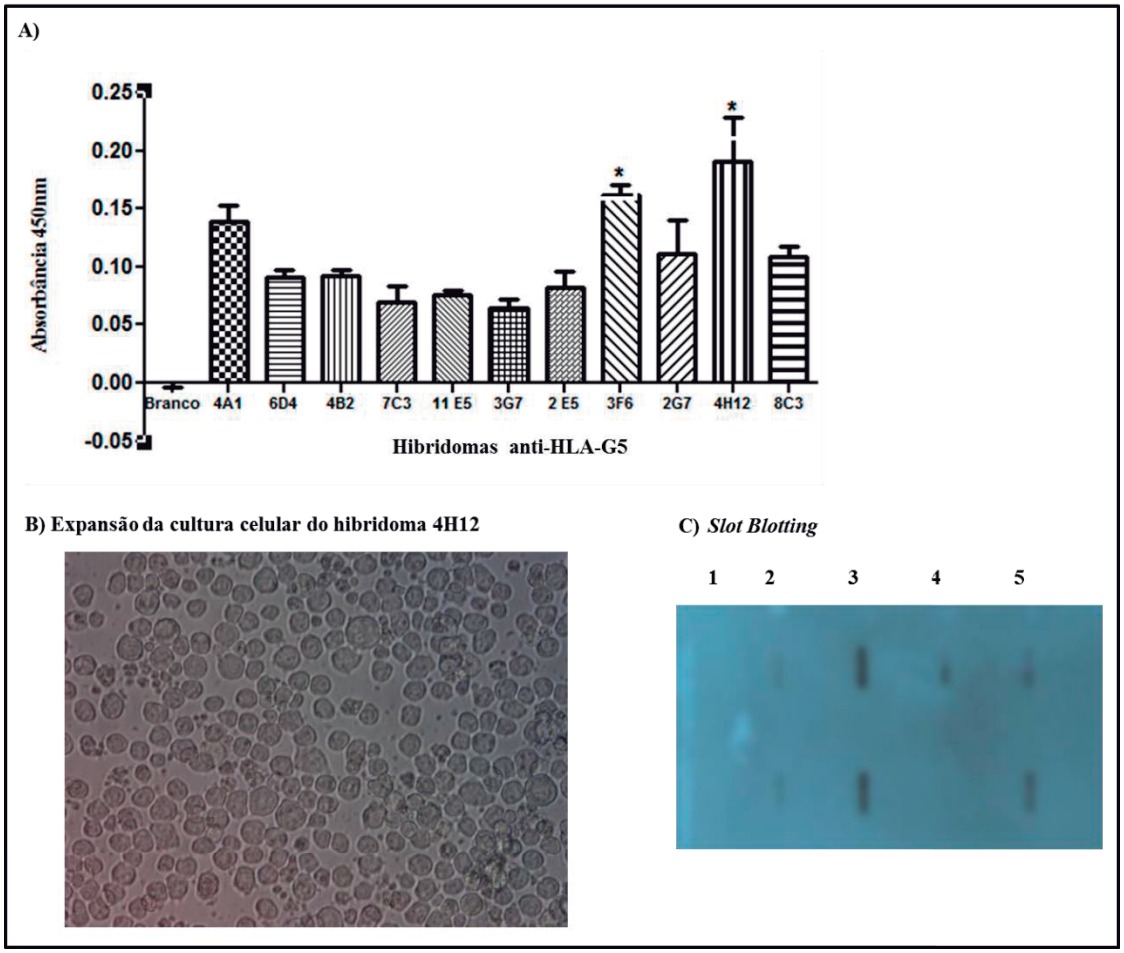
Figura 10: Caracterização da reatividade dos anticorpos IgY anti-HLA-G e IgY anti-Gal-1. A) Ensaio de *Slot Blotting* para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria *Rosetta(DE3)*pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria *Rosetta(DE3)*pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5. B) Ensaio de *Western Blotting* para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de Ga-1.



O resultado relevante nos ensaios de *Slot Blotting* foi o reconhecimento dos anticorpos policlonais pela a proteína rhHLA-G5, cedida pelo Prof. Dr. Benoit Favier do "Insitute of Emerging Diseases and Innovative Therapy – CEA/IMVA -University Paris-Sud - Inserm – France", a qual serviu de antígeno de referência, evidenciando o espectro de reconhecimento dos anticorpos produzidos pelas isoformas de HLA-G, não se restrigindo apenas às proteínas recombinantes antigênicas, portanto, comprovando a reatividade dos nossos anticorpos na detecção das isoformas do HLA-G (Figura 09B *slot* 5, 10A *slot* 5 e 11C *slot* 5).

A produção dos anticorpos monoclonais anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6 resultou na identificação de 2 hibridomas (4H12 e 3F6) produtores de anticorpos reativos ao rhHLA-G5 (Figura 11 A) e 4 hibridomas (17, 21, 32 e 33) produtores de anticorpos reativos rhHLAG6 (dados não mostrados). As etapas de seleção e expansão dos hibridomas anti-HLA-G5 foram acompanhadas por microscopia ótica convencional, conforme ilustrado na Figura 11B.

Figura 11: Caracterização da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. A) Ensaio de imunodetecção por ELISA indireto seguido do teste estatístico *One-Way Anova* para identificação dos potenciais hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. B) Expansão da cultura celular do hibridoma 4H12 após 15 dias de seleção em meio HAT observado em microscopia de contraste de fase em objetiva 40X. C) Ensaio de *Slot Blotting* para avaliação da reatividade do *pool* de alíquotas do sobrenadante de cultura dos hibridomas 4H12 e 3F6 nas amostras 1) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS sem indução ao IPTG 2) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS expressando rhGST-HLA-G5 3) rhGST-HLA-G5 4) rhGST-HLA-G6 e 5) rhHLA-G5.



4.1. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes diagnosticados com DM-1.

4.1.1. Perfil de expressão gênica de *HLA-G e LGALS-1* no DM1 analisada por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

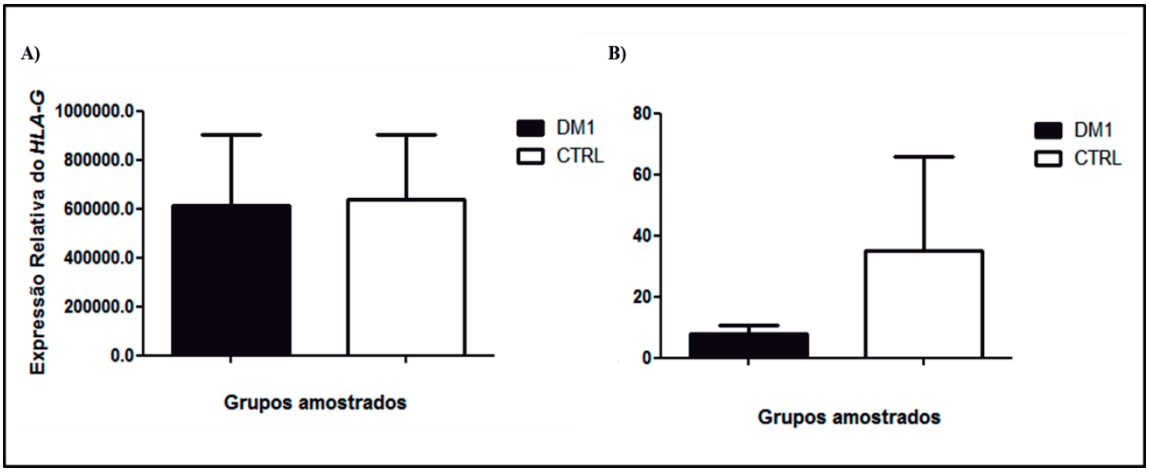
A expressão gênica do *HLA-G* em pacientes diagnosticados com DM1 não apresentou diferença quantitativa quando comparado aos indivíduos controles segundo o teste estatístico *Mann-Whitney two-tailed* com significância estatística *pvalue*<0,05, que resultou em um *pvalue*=0,6365. Os pacientes DM1 apresentaram

a média do $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ = 612157,28 ± S.D = 1615094,45 enquanto nos indivíduos controles a média do $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ = 640638,13 ± S.D. = 1338597,84. Portanto, o perfil gênico de *HLA-G*, neste contexto biológico, é praticamente ausente (Figura 12A).

Quanto ao perfil de expressão gênica de *LGALS*-1, também é observado à ausência de diferença quantitativa dos transcritos gênicos entre os indivíduos DM1 e os indivíduos controles conforme o teste estatístico *Mann-Whitney two-tailed* com significância estatística *pvalue*<0,05, que resultou *pvalue*=0,6711. Os pacientes DM1 apresentaram a média do $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ =7,77 ± S.D = 15,49 enquanto nos indivíduos controles a média do $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ =35,23 ± S.D. = 156,19. Portanto, o perfil de expressão gênica de *LGALS-1*, neste contexto biológico, aproxima-se do perfil de expressão constitutiva de *GAPDH* (Figura 12 B).

É observado que quanto maior o valor de $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ maior é a diferença comparativa do gene em estudo em relação ao gene constitutivo, denominado como gene calibrador.

Figura 12: Perfil da expressão relativa dos transcritos gênicos ***HLA-G*** **(A) e** ***LGALS-1*** **(B). Representação da Expressão Relativa representativo da média dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Valores de expressão relativa expressos como** *fold change* **em relação aos valores do grupo controle de valor 1). O teste de** *Mann Whitney* **foi aplicado.**

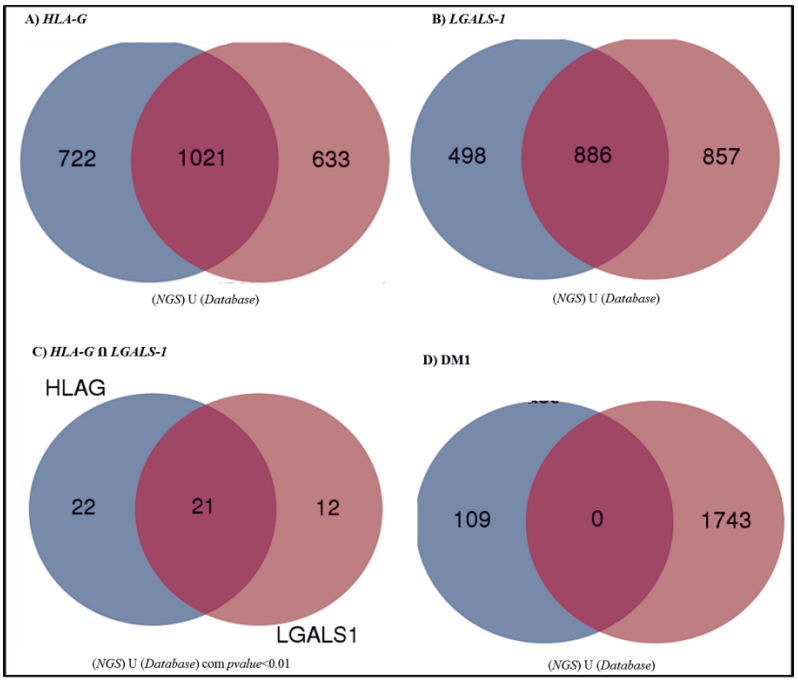


4.1.1. Identificação, *in silico,* de miRNAs para *LGALS-1* e HLA-G e associados ao DM1 a partir dos miRNAS sequenciados de pacientes e indivíduos controles.

A partir do sequenciamento do material biológico dos pacientes com DM1 foi possível identificar 1746 miRNAs (dados fornecidos pela Dra. Juliana Massaro do

Laboratório de Imunologia Clínica da FMRP-USP). Em seguida, foi feita uma análise comparativa, *in silico*, entre estes 1746 miRNAs com os miRNAs validados e/ou preditos, obtidos de bancos de dados, que possuem como alvos os transcritos gênicos para *HLA-G* (1654), *LGALS-1* (1384) e DM1 (109). Como resultado, foram identificados 1021 para *HLA-G*, 886 para *LGALS-1* e nenhum destes miRNAs foram previamente descritos e/ou validados para o DM1 (Figura 13).

Figura 13: Análise comparativa entre os miRNAs identificados pelo sequenciamento de nova geração (NGS) no contexto biológico do DM1 e os miRNAs preditos e/ou validados para os transcritos gênicos de HLA-G, LGALS-1, comuns a ambos e validados para o DM1 nos bancos de dados. A) Identificação de 1021 miRNAs alvos para o HLA-G. B) Identificação de 886 miRNAs alvos para o LGALS-1. C) Identificação de 21 miRNAs alvos comuns para o HLA-G e LGALS-1. D) Ausência de identificação para o DM1.



Os dados da análise comparativa ilustrada na figura 13 foram submetidos a um tratamento estatístico, por meio do método de contagem de *reads,* para se identificar os miRNAs que apresentaram expressão gênica significativa (*pvalue*<0,01). A Tabela 5 mostra a identificação de 44 miRNAs para os transcritos de *HLA-G*, dos quais 15 miRNAs estão induzidos e 29 miRNAs reprimidos nos pacientes DM1.

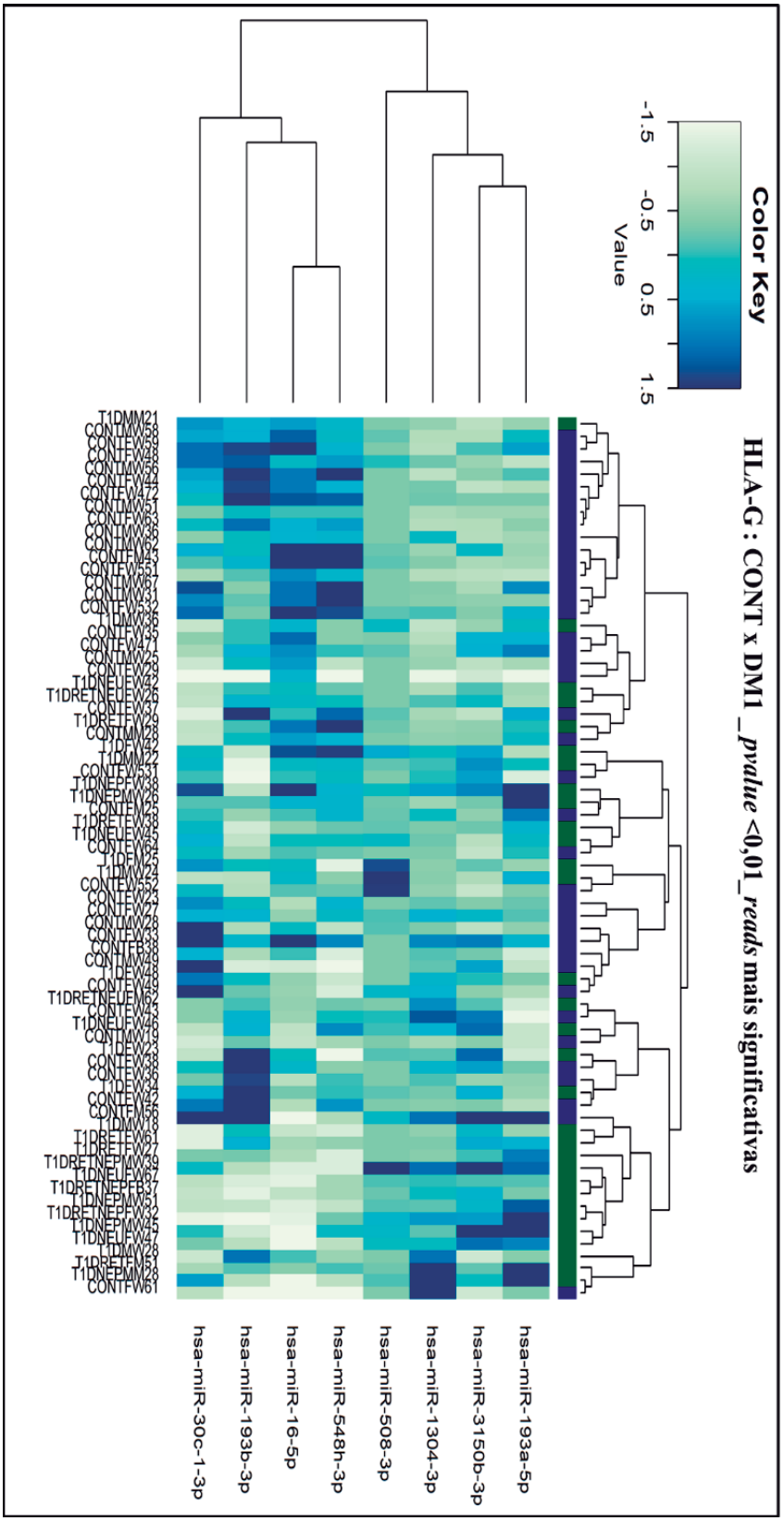
Tabela 5: Identificação dos miRNAs alvos para HLA-G comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de reads pvalue<0,01.

miRNA	logFC	*pValue*	FDR	miRNA	logFC	*pValue*	FDR
hsa-miR-4507	-1,177	0,005	0,607	**hsa-miR-16-5p**	0,334	0,000	0,000
hsa-miR-5088-5p	-1,281	0,005	0,607	**hsa-miR-3942-3p**	1,712	0,001	0,410
hsa-miR-4676-5p	-1,426	0,005	0,607	**hsa-miR-19a-5p**	1,448	0,001	0,240
hsa-miR-6734-5p	-1,157	0,005	0,607	**hsa-miR-548h-3p**	0,616	0,003	0,607
hsa-miR-449c-5p	-1,083	0,006	0,607	**hsa-miR-548z**	0,616	0,003	0,607
hsa-miR-548ap-5p	-0,609	0,006	0,607	**hsa-miR-3135a**	1,383	0,005	0,607
hsa-miR-548j-5p	-0,609	0,006	0,607	**hsa-miR-193b-3p**	0,530	0,006	0,607
hsa-miR-541-3p	-1,346	0,007	0,607	**hsa-miR-30c-1-3p**	0,366	0,008	0,618
hsa-miR-1304-3p	-0,459	0,008	0,618	**hsa-miR-374b-3p**	0,384	0,013	0,672
hsa-miR-193a-5p	-0,565	0,008	0,634	**hsa-miR-4772-3p**	0,612	0,013	0,672
hsa-miR-6842-3p	-0,396	0,010	0,672	**hsa-miR-6894-5p**	1,204	0,015	0,672
hsa-miR-1299	-1,776	0,010	0,672	**hsa-miR-4761-3p**	1,033	0,014	0,672
hsa-miR-944	-0,695	0,012	0,672	**hsa-miR-3941**	1,290	0,004	0,607
hsa-miR-6864-5p	-1,205	0,013	0,672	**hsa-miR-873-3p**	0,620	0,019	0,726
hsa-miR-6825-5p	-1,046	0,014	0,672	**hsa-miR-539-5p**	1,198	0,009	0,668
hsa-miR-99b-3p	-0,547	0,014	0,672	**hsa-miR-3150b-3p**	-0,715	0,001	0,410
hsa-miR-5010-3p	-0,636	0,015	0,672	**hsa-miR-5009-5p**	-0,953	0,008	0,618
hsa-miR-4433a-5p	-0,999	0,015	0,672	**hsa-miR-4451**	-0,746	0,019	0,746
hsa-miR-5010-3p	-0,636	0,015	0,672	**hsa-miR-509-3p**	-1,590	0,003	0,607
hsa-miR-6839-5p	-1,162	0,016	0,672	**hsa-miR-508-3p**	-1,942	0,001	0,240
hsa-miR-4734	-0,960	0,016	0,672	**hsa-miR-4741**	-1,594	0,000	0,240
hsa-miR-4784	-0,931	0,017	0,683				
hsa-miR-509-5p	-1,139	0,020	0,746				

Com o objetivo de avaliar o grau de coerência dos dados da Tabela 5 com as situações clínicas amostradas foi realizado a Análise do Componente Principal (*Principal Component Analysis* – PCA) que demonstrou a devida separação dos pacientes em relação aos indivíduos controles quanto à expressão dos miRNAs para *HLA-G* (dados não mostrados). Isto possibilitou o avanço na análise estatística por meio da construção do agrupamento hierárquico, a partir do cálculo da distância métrica de *Pearson*, fato que resultou na identificação de 8 miRNAs (Figura 14).

Em relação a estes 8 miRNAs, apenas a redução da expressão do hsa-mir-16a-5p apresentou estatística significativa (*pvalue*<0,05 e logFoldChange(FC)≤2) nos pacientes diagnosticados com DM1 em relação aos indivíduos controles.

Figura 14: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito *HLA-G* contexto do DM1. Neste *heatmap* a restringência estatística foi estabelecida por *pvalue* < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de *Pearson*.



Desta forma, as análises estatísticas foram direcionadas à aplicação de teste menos estringente, considerando significativos os resultados de *pvalue*≤0,05, quando correlacionado o perfil de expressão dos 8 miRNAs alvos de HLA-G às variáveis clínicas (retinopatia, neuropatia, nefropatia e hipertensão arterial sistólica) dos pacientes DM1 e indivíduos controles.

Inicialmente, os 8 miRNAs alvos de HLA-G foram classificados quanto à padrão de expressão, sendo regulados positivamente quatro miRNAs, hsa-mir-193a-5p, hsa-mir-3150b-3p, hsa-mir-1304-3p e hsa-mir-548-3p, nos pacientes DM1. Enquanto, para os indivíduos controles, os miRNAs induzidos foram hsa-mir-16-5p, hsa-mir-548-3p, hsa-mir-193b-3p e hsa-mir-30c-1-3p.

Neste contexto, o diagnóstico de retinopatia foi associado à indução do miRNA hsa-mir-1304-3p (*pvalue*=0,047) no paciente DM1, a nefropatia associada à indução dos hsa-mir-193a-5p (*pvalue*=0,001) e hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,045) no paciente DM1 e, a hipertensão arterial sistólica associada á indução dos miRNAs hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,001) e hsa-mir-1304-3p (*pvalue*=0,045) e à repressão dos miRNAs hsa-mir-16-5p (*pvalue*=0,005) e hsa-mir-30c-1-3p (*pvalue*=0,042).

Em relação à identificação de miRNAs para *LGALS*-1, a Tabela 6 mostra os 33 miRNAs que apresentaram estatística significativa (*p*value<0,01) ao método de contagem de *reads*. Destes 33 miRNAs, 13 estão induzidos e 20 reprimidos nos pacientes DM1.

Tabela 6: Identificação dos miRNAs alvos para *LGALS-1* comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de *reads*, *pvalue*<0,01.

miRNAs	logFC	*PValue*	FDR	miRNAs	logFC	*PValue*	FDR
hsa-miR-6842-3p	-0,396	0,010	0,672	**hsa-miR-30c-1-3p**	0,366	0,008	0,618
hsa-miR-7-5p	-0,495	0,013	0,672	**hsa-miR-125b-5p**	0,604	0,012	0,672
hsa-miR-99b-3p	-0,547	0,014	0,672	**hsa-miR-4772-3p**	0,612	0,013	0,672
hsa-miR-548j-5p	-0,609	0,006	0,607	**hsa-miR-873-3p**	0,620	0,019	0,726
hsa-miR-3150b-3p	-0,715	0,001	0,410	**hsa-miR-99a-5p**	0,693	0,016	0,672
hsa-miR-3142	-0,808	0,006	0,607	**hsa-miR-141-5p**	0,728	0,009	0,668
hsa-miR-6783-3p	-0,825	0,033	0,826	**hsa-miR-4661-3p**	1,033	0,014	0,672
hsa-miR-4784	-0,931	0,017	0,683	**hsa-miR-3679-3p**	1,033	0,014	0,672
hsa-miR-5009-5p	-0,953	0,008	0,618	**hsa-miR-539-5p**	1,198	0,009	0,668
hsa-miR-4734	-0,960	0,016	0,672	**hsa-miR-6894-5p**	1,204	0,015	0,672
hsa-miR-4298	-0,997	0,015	0,672	**hsa-miR-7109-3p**	1,301	0,004	0,607
hsa-miR-7854-3p	-1,023	0,014	0,672	**hsa-miR-19a-5p**	1,448	0,001	0,240
hsa-miR-6753-5p	-1,031	0,014	0,672	**hsa-miR-3942-3p**	1,712	0,001	0,410
hsa-miR-6825-5p	-1,046	0,014	0,672				
hsa-miR-6734-5p	-1,157	0,005	0,607				
hsa-miR-5088-5p	-1,281	0,005	0,607				
hsa-miR-541-3p	-1,346	0,007	0,607				
hsa-miR-4676-5p	-1,426	0,005	0,607				
hsa-miR-4741	-1,594	0,000	0,240				
hsa-miR-1299	-1,776	0,010	0,672				

A aplicação da análise de PCA para este grupo de miRNAs, também, indicou a devida separação dos pacientes em relação aos indivíduos controles (dados não mostrados), o que permitiu a progressão na análise estatística, a qual possibilitou a construção do agrupamento hierárquico e, a identificação de 10 miRNAs que podem exercer regulação ao *LGALS-1* (Figura 15).

Destes 10 miRNAs, nenhum miRNA apresentou significância estatística (*pvalue*<0,05 e log(FoldChange)≤2) ao diagnóstico da doença do DM1.

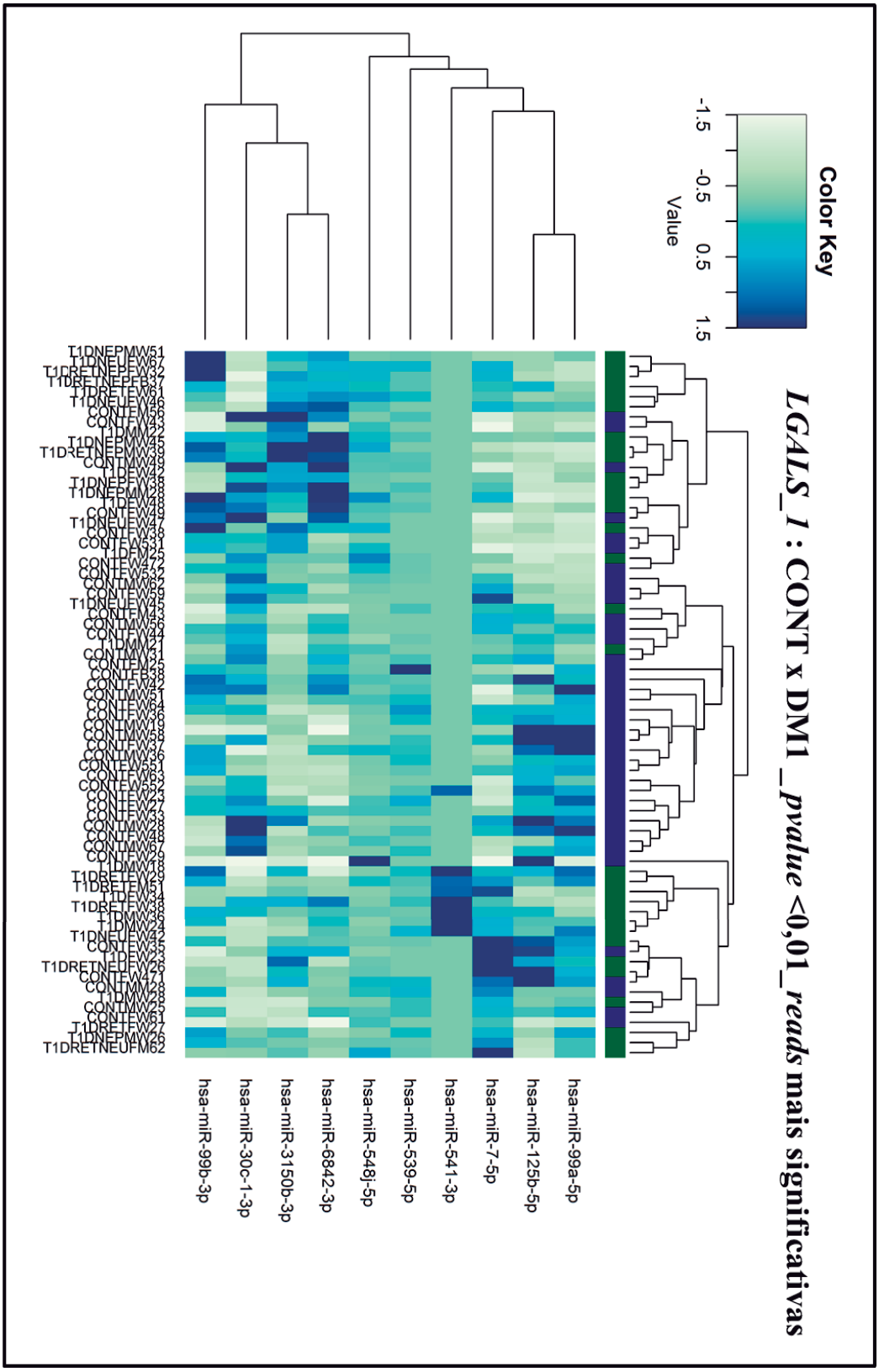
Como procedido anteriormente, reduzimos a estringência do teste estatístico (*pvalue*≤0,05) e, foram associados os perfis de expressão dos 10 miRNAs alvos de *LGALS-1* às variáveis clínicas (retinopatia, neuropatia, nefropatia e hipertensão arterial sistólica) dos pacientes DM1 e indivíduos controles.

A classificação destes 10 miRNAs indicou a prevalência da regulação positiva de cinco miRNAs, hsa-mir-6842-3p, hsa-mir-3150b-3p, hsa-mir-30c-1-3p, hsa-mir-99b-3p e hsa-mir-548j-5p nos pacientes DM1, enquanto, os hsa-mir-99a-5p,

hsa-mir-125b-5p, hsa-mir-541-3p, hsa-mir-7-5p e hsa-mir-539-5p estão regulados positivamente nos indivíduos controles.

A presença da neuropatia foi associada à indução do hsa-mir-7-5p (*pvalue*=0,004) em pacientes DM1; a nefropatia associada à indução do hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,045), hsa-mir-99b-3p (*pvalue*=0,001) em pacientes DM1 e, a hipertensão arterial sistólica associada à indução do hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,001) e a repressão dos hsa-mir-125b-5p (*pvalue*=0,040), hsa-mir-30c-1-3p (*pvalue*=0,042) e hsa-mir-99a-5p (*pvalue*=0,021) em pacientes DM1.

Figura 15: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito *LGALS-1* no contexto do DM1. Neste *heatmap* a restringência estatística foi estabelecida por *pvalue* < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de *Pearson*.



Para finalizar essas análises, a Tabela 7 indica os 22 miRNAs com significância estatística (*pvalue*<0,01) para *HLA-G* e *LGALS-1*, dos quais 7 miRNAs estão induzidos e 14 miRNAs estão reprimidos nos pacientes DM1.

Tabela 7: Identificação dos miRNAs alvos comuns para *HLA-G* e *LGALS-1* comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados.

miRNA	logFC	PValue	FDR
hsa-miR-3942-3p	1,712	0,001	0,410
hsa-miR-4741	-1,594	0,000	0,240
hsa-miR-5088-5p	-1,281	0,005	0,607
hsa-miR-3150b-3p	-0,715	0,001	0,410
hsa-miR-6734-5p	-1,157	0,005	0,607
hsa-miR-4676-5p	-1,426	0,005	0,607
hsa-miR-4772-3p	0,612	0,013	0,672
hsa-miR-99b-3p	-0,547	0,014	0,672
hsa-miR-6842-3p	-0,396	0,010	0,672
hsa-miR-873-3p	0,620	0,019	0,726
hsa-miR-4734	-0,960	0,016	0,672
hsa-miR-4784	-0,931	0,017	0,683
hsa-miR-548j-5p	-0,609	0,006	0,607
hsa-miR-30c-1-3p	0,366	0,008	0,618
hsa-miR-1299	-1,776	0,010	0,672
hsa-miR-6894-5p	1,204	0,015	0,672
hsa-miR-19a-5p	1,448	0,001	0,240
hsa-miR-5009-5p	-0,953	0,008	0,618
hsa-miR-541-3p	-1,346	0,007	0,607
hsa-miR-6825-5p	-1,046	0,014	0,672
hsa-miR-539-5p	1,198	0,009	0,668

A análise do PCA demonstrou a devida dispersão dos grupos amostrados (dados não mostrados), fato esse que direcionou a construção do agrupamento hierárquico, por meio do cálculo da distância métrica de *Pearson*. Contexto que identificou 8 miRNAs comuns para os transcritos *HLA-G* e *LGALS-1* (Figura 16).

A análise estatísticas relativa a estes 8 miRNAs demonstrou que suas identificações não foram apresetaram significância estatística em relação ao DM1 (*pvalue*<0,05 e log(FoldChange)≤2).

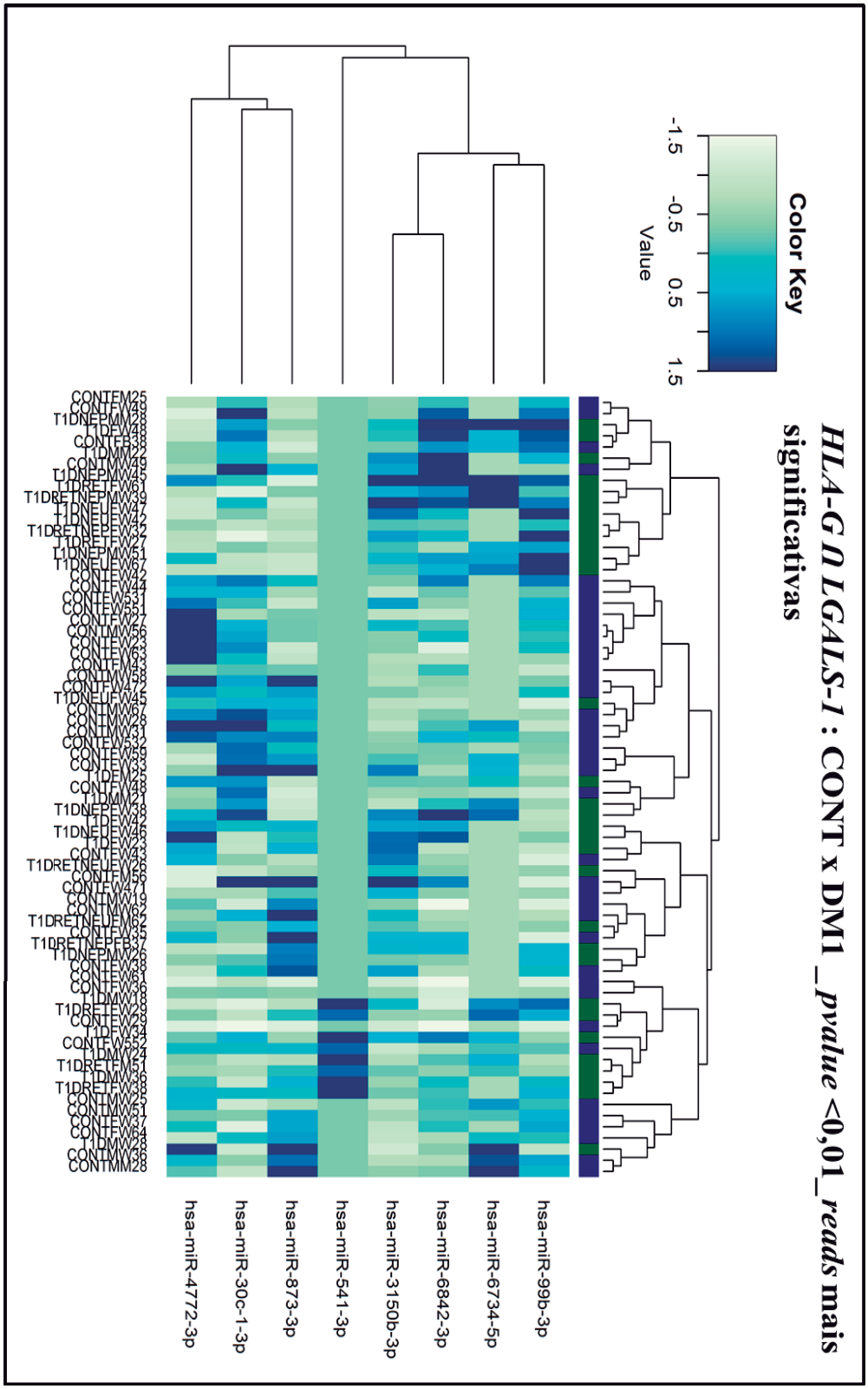
Sendo assim, as análises estatísticas foram aplicadas de modo a correlacionar o perfil de expressão dos 8 miRNAs comuns para *HLA-G* e *LGALS-1* em relação as variáveis clínicas (retinopatia, neuropatia, nefropatia e hipertensão

arterial sistólica) dos pacientes DM1 e indivíduos controles, considerando com menor estringência significativa, *pvalue*≤0,05.

Os miRNAs hsa-mir-99b-3p, hsa-mir-6734-5p, hsa-mir-6842-3p, hsa-mir-3150b-3p e hsa-mir-541-3p apresentaram perfil de regulação positiva nos pacientes DM1, enquanto, os miRNAs hsa-mir-873-3p, hsa-mir-30c-1-3p, hsa-mir-4772-3p estão regulados positivamente nos indivíduos controles.

Destes miRNAs, a nefropatia foi associada à indução do hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,045), hsa-mir-99b-3p (*pvalue*=0,001), hsa-mir-6842-3p (*pvalue*=0,041) e hsa-mir-6842-3p (*pvalue*=0,041) em pacientes DM1 e a hipertensão arterial sistólica associada à indução do hsa-mir-3150b-3p (*pvalue*=0,001) e do hsa-mir-6734-5p (*pvalue*=0,007) e, à repressão do hsa-mir-30c-1-3p (*pvalue*=0,042) em pacientes DM1.

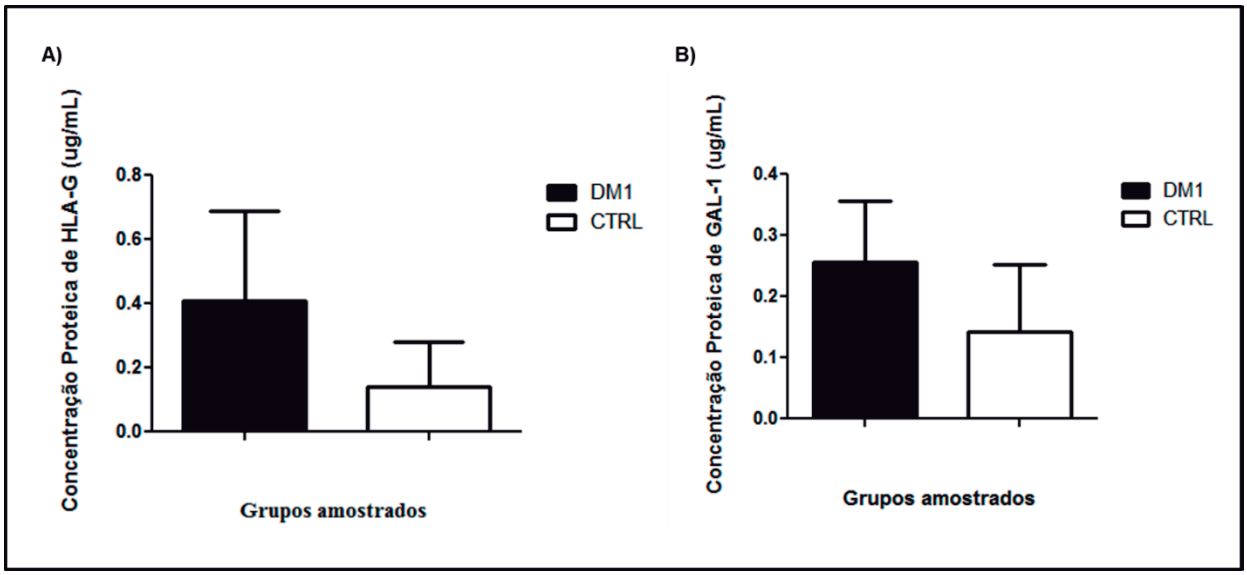
Figura 16: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para os transcritos *HLA-G* e *LGALS-1* no contexto do DM1. Neste *heatmap* a restringência estatística foi estabelecida por *pvalue* < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de *Pearson*.



4.1.1. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA.

Não houve diferença entre as concentrações plasmáticas de HLA-G *e GAL-1* detectdas nos pacientes DM1 e nos indivíduos controles, conforme a aplicação do teste estatístico *Mann-Whitney two-tailed* com significância estatística *pvalue*<0,05, o qual resultou para o *HLA-G pvalue*=0,0983 e para *LGALS-1 pvalue* = 0,2205 (Figura 17).

Figura 17: Níveis proteicos de HLA-G (A) e GAL-1 (B) em plasma de pacientes DM1 e indivíduos controles.



4.1.1. Análise comparativa, parcial e preliminar, dos padrões de expressão das moléculas HLA-G e LGALS-1 no DM1 humano.

Com o objetivo de avaliar uma possível associação entre os padrões de expressão das moléculas HLA-G e GAL-1 no DM1 foi realizado a análise de regressão múltipla linear dos resultados das quantificações relativas do RNAm de *HLA-G* e *LGALS-1*, dos miRNAs reguladores de *HLA-G* e *LGALS-1* e das concentrações plasmáticas de GAL-1 e HLA-G. Com base nesta análise estatística foi possível sugerir uma correlação entre a presença de miRNAs reguladores comuns ao HLA-G e a GAL-1 [hsa-mir-541-3p (*pvalue*=0,001) e hsa-mir-99a-5p (*pvalue*=0,034)] e a redução da GAL-1 no plasma dos pacientes (*pvalue*=0,018) em relação aos indíviduos controles (Tabela 8).

Tabela 8: Análise da informação genética de *HLA-G* e *LGALS-1* no DM1.

DM1 (*pvalue*)	mRNA HLA-G	mRNA LGALS1	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-3150b-3p	hsa-mir-1304-3p	hsa-mir-508-3p	hsa-mir-16-5p	hsa-mir-548h-3p
HLA-G		0,452	0,093	0,201	0,255	0,270	0,416	0,068
GAL-1	0,452	-	0,447	0,168	0,370	0,486	0,493	0,386

DM1 (*pvalue*)	hsa-mir-193b-3p	hsa-mir-30c-1-3p	hsa-mir-99b-3p	hsa-mir-6842-3p	hsa-mir-548j-5p	hsa-miR-539-5p	hsa-mir-541-3p	hsa-mir-7-5p
HLA-G	0,455	0,488	0,460	0,068	0,258	0,448	**0,001**	0,403
GAL-1	0,272	0,370	0,450	0,235	0,387	0,294	0,490	0,434

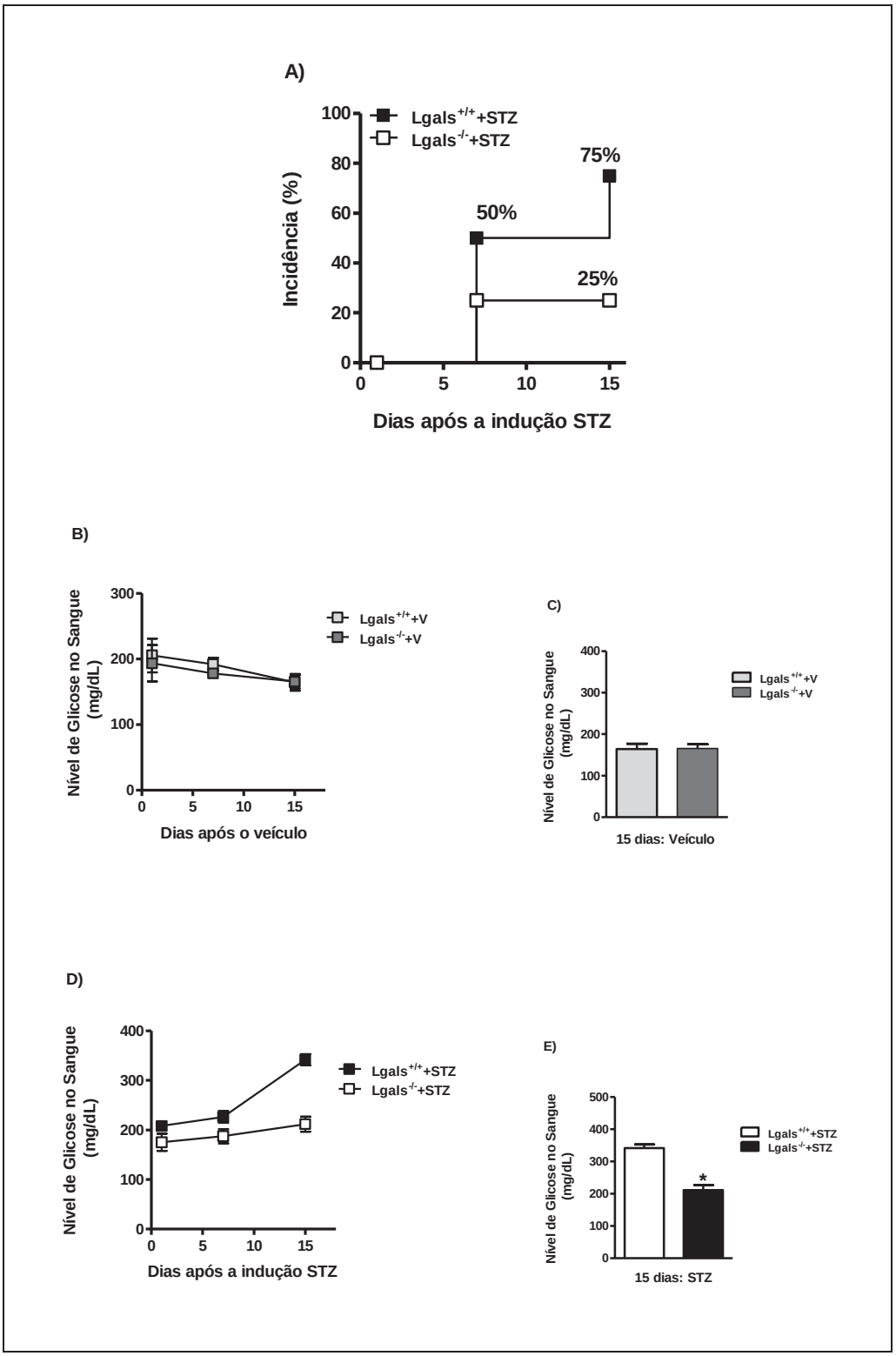
DM1	hsa-mir-125b-5p	hsa-mir-99a-5p	hsa-mir-6734-5p	hsa-mir-873-3p	hsa-miR-4772-3p	HLA-G	GAL-1
HLA-G	0,292	**0,034**	0,429	0,357	0,116	0,382	**0,018**
GAL-1	0,422	0,389	0,479	0,290	0,161	0,454	0,418

4.1. GAL-1 e HLA-G no modelo experimental do DM1.

4.1.1. Impacto da deficiência do gene da Gal-1 na evolução do DM-1 experimental.

A deficiência do gene de GAL-1 nos animais de experimentação (Lgals-1$^{-/-}$) provocou uma resistência ao desencadeamento do DM1 induzido por STZ (*pvalue*<0,001). A porcentagem de incidência da doença foi menor (25%) nos camundongos Lgals-1$^{-/-}$ em relação aos animais selvagens (Lgals-1$^{+/+}$ - Figura 18A). O nível glicêmico dos grupos de animias não-tratados com STZ não apresentou diferença durante o período de experimentação (0,7 e 15 dias), indicando a deficiência do gene GAL-1 não alterou a glicemia dos animais (Figura 18 B e C). Entretanto, o tratamento com STZ induziu uma elevada glicemia apenas nos animais selvagens (Figura 18 D e E). A análise descritiva de *odds ratio* indica a chance de 9 vezes do camundongo Lgals-1$^{+/+}$ tornar-se diabético em relação ao camundongo nocaute para esta proteína.

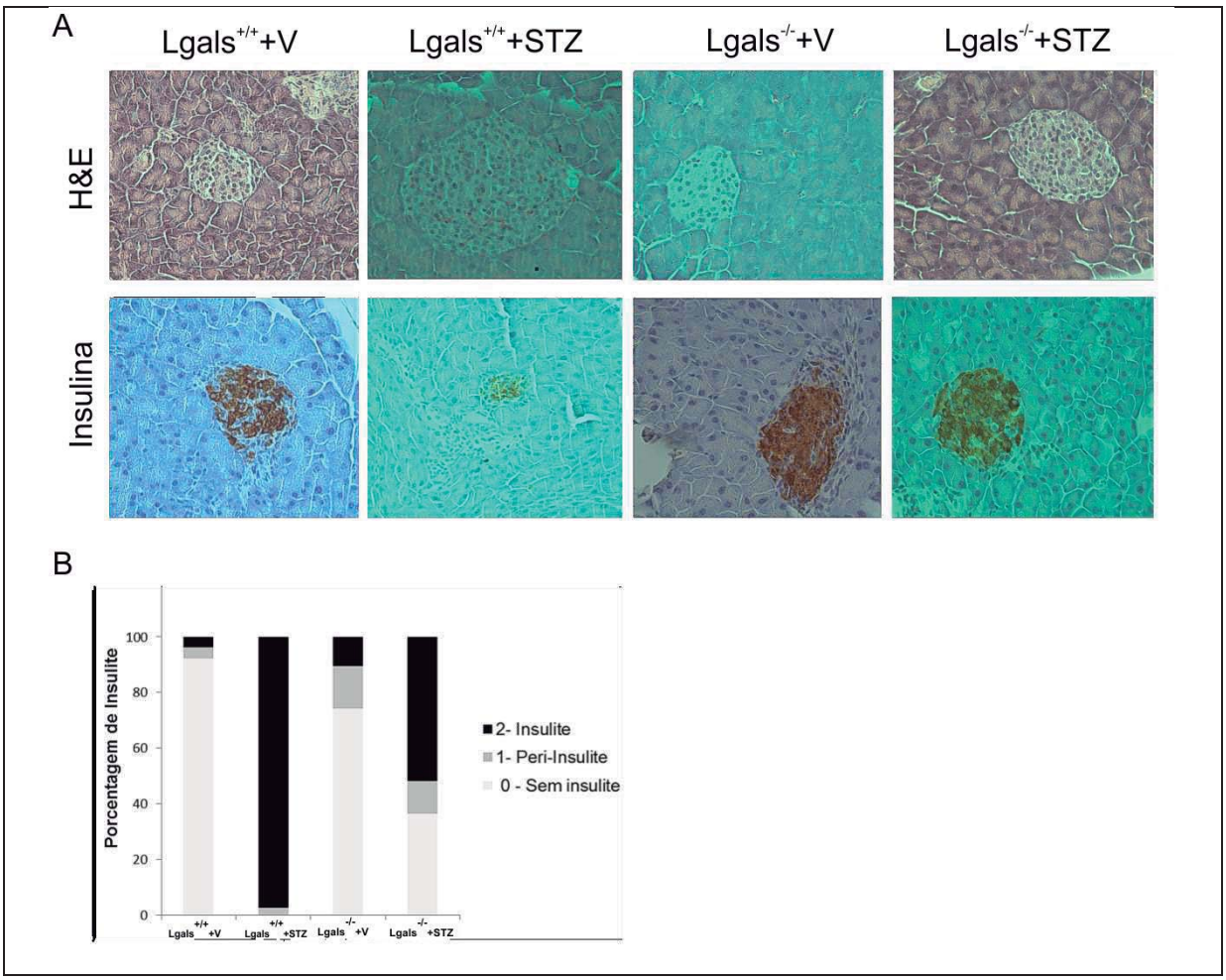
Figura 18: Galectina-1 endógena favorece o desencadeamento do DM1 induzido quimicamente. A) Taxa de incidência do DM1 nos animais selvagens (Lgals-1$^{+/+}$) e nocautes para GAL-1 (Lgals-1$^{-/-}$) tratados com STZ (40mg/Kg do animal). B) Registro do nível glicêmico dos animais não tratados no 0, 7° e 15°dia; C) Nível glicêmico dos animais não tratados no 15° dia; D) Registro do nível glicêmico dos animais tratados no 0, 7° e 15°dia; E) Nível glicêmico dos animais tratados no 15° dia. O STZ foi diluído em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4.5) o qual foi indicado como veículo (V).



4.1.1. Análise histoquímica do pâncreas de animais tratados ou não com STZ.

As análises histopatológicas mostraram que apenas os camundongos Lgals-$1^{+/+}$ tratdos com STZ apresentaram elevadas taxas de insulite (infiltrado leucocitário) em relação os demais grupos de experimentação (Figura 19 A e B). Isto pode sugerir que a ocorrência desse infiltrado leucocitário nos animais selvagens trados com STZ pode ter provocado uma acentuada perda das células betas das ilhotas pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. A quantificação relativa do infiltrado leucocitário nas ilhotas pancreáticas mostrou que nos camundongos Lgals-$1^{+/+}$ ou Lgals-$1^{-/-}$, não-tratados com STZ, uma ausência de leucócitos intrapancreáticos em 92,3% ou 74,3% das ilhotas pancreáticas analisadas, respectivamente. Enquanto que o tratamento com STZ provocou a ocorrência de insulite em 97,5% dos camundongos Lgals-$1^{+/+}$ e em 52% dos animais Lgals-$1^{-/-}$.(Figura 19B). O elevado comprometimento da capacidade produtora de insulina dos animais Lgals-$1^{+/+}$ tratados com STZ foi confirmado, claramente, pela acentuada redução na detecção da insulina em suas ilhotas (Figura 19A). Esse conjunto de resultados sugere que a presença de GAL-1 endógena pode favorecer a ocorrência de DM1 induzida por STZ apesar da presença de um moderado infiltrado nas ilhotas, não associado com a perda da capacidade de produção de insulina, em animais deficientes de GAL-1 endógena.

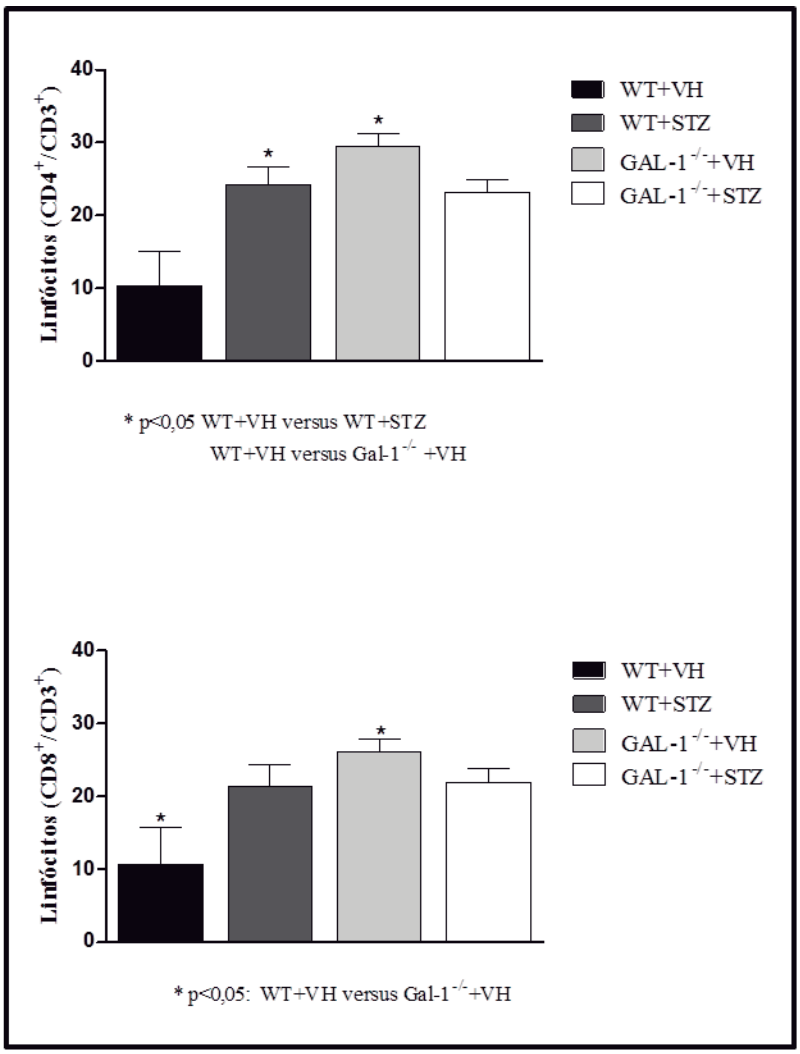
Figura 19: Análise da insulite e da taxa de produção insulina no pâncreas de animais tratados ou não com STZ. A) Análise histopatológica de tecido pancreático de animais selvagens (Lgals-1$^{+/+}$) ou nocautes para o gene da GAL-1 tratados ou não com STZ. A detecção de insulina pancreática foi feita com anticorpo anti-insulina como descrito na seção de materiais e métodos. B) Análise semi-quantitativa da presença ou ausência de insulite nas ilhotas pancreáticas dos animais ensaiados. Ausência de insulite foi indicada por zero, a presença de leucócitos ao redor das ilhotas com o valor um e a presença de leucóticos no interior das ilhotas com o valor 2.



4.1.1. Identificação dos tipos celulares presentes nos linfonodos pancreáticos.

O perfi imunofenotípico avaliado indica significância estatística nas populações de linfócitos T CD4^{+} (*pvalue*=0,027) e de linfócitos T^{+} CD8 (*pvalue*=0,037), as quais apresentaram uma maior prevalência nos animais Lgals-1$^{+/+}$ tratados com STZ (Figura 20).

Figura 20: Perfil imunofenotípico de células dos linfonodos pancreáticos de animais deficientes ou não de galectina-1, no modelo do DM1. Os leucócitos dos linfonodos pancreáticos foram isolados e submetidos à marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3, antiCD-4 e ant-CD8, como indicado na seção de materiais e métodos. A imunofenotipagem foi realizada com auxílio de um citometro de fluxo (FACSCanto II - BDBioscience, New Jersey, EUA) e do *software* BD FACSCANTO CLINICAL (BDBioscience, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de positividade para os marcadores que caracterizam os leucócitos em linfócitos T CD4 ou T CD8.

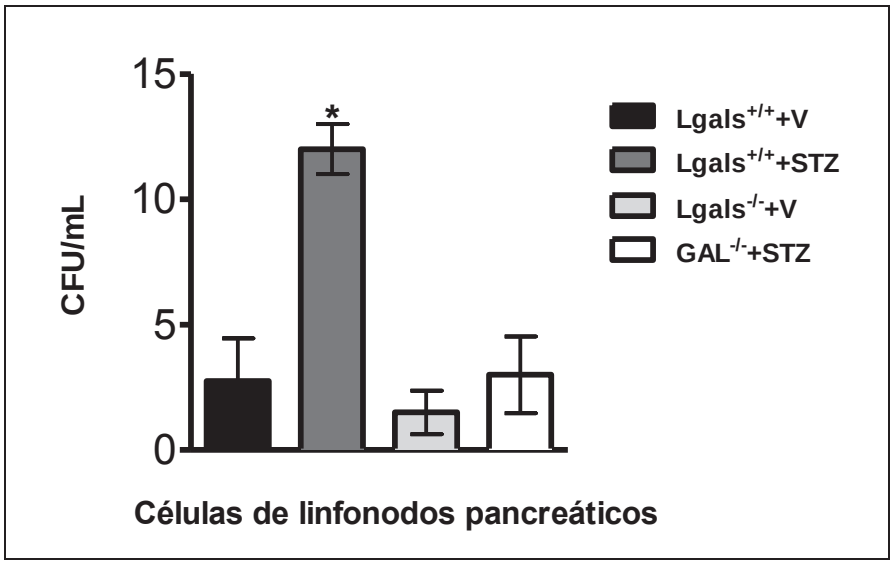


4.1.2. Análise da ocorrência da translocação bacteriana no desencademanto do DM1.

A ocorrência da translocação bacteriana gastro-intestinal para os linfonodos pancreáticos difere entre os grupos de animais amostrados (*pvalue*=0,0013). Sendo esta prevalente em camundongos Lgasl-1$^{+/+}$ tratados com STZ, o que evidencia a importância da microbiota no desencadeamento do DM1. A comparação aos pares dos grupos amostrados identificou diferença estatística entre Lgasl-1$^{+/+}$ tratados com tampão citrato de sódio (Veículo: V) e Lgasl-1$^{+/+}$ tratados com STZ (*pvalue*=0,0082),

Lgasl-1$^{+/+}$ tratados com STZ e Lgasl-1$^{-/-}$ tratados com veículo (*pvalue*=0,0005) e, Lgasl-1$^{+/+}$ tratados com STZ e Lgasl-1$^{-/-}$ tratados com STZ (*pvalue*=0,0079) (Figura 21).

Figura 21: Translocação bacteriana do ambiente gastro-intestinal para os linfonodos pancreáticos nos animais submetidos ao DM1 experimental. Amostras de suspensões celulares dos linfonodos pancreáticos dos animais selvagens (Lgasl-1$^{+/+}$) ou nocautes (Lgasl-1$^{-/-}$) previamente tratados com STZ ou tampão citrato de sódio (0.01M - pH 4,5 – veículo, V) foram transferidas para o meio ágar BHI e incubadas por 48 horas a 37°C para determinação de suas cargas bacterianas. A quantificação desta carga foi feita pela determinação de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL).



5. DISCUSSÃO

De modo geral, soluções específicas de proteínas enriquecidas, a partir de células hospedeiras naturais, são dificilmente obtidas, o que direciona a estratégia de obtenção para produção de proteínas recombinantes como procedimento aplicável para compreensão estrutural, bioquímica e funcional dessas proteínas e, ainda, aplicações comerciais, inclusive, terapêuticas (SORENSEN *et al.,* 2004 e XIAO et al., 2014). O engenheiramento de células de bactérias, fungos, insetos e mamíferos tem tornado promissor o processo de produção de proteínas heterólogas, inclusive, nas últimas décadas, cujo aprimoramento do conhecimento da biologia dos hospedeiros favoreceu o desenvolvimento de tecnologias de alto rendimento (XIAO et al., 2014).

Neste contexto, a obtenção de proteínas recombinantes de HLA-G, em especial, as isoformas solúveis –G5 e –G6 se justificam pela expressão constitutiva tecido-específica, cujas maquinarias de indução da expressão gênica e proteica são pouco conhecidas. Seu potencial imunorregulatório descrito em condições específicas, particularmente, em ambientes patogênicos o que torna relevante os esforços cientifícos para o aprimoramento do conhecimento destas, principalmente, da isoforma-G6 a qual é pouco descrita na literatura.

Dentre os sistemas de expressão de proteínas recombinantes a estratégia de expressar as isoformas –G5 e –G6 em sistema procarioto deve-se o destaque da bactéria E. coli apresentar alta densidade do cultivo celular, suas informações genéticas são bem descritas, há grande diversidade de ferramentas biotecnológicas compatíveis e a relativa simplicidade de expressão da proteína de interesse. Segundo levantamento de dados de expressão de proteínas recombinantes, 60,9% dessas são expressas em E. coli, havendo uma tendência para expressão em células eucariontes, principalmente, para proteínas de membrana (XIAO et al., 2014). Em relação à expressão de HLA-G, na literatura, há também prevalência de expressão em sistemas procariotos, sendo as isoformas –G1 e –G5 as mais descritas e, em menor proporção, demais isoformas, como –G2, -G6 e -G7.

Paul e colaboradores, 2000, realizaram a clonagem dos cDNAs das isoformas –G5, -G6 e –G7 em vetor de expressão pcDNA3.1/hygro(-) (Invitrogen) e em vetor pEF6/V5-His A (Invitrogen), os quais transfectaram as linhagens celulares de mamíferos M8 e Tera-2, com kit Exgen 500 (Euromedex). Os extratos proteicos

das células transfectadas foram avaliados em ensaios de western blotting e imunoprecipitação de modo a descreverem a isoforma – G7.

Marchal-Bras-Gonçalves e colaboradores, 2001, descrevem a expressão da isoforma de HLA-G1 em linhagem celular E. coli BL21 transformada com o vetor pGEX-4T3 (Pharmacia Biotech). A expressão da isoforma -G1 ocorreu com indução 0,1mmol/L IPTG, a 37°C. O corpo de inclusão foi ressuspendido em tampão STE (10 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) e lisado a partir da adição 1.5% SLS (Sigma) seguido da sonicação. O lisado foi clarificado e, o sobrenadante solubilizado com 2% (v/v) Triton X-100, durante incubação com beads de glutationa sepharose. A solução proteica HLA-G1 foi eluída, dialisada e concentrada. O ensaio demonstrou o efeito imunorregulatório de HLA-G1 em células NK.

Clements e colaboradores, 2006, realizaram a expressão das isoformas HLA-G1 e HLA-G1 modificada no códon Cys-42 por serina a partir do kit QuikChange site-directed mutagenesis (Strategene) os quais foram clonados individualmente em vetor pET30 (Pharmacia Biotech) e, expressos em E. coli BL21. Os corpos de inclusão foram ressuspendidos em solução contendo 20 mM Tris pH 8.0, 8 M urea, 0.5 mM EDTA e 1 mM DTT e, 30 mg do RIIPRHLQL peptídeo derivado da histona H2A foi adicionado as isoformas em tampão de refolding (100 mM Tris em pH 8,5, 0,4 M arginina, 0,5 mM de glutationa oxidada, 5 mM de glutationa reduzida, 2 mM EDTA, PMSF 0,2 mM e 1 mg ml de pepstatina A a 277 K). Por fim, as proteínas foram dialisadas, capturadas em resina DE52 e eluídas em 10mM Tris-HCl e 150mM NaCl, para ensaios de cristalização.

Takarashi et al., 2016, descrevem a expressão da isoforma HLA-G2, isoforma de membrana estruturalmente similiar à isoforma solúvel HLA-G6, a qual a sequência de cDNA foi inserida em vetor pGEMT7 (marca não descrita), e expressa em E. coli BL21(DE3)pLysS sob corpos de inclusão. Por método de diluição, o agregado proteico foi solubilizado e purificado em coluna HiLoad 26/60 Superdex 75pg em tampão SEC (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl). A solução proteica foi dialisada, as endotoxinas removidas e, utilizada para avaliar o efeito terapêutico no desencadeamento da artrite rematóide.

Como observado, as vantagens e simplicidade de expressão em sistema procarioto se contrapõem aos ineficientes: dobramento de proteínas, formações de pontes de dissulfeto, modificações pós-traducionais e, formação de corpos de inclusão (ROSANO & CECCARELLI 2014). De modo geral, os corpos de inclusão

estão localizados no citoplasma ou periplasma da bactéria, sendo formados durante os altos níveis de expressão das proteínas heterólogas decorrente da mudança na competição cinética entre dobramento e agregação (BASU et al, 2011, UPADHYAY et al., 2012). Desta forma, as estratégias de clonagem são direcionadas para otimização da linhagem bacteriana, da sequência de cDNA, das etapas de expressão, solubilização e purificação das proteínas recombinantes (ROSANO & CECCARELLI 2014).

A escolha inicial de expressar as isoformas –G5 e - G6 pelo vetor pGEX-6p2 deve-se ao conjunto de tecnologias que favorecem a homogeneidade, solubilização e purificação da amostra expressa, tais como, seleção por resistência à ampicilina; promotor Ptac (trp/lac) cuja transcrição é realizada por indução química; expressão concomitante da proteína de fusão GST na porção amino terminal (N-terminal) que favorece a solubilização e a purificação em coluna de afinidade; sítio de reconhecimento de clivagem enzimática para PreScission™ o qual permite a obtenção da proteína em sua forma livre (GE HEALTHCARE, 2017).

Os ensaios de expressão foram otimizados para ocorrerem com indução proteica 100μM IPTG, a 18°C, 0,3< D.O 600nm <0,6 em intervalo de 12 horas, de modo a tornar a expressão das isoformas mais lenta e em menor produção o que reduziu a concentração do agregado proteico. Os corpos de inclusão foram recuperados e desnaturados com tampão uréia 8M, mas não solubilizados durante a etapa de diálise.

A proteína GST-HLA-G5 foi caracterizada quanto à homologia à proteína nativa, HLA-G5, por meio do alinhamento dos digestos trípticos resultantes do ensaio de espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS. Em relação à estrutura proteica, o ensaio de DLS indicou a formação de duas populações proteicas representadas 83,7% da suspensão apresentou raio hidrodinâmico 43,24 ± 10 nm e padrão monodisperso de luz o que sugere um arranjo estrutural proteico uniforme, enquanto, 16,3% da amostra proteica apresentou raio hidrodinâmico de 172,45 ± 60,97 nm e padrão polidisperso da luz, ou seja, arranjo estrutural proteico diversificado e/ou oligomérico. Por fim, a caractericação imunoquímica pelo anticorpo comercial MEM-G1 evidencia a reatividade deste anticorpo à cadeia pesada da proteína de HLA-G recombinante.

Em busca da obtenção de isoformas –G5 e –G6 solúveis, a estratégia de clonagem do presente trabalho foi direcionada para ocorrer em pET28a-SUMO

modificado. Dentre outros fatores que afetam a taxa transcricional, e a produção proteica, cita-se a presença de tag de fusão SUMO ligada à cauda de histidina, que favorece o processo de refolding e purificação da proteína de interesse em colunas de afinidade ao Ni+2 (LIMA & MONSSESSOVA et al., 2000, BUTT et al., 2005, JIA & JEON, 2016). Ressalta-se que o peso molecular de SUMO é inferior ao GST, o que contribui no dobramento proteico.

A obtenção de clones pET28a-SUMO modificado –G5 e –G6 foi eficiente. As condições otimizadas e padronizadas de expressão para o vetor pGEX-6p2 foram mantidas mas, apenas , a proteína –G6 foi expressa. Dentre os fatores que inviabilizaram a expressão de –G5 cita-se nível de expressão, conteúdo elevado de elevada %G+C, taxas de recombinação, estabilidade de RNAm, posição do codon, comprimento do gene os quais podem influenciar codon bias (BEHURA &SEVERSON, 2013). Desta forma, seguimos com a expressão de rhHLA-G6, cujas etapas de recuperação e desnaturação dos corpos de inclusão foram realizadas conforme protocolo modificado de Protein Refolding kit (Novagen), o qual possui similaridade ao descrito por Marchal-Bras-Goncalves et al., 2001.

A caracterização físico-química de rhHLA-G6 indicou obtenção de uma proteína solúvel, polidispersa, homóloga à isoforma nativa e com peso molecular de 23603,766 Da. A mensuração do raio hidrodinâmico de 6 ± 2nm indica uma estrutura oligomérica solúvel conforme descrições Lorber e colaboradores, 2012, e Tatkiewicz e colaboradores, 2015. Quanto à informação da polidispersividade conferida ao rhHLA-G6 esta deve-se à diversidade da organização estrutural da proteína e/ou a presença multimérica da proteína em solução. O anexo 4 traz uma predição desses possíveis rearranjos quando a proteína rhHLA-G6 está dimérica, demonstrando que as diferentes angulações apresentadas implicam na diversidade de dispersão dos raios de luz incididos.

A análise dos digestos trípticos da proteína recombinante rhHLA-G6 por espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS revelou a identificação das sequências de aminoácidos da proteína expressa à proteína nativa, o que valida a homologia entre elas. Outra semelhança apresentada em nossos resultados é o peso molecular estimado, em gel de SDS-PAGE15%, apresentado pela proteína recombinante, 27,8kDa, conforme descrito na literatura (PAUL et al. 2010). A caracterização do peso molecular do monômero de rhHLA-G6 por espectrometria

em massa MALDI-TOF/TOF indicou 23600.865 m/z, ~23,6 kDa., não havendo na literatura qualquer dado anteriormente descrito.

Fizemos em adição, a caracterização imunoquímica de His6-tagged SUMO-HLA-G6 e rhHLA-G6, a qual validou a reatividade do anticorpo MEM-G9 (Exbio) às proteínas em estado conformacional nativo, enquanto, o MEM-G1(Abcam) apresentou reatividade apenas às estruturas desnaturadas das mesmas. Conforme descrição do protocolo de MEM-G1 bem como dados da literatura, o anticorpo apresenta afinidade pela cadeia pesada da molécula em conformação desnaturada, desta forma, a reatividade exibida por esse em nossos experimentos deve-se a presença do detergente SLS nas amostras seguido da realização de aquecimento, ambos, desnaturando as proteínas recombinantes (Abcam, 2016). Em relação aos dados referentes ao anticorpo MEM-G9, este possui reatividade específica a isoforma nativa do domínio α1, prevalentemente, em associação a proteína β2 microglobulina (MENIER et al., 2003, EXBIO, 2017,), portanto, apresentando reatividade apenas as conformações nativas de His6-tagged SUMO-HLA-G6 e rhHLA-G6. Desta forma, concluímos que a detecção do anticorpo MEM-G9 pelas formas nativas das proteínas recombinantes, His6-tagged SUMO-HLA-G6 e rhHLA-G6, confirma a solubilização das mesmas com possível conformação estrutural semelhante à conformação nativa, sugerindo então, a provável atividade biológica das mesmas, a qual será descrita em ensaios futuros.

A descrição da expressão constitutiva do HLA-G nas ilhotas pancreáticas sugere o papel imunorregulatório desta proteína no processo de insulite, com possíveis implicações para o desencadeamento da autoimunidade (CIRULLI et al., 2006). Ao contrário dos genes clássicos de MHC de classe I, os genes não clássicos exibem baixo polimorfimo em suas regiões codificantes, sendo este prevalente nas porções 3’ e 5’UTR. Desta forma, a participação das moléculas não clássicas como o HLA-G à susceptibilidade ao DM1 indica a associação destas aos haplótipos de susceptibilidade do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), conforme descritos por Eike e colaboradores, 2009, que identificaram variantes de risco ao DM1 próximas ou dentro do gene de HLA-G e, dentro de uma região demarcada pelo gene HLA-DPB1.

Silva e colaboradores, 2016, identificam polimorfismo de 14pb INS/DEL nas regiões não traduzidas do HLA-G, cuja deleção em homozigose, associada ao haplótiplo DR3-DQ2/DR4-DQ8, confere susceptibilidade ao DM1. Albuquerque e

colaboradores, 2016, complementam a informação genética descrevendo a identificação de polimorfismo no alelo +3001 T, na região 3'UTR do HLA-G e, a baixa/moderada expressão de RNAm HLA-G solúvel nos pacientes DM1 que apresentam o genótipo +3010 CC no haplótipo 3'UTR (14bpDEL/+3001C/+3003T/+3010C/+3027C/+3035C/+3142G/+3187A/+3196C)

Descrições que indicam a regulação negativa do HLA-G na doença autoimune, como indicado no presente trabalho, em que o perfil de expressão do HLA-G, aos níveis transcricional e proteico, não foi representativo.

A importância da regulação dos miRNAs em doenças autoimunes tem sido discutida, principalmente, por contribuírem na regulação de genes envolvidos com o sistema imunológico e/ou função das células β (SEBASTIANI et al., 2011). Neste contexto, o único miRNA que apresentou significância estatística, com maior estringência estatística, ao DM1 foi o hsa-mir-16-5p, o qual regula negativamente o HLA-G.

O hsa-mir-16-5p o qual se encontra regulado positivamente nos indivíduos controle de modo a inibir a expressão de HLA-G, é descrito na literatura por estar associado a falência cardíaca (MARQUES et al, 2016, THOMPSON et al, 2016), câncer de próstata (YANG et al., 2016), câncer de coloretal (OSTENFELD et al, 2016), dentre outros . Ainda, foi descrito por YANG et al., 2016 a regulação negativa desse miRNA no tecido do endométrio, local onde é observada alta expressão de HLA-G, principalmente, no período gestacional. A descrição desta informação de fato nos orienta quanto a função do mir-16-5p na regulação pós-transcricional do HLA-G. A ausência de relatos que o descrevam em contextos de grupos saudáveis no impossibilita correlacionar esse miR a uma dada função nos indivíduos controle.

Assim como o HLA-G, o perfil de expressão da galectina-1 não diferenciou o grupo de pacientes DM1 em relação aos indivíduos controles, no entanto, a quantificação relativa de LGALS-1 é aproximada ao do gene constitutivo, o que sugere que a presente molécula cujo nível proteíco é irrisório esteja regulado por miRNAs, indicado no presente trabalho por has-mir- 541-3p, hsa-mir-3150b-3p, hsa-mir-99b-3p e hsa-mir-6734-5p, os quais foram associados às doenças metabólicas secundárias ao DM1.

O hsa-mir-541-3p presente no perfil de pacientes diagnosticados com retinopatia, é regulador transcricional de aproximadamente 99 genes, atualmente descritos (GENECARDS, 2016). A busca por informações de associação do mesmo

à retinopatia na literatura é ausente, sendo suas associações relacionadas à diminuição da progressão do câncer de pulmão ao regular os níveis transcricionais TGIF2 (LU et al., 2016) e na inibição múltipla de tumores (HRDLIČKOVÁ et al., 2016). Ainda, há a descrição de sua regulação positiva em células pacientes diagnosticados com o vírus tipo 1 da imunodeficiência humana (DEVADAS et al., 2016). A informação que pode ser correlacionada ao nosso resultado encontrado remete ao ensaio que fez uso GAL-1 em células endoteliais microvasculares da retina de modo a regular positivamente a fosforilação de VEGFR2 o qual contribui para a retinopatia proliferativa no DM1. Sendo assim, a regulação positiva do mir-541-3p nos pacientes diabéticos culmina na redução da expressão de GAL-1 o que favorecerá a fosforilação de VEGF e, consequentemente, no desencadeamento do quadro de retinopatia (KANDA et al., 2015).

O hsa-mir-3150b-3p apresentou regulação positiva em pacientes DM1 com diagnóstico a neuropatia e/ou nefropatia. Esse miRNA possui cerca de 180 alvos preditos (GENECARDS, 2016), sendo ausentes qualquer descrição literária que correlacione este miRNA a patogenias (NCBI, 2016). Sendo assim, o presente trabalho será o primeiro a descrever a associação do mir-3150b-3p a doenças metabólicas secundárias vinculadas ao DM1.

Os hsa-mir-99b-3p e o hsa-mir-6734-5p apresentam regulação positiva em pacientes DM1 com diagnóstico de pelo menos uma doença secundária associada ao DM1. O hsa-mir-99-3p possui cerca de 47 alvos preditos (GENECARDS, 2016) e, uma única publicação a qual descreve a regulação positiva do mesmo no desencadeamento da degeneração da estenose aórtica (SHI et al., 2016). Enquanto o hsa-mir-6734-5p possui cerca de 96 alvos preditos (GENECARDS, 2016) e ausência de descrição na literatura até o momento publicado. O fato do mir-99-3p estar associado à doença cardíaca nos remeteu a análise dos pacientes que apresentaram a regulação positiva do mesmo quanto ao diagnóstico de hipertensão e, podemos verificar, que essa complicação está prevalente nos pacientes upregulated. Portanto, a regulação positiva desses miRNAs está também associada a doenças cardiovasculares, corroborando com a publicação de SHI et al., 2016.

Por fim, a correlação de indução da expressão dos transcritos de HLA-G pela proteína Galectina-1, na análise da informação genética de GAL-1 e HLA-G, no contexto do DM1, foi anteriormente descrito por Tirado-González e colaboradores, 2013, na tolerância materno-fetal, em análise do estímulo do HLA-G em linhagem de

células invasivas proliferativas do citotrofoblasto 65 (HIPEC65) submetidas ao estímulo ou ao silenciamento de GAL-1. O ensaio indica que a GAL-1 exógena regulou positivamente as isoformas –G1 e –G2, enquanto, a GAL-1 endógena induziu a expressão das isoformas solúveis, -G5 e -G6. Esses resultados indicam o envolvimento de Gal-1 na regulação positiva do HLA-G. Sugerindo o possível efeito do mecanismo de splicing alternativo desempenhado pela atividade funcional de galectina-1 conforme proposto por Voss e colaboradores, 2008, e, Patterson e colaboradores, 2016. Futuros ensaios, in vitro, podem elucidar os possíveis efeitos de GAL-1 na regulação positiva do HLA-G.

A hipótese inicial sobre o impacto da deficiência do gene da GAL-1 no DM1 experimental induzido por STZ era a piora do quadro clínico dos animais Lgasl-1-/-. Isto foi fundamentado em várias descrições da literatura sobre a relevância da ocorrência de um processo autoimune no desenvolvimento desta doença (SCHRANZ & LERNMARK, 1998; Bluestone et al., 2010) e nas funções imunoregulatórias da GAL-1 associadas ao desfavoreci mento do DM-1 experimental. (PERONE et al., 2006, PERONE et al., 2009, Arthur et al., 2015). Entrentanto, os resultados aqui apresentados mostraram que a presença da GAL-1 endógena, ao contrário da GAL-1 exógenna e solúvel (PERONE et al., 2009) ou da ação de células dendríticas transgênicas para GAL-1 (PERONE et al., 2006), favoreceu a ocorrência dos indicadores da DM1 experimental. Esta contradição entre os efeitos das formas exógena e endógena das galectinas já foi descrito em várias e isto situações experimentais e isto pode estar associado diferentes rotas de transdução de sinais em função da localização celular (intra verus extracelulares) para GAL-1 (CAMBY et al. 2006). Nessa linha, sugere-se que a ausência de GAL-1 endógena pode desfavorecer a sinalização via NODs fundamental para o desenvolvimento do DM1 por STZ (COSTA et al., 2016). Finalmente, sugere-se que a ausência da GAL-1 endógena possa interferir negativamente com a biodistribuição do STZ, futuras investigações serão necessárias para investigar o impacto de tais considerações.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho trouxe a descrição do procedimento de obtenção da isoforma solúvel de HLA-G6 o que permite a aplicabilidade desta para melhor compreensão estrutural, bioquímica e funcional desta isoforma, incluindo, o uso em ensaios terapêuticos em modelos inflamatórios.

Portanto, o conjunto de resultados sugere que possa ocorrer uma regulação positiva da expressão de transcritos do HLA-G em pacientes com DM1 e que a presença de GAL-1 endógena pode favorecer o DM1 experimental. Estes dados abrem novas perspectivas para o melhor entendimento da imunopatologia do DM-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIANKENARI S., ESLAMI M.B., SARRAFNEJAD A., MOHSENI M., LARIJANI B. Dendritic Cells Bearing HLA-G Inhibit T-Cell Activation in Type 1 Diabetes. **Iran J Allergy Asthma Immunol**. 2007; 6(1): 1-7

AGAUGUÉ S, CAROSELLA E & ROUAS-FREISS N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17 **Blood**, 2011, Vol. 117, N.2, 7021-7031.

ALBERTI KGMM, ZIMMET PZ, WORLD HEALTH ORGANIZATION CONSULTATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO, 1999.

ALEGRE, E., et al., Some basic aspects of HLA-G biology**. J Immunol Res**, 2014: p. 657625.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2016. **Diabetes Care**. 2016;39(suppl 1):S1-S106.

AMIOT, L., et al., Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **J Hepatol,** 2014. 60(2): p. 245-52.

ANDERSON M. S. & BLUESTONE J. A. The NOD mouse: A model of immune dysregulation. **Annu. Rev. Immunol.** 2005. 23:447–85. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643

APPLIED BIOSYSTEMS APLICATION NOTE. Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays - TaqMan Gene Expression Assays Average 100% efficiency.(Part number 105622). **Applied Biosystems**, USA, publication, 2006. 127-05.

ARTHUR CM, BARUFFI MD, CUMMINGS RD, STOWELL SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. **Methods Mol Biol**. 2015;1207:1-35.

ASSEMAN C, MAUZE S, LEACH MW, COFFMAN RL, POWRIE F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**. Vol.190, N.7, 995–1004, 1999.

ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY. HLA-G (major histocompatibility complex, class I, G. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HLAGID43744ch6p22.html>. Acessado em: 16 de outubro de 2016.

ATKINSON M.A., EISENBARTH G.S. & MICHELS A. W. Type 1 diabetes. **Lancet;** Vol.383, N.9911: 69–82, Janeiro 2014. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.

BAINBRIDGE D.R., ELLIS S.A. SARGENT I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. **J Reprod Immunol**. 2000. 48, 17-26.

BARKER JM, MCFANN K, HARRISON LC, FOURLANOS S, KRISCHER J, CUTHBERTSON D. et al. Pre-type 1 diabetes dysmetabolism: maximal sensitivity achieved with both oral and intravenous glucose tolerance testing**. J Pediatr**. Vol. 150, N.1, 31-36, 2007.

BARONDES SH, CASTRONOVO V, COOPER DN, CUMMINGS RD, DRICKAMER K, FEIZI T, GITT MA, HIRABAYASHI J, HUGHES C, KASAI K, et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins**. Cell** 1994;76:597-598.

BARRIENTOS G, FREITAG N, TIRADO-GONZÁLEZ I, UNVERDORBEN L, JESCHKE U, THIJSSEN VL, BLOIS SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. **Hum Reprod Update**. 2014 Mar-Apr;20(2):175-93.

BAYRY J, GAUTIER JF. Regulatory T Cell Immunotherapy for Type 1 Diabetes: A Step Closer to Success? **Cell Metab**. 2016 Feb 9;23(2):231-3.

BARRIENTOS G, FREITAG N, TIRADO-GONZÁLEZ I, UNVERDORBEN L, JESCHKE U, THIJSSEN VL, BLOIS SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. **Hum Reprod Update**. 2014

BEHURA SK, SEVERSON DW. Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes**. Biol Rev Camb Philos Soc.** 2013 Feb;88(1):49-61.

BIEDRON, M., et al., The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. **Med Oncol,** 2015. 32(8): p. 219.

BLOIS SM, ILARREGUI JM, TOMETTEN M, GARCIA M, ORSAL AS, CORDO-RUSSO R, TOSCANO MA, BIANCO GA, KOBELT P, HANDJISKI B, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nat Med** 2007;13:1450-1457.

BLUESTONE J.A., HEROLD K. & EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes**. Nature**. Vol 464, 1293 -1300, Abril 2010.

BLUESTONE JA, BUCKNER JH, FITCH M, GITELMAN SE, GUPTA S, HELLERSTEIN MK, HEROLD KC, LARES A, LEE MR, LI K, LIU W, LONG SA, MASIELLO LM, NGUYEN V, PUTNAM AL, RIECK M, SAYRE PH, TANG Q. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. **Sci Transl Med.** 2015 Nov 25;7(315):315ra189.

BOYSON JE, ERSKINE R, WHITMAN MC, et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proc Natl Acad Sci** U S A 2002;99:16180-16185.

BORTOLOTTI D, GENTILI V, ROTOLA A, CASSAI E, RIZZO R, DI LUCA D.Impact of HLA-G analysis in prevention, diagnosis and treatment of pathological conditions.**World J Methodo**l. 2014 Mar 26;4(1):11-25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 13/10/2016. Franco LJ. Um problema de saúde pública. Epidemio.

BRIZEL DM, SIBLEY GS, PROSNITZ LR, SCHER RL, DEWHIRST MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. Int J Radiation **Oncol Biol Phys** 1997;38. 285–189.

BRENOL CV, VEIT TD, CHIES JA, XAVIER RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. **Rev Bras Reumatol.** 2012 Feb;52(1):82-91.

BUTLER AE, GALASSO R, MEIER JJ, BASU R, RIZZA RA, BUTLER PC. Modestly increased beta-cell apoptosis but no increased betacell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. **Diabetologia.** Vol. 50, N. 11, 2323-2331, 2007.

CEDENO-LAURENT F, OPPERMAN M, BARTHEL SR, KUCHROO VK, DIMITROFF CJ. Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression. **J Immunol.** 2012 Apr 1;188(7):3127-37.

CAMBY I, BELOT N, RORIVE S, LEFRANC F, MAURAGE CA, LAHM H, KALTNER H, HADARI Y, RUCHOUX MM, BROTCHI J, et al. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. **Brain Pathol** 2001;11:12-26.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, Nov, p.137R-157R. 2006.

CAO X, CAI SF, FEHNIGER TA, SONG J, COLLINS LI, PIWNICA-WORMS DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**.Vol. 27, N. 4, 635-646, 2007.

CAROSELLA, E.D., DAUSSET J., E ROUAS-FREISS N., Immunotolerant functions of HLA-G. **Cell Mol Life Sci**, 1999. 55(3): p. 327-33.

CAROSELLA ED, MOREAU P, LE MAOULT J, LE DISCORDE M, DAUSSET J, ROUAS-FREISS N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol**. 2003;81:199-252.

CAROSELLA ED, MOREAU P, LEMAOULT J, ROUAS-FREISS N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol**. 2008;29:125-32

Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, Moreau P, LeMaoult J. HLA-G: An Immune Checkpoint **Molecule. Adv Immunol.** 2015;127:33-144.

CASTELLI EC, VEIGA-CASTELLI LC, YAGHI L, MOREAU P, DONADI EA.Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **J Immunol Res.** 2014; 2014:734068.

CLARK, G.F. AND D.J. SCHUST, Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. **Front Immunol,** 2013. 4: p. 26.

CONTINI P, GHIO M, POGGI A, FILACI G, INDIVERI F, FERRONE S, PUPPO F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **Eur J Immunol.** 2003 Jan; 33(1):125-34

CORDERO EA, VEIT TD, DA SILVA MA, JACQUES SM, SILLA LM,CHIES JA. HLA-G polymorphism influences the susceptibilityto HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens.** 2009; 74: 308-313.

CORREIA, F., SANTALHA M., MEIRELES C., FONSECA F., COSTA A. Monogenic diabetes: the relevance of molecular diagnosis. Revista Portuguesa de Endocrinologia, **Diabetes e Metabolismo**, Vol. 6, N2, 64-68, 2011.

COSTA, F. R., FRANÇOZO, M.C., DE OLIVEIRA, G. G., IGNACIO, A., CASTOLDI, A, ZAMBONI D. S., RAMOS S.G., CÂMARA N. O., DE ZOETE M. R., PALM N. W., FLAVELL R. A., SILVA J.S., CARLOS D. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activationand contributes to T1D onset. **J Exp Med.** 2016 Jun 27;213(7):1223-39.

CRISPIM JC, DUARTE RA, SOARES CP, COSTA R, SILVA JS, MENDES-JÚNIOR CT, WASTOWSKI IJ, FAGGIONI LP, SABER LT, DONADI EA. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Transpl Immunol.** 2008 Feb;18(4):361-7. Epub 2007 Nov 26.

CRISPIM JC, MENDES-JUNIOR CT, WASTOWSKI IJ, COSTA R, CASTELLI EC, SABER LT, DONADI EA. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens**. 2008 Jan;71(1):35-41. Epub 2007 Oct 29.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Galectins. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. **Cold Spring Harbor** (NY), 2nd ed., 2009

CURIGLIANO G., CRISCITIELLO C., GELAO L.et al. Molecular Pathways: Human Leucocyte Antigen G (HLA-G). **Clin Cancer Research.** 2013;19:5564-5571

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **J Biol Chem,** v. 278, n. 42, Oct 17, p.41282-41293. 2003.

DIAS-BARUFFI M1, STOWELL SR, SONG SC, ARTHUR CM, CHO M, RODRIGUES LC, MONTES MA, ROSSI MA, JAMES JA, MCEVER RP, CUMMINGS RD. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle**. Glycobiology**. 2010 May;20(5):507-20.

DIB S.A. Heterogeneity of type 1 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab** Vol.52, N.2, São Paulo, Março. 2008.

DONADI E.A., CASTELLI E.C., ARNAIZ-VILLENA A., ROGER M., REY D., MOREAU P., Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association**. Celular and Molecular Life Sciences**. Vol. 68, N.3, 369-395, 2011

ELLIS S.A., PALMER M.S., MCMICHAEL A.J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule**. J Immunol**, (1990). 144, 731-5.

EISENBARTH G.S. & JEFFREY J. The natural history of type 1A diabetes**. Arq Bras Endocrinol Metab** , Vol.52, N.2:146-155, 2008.

EKOÉ JM, REWERS M, WILLIAMS R et al., eds. **The epidemiology of diabetes mellitus.** 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.

FAHLEN L, READ S, GORELIK L, HURST SD, COFFMAN RL, FLAVELL RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J Exp Med**. Vol. 201 N.5, 737–746, 2005.

FAUSTMAN D. L. MHC class I and autoimmune diabetes**. Biomed & Pharmacother,** Vo. 47, 3-10, 1993.

FAUSTMAN D. L. Mechanisms of autoimmunity in type 1 diabetes**. Journal of Clinical Immunology**, Vo. 13, N.1, 1993.

FAVIER B., LEMAOULT J., ROUAD-FREISS N., MOREAU P. et al. Research on HLA-G: an update. **Tissue Antigens**. 2006, 69(3):207-11.

FAVIER B. HOWANGYIN K., WU J., CAUMARTIN,J., DAOUYA M. ET AL.,Tolerogenic fubction of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study in vivo. **PlosOne,.** (2011), 6, n7 (doi: 10.1371/journall.pone.0021011.

FERREIRA LM, MEISSNER TB, TILBURGS T, STROMINGER JL. HLA-G: At the Interface of Maternal-Fetal Tolerance. **Trends Immunol.** 2017 Mar 6. pii: S1471-4906(17)30023-6.

FONS P, CHABOT S, CARTWRIGHT JE, LENFANT F, et al., Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells**. Blood**, 2006. 108(8): p. 2608-15.

FOULIS AK, MCGILL M, FARQUHARSON MA. insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man - macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. **J Pathol**. Vol, 165, N.2, 97-103, 1991.

FOURLANOS S., DOTTA F., GREENBAUM C.J., PALMER J.P., ROLANDSSON O., COLMAN P. G., HARRISAN L. C. Latent autoimune diabetes in adults (LADA) should be less latente. **Diabetologia**. Dezembro, 2005. DOI: 10.1007/s00125-005-1960-7.

GAO, G. F., WILLCOX, B. E., WYER, J. R., BOULTER, J. M., O'CALLAGHAN, C. A., MAENAKA, K., STUART, D. I., JONES, E. Y., VAN DER MERWE, P. A., BELL, J. I. & JAKOBSEN, B. K. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alphaalpha. **J. Biol. Chem.** (2000), 275,15232–15238.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES**. GST gene fusion system**. Disponível em: <http://proteins.gelifesciences.com/~/media/protein-purification-ib/documents/handbooks/gst_gene_fusion_system_handbook.pdf?la=en.> Acessado em: 05/03/2017.

GERAGHTY D.E., KOLLER B.H., ORR, H.T. A human major histocompatibility complex A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment**. Proc Natl Acad Sci** U S A, 1987. 84, 9145-9.

GEENEN V. Thymus and type 1 diabetes: an update. **Diabetes Res Clin Pract**. 2012. Oct;98(1):26-32

GOBIN SJ , VAN DEN ELSEN PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA -E,HLA-F,and HLA-G. **Hum Immunol.** 2000 Nov; 61(11):11027

GONEN-GROSS T, ACHDOUT H, GAZIT R, et al. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. **J Immunol** 2003;171:1343-1351

GRASER, R. T., T. P. DILORENZO, F. WANG, G. J. CHRISTIANSON, H. D. CHAPMAN, D. C. ROOPENIAN, S. G. NATHENSON, and D. V. SERREZE. Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. **J. Immunol**. Vol:164: 3913–3918. 2, 2000.

GREGORI S. Editorial: HLA-G-Mediated Immune Tolerance: Past and New Outlooks. **Front Immunol.** 2016 Dec 27;7:653.

GROSS JL, SILVEIRO SP, CAMARGO JL et al. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 16-26.

HASKINS, K., and M. MCDUFFIE. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4 islet-specific T cell clone. **Science.** Vol. 249: 1433–1436, 1990.

HEROLD K.C., VIGNALI D.A.A, COOKE A. et al., Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. **Nature Immunology.** Vol. 13, 243-256, Abril 2013.

ILLUMINA. **TruSeqTM Small RNA Sample prepariton guide.** Novembro 2010.

ILLUMINA. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.** Maio 2016.

JONGBLOET PH, GROENEWOUD HM, HIRASING RA, VAN BS. Seasonality of birth in patients with childhood diabetes in The Netherlands. **Diab care;** Vol. 21, 190–191, 1998.

KAHN HS, MORGAN TM, CASE LD, et al. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diab care** Vol.32, 2010–2015, 2009.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação.** Rio de Janeiro, IBGE, 2014, 180p.

JIA B, JEON CO. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biol.** 2016 Aug;6(8).

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION**. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 6aed. Brussels: International Diabetes Federation, 2014.** Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 19/01/2014.

KNOWLER WC, FOWLER SE, HAMMAN RF et al. DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. **Lancet.** 2009; 374:1677-86.

LAITINEM O., HONKANEM H., PAKKANEM O. et al., Coxsackievirus B1 is associates with induction of β-cell autoimmunity that portends Type 1 diabetes. **Diabetes**, Vol. 63, 446 – 455, Fevereiro de 2014.

LEMAOULT J., LE DISCORDE M., ROUAS-FREISS N., MOREAU P., MENIER C., MCCLUSKEY J. CAROSELLA E.D.. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens.** 2003. 62, 273-84.

LEMAOULT, J. ZAFARANLOO K, LE DANFF C, CAROSELLA ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB J**. (2005) 19, 662–664.

LE PAGE ME, GOODRIDGE JP, JOHN E, CHRISTIANSEN FT, WITT CS.Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-γ responses to soluble HLA-G preparations. **J Immunol.** 2014 Jan 15;192(2):732-40.

LESLIE D. & VALERI C.. Latente autoimmune diabetes in adults (LADA). **Health Delivery**, Volume 48, p. 14-16, Dezembro de 2003.

LI C, TOTH I, SCHULZE ZUR WIESCH J, PEREYRA F, RYCHERT J,ROSENBERG ES, VAN LUNZEN J, LICHTERFELD M, YU XG. Functional characterization of HLA-G+ regulatory T cells in HIV-1infection. **PLoS Pathog**. 2013; 9: 1003-140.

LIANG S, HORUZSKO A. Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G. **Hum Immunol.** 2003 Nov;64(11):1025-32.

LILA N., ROUAS-FREISS N., DAUSSET J. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cell regulatory mechanism. **Proc Natl Acad Sci** USA. 2001. 98:12150-12155.

LIVAC K.J, SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ddCt method. **Methods.** 2001; 25:401-408 243

MALEK TR. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**. 2008; 26:453–479.

MARCHAL-BRAS-CONCALVES R., ROUAS-FREISS N., CAROSELLA E.D., KIRSZENBAUN M., GUILLET J. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Transplant Proc.** 2001. 33:2355–2359.

MARIE JC, LETTERIO JJ, GAVIN M, RUDENSKY AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Exp Med.** Vol. 201, N.7,1061–1067, 2005.

MCKINNEY PA. Seasonality of birth in patients with childhood Type I diabetes in 19 European regions. **Diabetologia**, V.44 (Suppl 3):B67–B74, 2001.

MENIER, C., RABREAU M., CHALLIER J., et al., Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, 2004. 104(10): p. 3153-60.

MENIER C, SAEZ B, HOREJSI V, MARTINOZZI S, KRAWICE-RADANNE I, BRUEL S, LE DANFF C, REBOUL M, HILGERT I, RABREAU M, LARRAD ML, PLA M, CAROSELLA ED, ROUAS-FREISS N. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. **Hum Immunol**. 2003 Mar;64(3):315-26.

MILLER, J. B., M. C. APPEL, J. J. O'NEIL, AND L. S. WICKER. Both the lyt-2 and l3t4 t cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J. Immunol**. 140: 52–58. 1988.

MITRE T.M., PIETROPAOLO M., KHADRA A. The dual role of autoimmune regulator in maintaining normal expression level of tissue-restricted autoantigen in the thymus: A modeling investigation. **Math Biosci**. 2016 Oct 17.

MORRAN M.P., VONBERG A., KHADRA A., PIETROPAOLO M. Immunogenetics of type 1 Diabetes mellitus. **Mol Aspects Med.** Vol. 42, 42–60. Abril, 2015. doi:10.1016/j.mam.2014.12.004.

MOREAU P, MOUILLOT G, ROUSSEAU P, MARCOU C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 2003;100:1191-6.

MOUILLOT G, MARCOU C, ROUSSEAU P, ROUAS-FREISS N, CAROSELLA ED, MOREAU P. HLA-G gene activation in tumor cells involves cis-acting epigenetic changes. **Int J Cancer**. 2005 Mar 1;113(6):928-36.

MURDACA, G., et al., Immunoregulatory Role of HLA-G in Allergic Diseases. **J Immunol Res,** 2016. 2016: p. 6865758.

NABIH ES, ANDRAWES NG. The Association Between Circulating Levels of miRNA-181a and Pancreatic Beta Cells Dysfunction via SMAD7 in Type 1 Diabetic Children and Adolescents. **J Clin Lab Anal**. 2016 Sep; 30(5):727-31. doi:10.1002/jcla.21928. PubMed PMID: 26892629.

NEPOM G. T. & BUCKNER J. A functional framework for interpretation of genetic associations in T1D. **Current Opinion in Immunology**. Vol. 24, 516–521, Julho de 2012.

OLIVEIRA C.S.V., FURUZAWA A.K. & REIS A.F. Diabetes Mellitus tipo Mody. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol.46, N.2 São Paulo. Abril, 2002.

OLIVEIRA E.H., MACEDO C, DONATE PB,et al., Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). **Immunobiology.** 2013 Jan;218(1):96-104.

PATTERSON RJ, HAUDEK KC, VOSS PG, WANG JL. Examination of the role of galectins in pre-mRNA splicing. **Methods Mol Biol.** 2015;1207:431-49.

PERILLO NL, UITTENBOGAART CH, NGUYEN JT, BAUM LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. **J Exp Med 1**997;185:1851-1858.

PETERSON, J. D., and K. HASKINS. Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T cell clones. Differential requirement for CD8 T cells. **Diabetes**. Vol.45: 328 – 336, 1996.

PIETROPAOLO M., TOWNS R. & EISENBARTH G.S. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. **Cold Spring Harb Perspe**ct Med,2:a012831, 2012.

PISTOIA, V., et al., Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? **Semin Cancer Biol**, 2007. 17(6): p. 469-79.

PUNDZIUTE-LYCKA A, URBONAITE B, DAHLQUIST G. Infections and risk of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Lithuanian children. **Diabetol**; Vol.43, 1229–1234, 2000.

RABINOVICH GA, DALY G, DREJA H, TAILOR H, RIERA CM, HIRABAYASHI J, CHERNAJOVSKY Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis**. J Exp Med** 1999;190:385-398.

RABINOVICH GA, RAMHORST RE, RUBINSTEIN N, CORIGLIANO A, DAROQUI MC, KIER-JOFFE EB, FAINBOIM L. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. **Cell Death Differ** 2002;9:661-670.

RICCI G., PIRILLO I., TOMASSONI D., SIRIGNANO A. & GRAPPASONNI I. Metabolic syndrome, hypertension, and nervous system injury: Epidemiological correlates, Clinical and Experimental Hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension.** Jan/2017. DOI:10.1080/10641963.2016.1210629

RODRIGUEZ-CALVO T. & von HERRATH M.G. Enterovirus Infection and Type 1 Diabetes: Closing in on a Link? **Diabetes**. Vol. 64, 1503–1505, maio de 2015.

ROUSSEAU P, LE DISCORDE M, MOUILLOT G, MARCOU C, CAROSELLA ED, MOREAU P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA -G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol.** 2003 Nov; 64(11):1005-10

ROSANO G. & CECCARELLI E. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front. Microbiol**., 17 April 2014 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172.

ROUAS-FREISS N, GON¸ CALVES RM-B, MENIER C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from

maternal uterine natural killer cytolysis. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 1997;94:11520–5.

ROUAS-FREISS N, MOREAU P, LEMAOULT J, CAROSELLA ED. The dual role of HLA-G in cancer. **J Immunol Res.** 2014;2014:359748.

SABER LT, MOREAU P, DONADI EA. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. **Hum Immunol.** 2012 Jan;73(1):52-9. Epub 2011 Oct 14.

SASAGURI K, YAMADA K, NARIMATSU Y, OONUKI M, OISHI A, KODA K, KUBO KY, YAMAMOTO T, KADOYA T. Stress-induced galectin-1 influences immune tolerance in the spleen and thymus by modulating CD45 immunoreactive lymphocytes. **J Physiol Sci.** 2016 Aug 29.

SCHRANZ D.B. & LERNMARK A. Immunology in diabetes: an update. **Diabetes Metab. Rev.** Vol.14, 3–29,1998.

SEBASTIANI, G., VENDRAME, F., DOTTA, F. MicroRNAs as new tool for exploring type 1 diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy Transplant. **Proc**., 43 (1) (2011), pp. 330–332.

SELIGER B. Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors. **Hum Immunol.** 2016 Sep;77(9):760-3.

SEYHAN AA, NUNEZ LOPEZ YO, XIE H, YI F, MATHEWS C, PASARICA M, PRATLEY RE. Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: a pilot cross-sectional study. **Sci Rep.** 2016 Aug 25;6:31479.

SHI WW, LIN A, XU DP, BAO WG, ZHANG JG, CHEN SY, LI J,YAN WH. Plasma soluble human leukocyte antigen-G expressionis a potential clinical biomarker in patients withhepatitis B virus infection. Hum Immunol. 2011; 72: 1068-1073

SØRENSEN H.P. and MORTENSEN K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology** 115(2):113-28, 2005. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

SOSENKO JM, PALMER JP, GREENBAUM CJ, MAHON J, COWIE C, KRISCHER JP et al. Patterns of metabolic progression to type 1 diabetes in the diabetes Prevention trial-type 1. **Diabetes Care**. Vol. 29, N.3, 643-649, 2006.

SOUZA, D.M., et al., Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological Stages of Helicobacter pylori Infection: A Role for Subverting Immune Responses? **Scand J Immunol**, 2016. 83(1): p. 38-43.

SOTOMAYOR CE, RABINOVICH GA. “Galectin-1 induces central and peripheral cell death: Implications in T-cell physiopathology”. **Dev Immunol** 2000;7:117-129.

STENE LC, BARRIGA K, HOFFMAN M, KEAN J, KLINGENSMITH G, NORRIS JM et al. Normal but increasing hemoglobin A1c levels predict progression from islet autoimmunity to overt type 1 diabetes: diabetes Autoimmunity study in the Young (dAisY). **Pediatr diabetes.** Vol. 7, N.5, 247-253, 2006.

STRENSTRÖM G., GOTTSÄTER, A., BAKHTADZE E., BERGER B. SUNDKVIST G. Latent autoimmune diabetes in adults definition, prevalence, β-cell function, and treatment. **Diabetes** 54 (Suppl. 2):S68 –S72, 2005.

STOWELL S. R. & CUMMINGS R.D. Galectins Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, 1064-3745 ; 1207;Humana Press (NY), 1rst ed., 2014.

TANG Q, ADAMS JY, PENARANDA C, MELLI K, PIAGGIO E, SGOUROUDIS E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. **Immunity.** Vol. 28, N. 5, 687–697. 66.

Tirado-González I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. **Mol Hum Reprod.** 2013 Jan;19(1):43-53.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.** 1993; 329(14):977-86.

TORRES M.I., MOREAU O, ROUAS-FREISS N., et al. HLA-G today. **Imunologia.** (2001), Vol. 20, N.1, 18-29.

VAISERMAN AM, CARSTENSEN B, VOITENKO VP, et al. Seasonality of birth in children and young adults (0–29 years) with type 1 diabetes in Ukraine. **Diabetologia.** Vol.50, 32–35, 2007.

VAN DEN BRULE FA, FERNANDEZ PL, BUICU C, LIU FT, JACKERS P, LAMBOTTE R, CASTRONOVO V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev Dyn** 1997;209:399-405.

VAN DEN ELSEN PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. **Front Immunol.** 2011 Oct 4;2:48

VIGANO, S., ET AL., HLA-G+ HIV-1-specific CD8+ T cells are associated with HIV-1 immune control. **AIDS**, 2017. 31(2): p. 207-212.

VOSS PG, GRAY RM, DICKEY SW, WANG W, PARK JW, KASAI K, HIRABAYASHI J, PATTERSON RJ, WANG JL. Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. **Arch Biochem Biophys**. 2008 Oct 1;478(1):18-25.

VUCKOVIC S, WITHERS G, HARRIS M, KHALIL D, GARDINER D, FLESCH I, et al. Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children. **Clin Immunol**. Vol.123, N.3, 281–288, 2007.

XIAO,S., SHILOACH, J., and BETENBAUGH M.J. Engineering Cells to Improve Protein Expression. **Curr Opin Struct Bio**l. 2014 Jun; 0: 32–38. Published online 2014 Apr 3. doi: 10.1016/j.sbi.2014.03.005.

YAMAZAKI S, IYODA T, TARBELL K, OLSON K, VELINZON K, INABA K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **J Exp Med**. Vol.198, N.2, 235–247, 2008.

YAN W., LIN A., CHANG C., FERRONE S. Induction of HLA-G expression in a melanoma cell line OCM-1A following the treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cell Research, 1**5(7):523-531, 2005.

ZAHEDNASAB, H. AND S. KARAMPOOR, The correlation of HLA-G with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol, 2**016. 291: p. 28.

ZHANG Y, FENG ZP, NASELLI G, BELL F, WETTENHALL J, AUYEUNG P, ELLIS JA, PONSONBY AL, SPEED TP, CHONG MM, HARRISON LC. MicroRNAs in CD4(+) T cell subsets are markers of disease risk and T cell dysfunction in individuals at risk for type 1 diabetes. **J Autoimmun**. 2016 Apr;68:52-61.

ZIMMET P., TUOMI T., MACKAY I. R., ROWLEY M. J., KNOWLES W., COHEN M., LANG D.A. Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults (LADA): the Role of Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase in Diagnosis and Prediction of Insulin Dependency. **Diabetic Medicine.** Abril 1994. DOI: 10.1111/j.1464-5491.1994.tb00275.

ZUNIGA E, GRUPPI A, HIRABAYASHI J, KASAI KI, RABINOVICH GA. Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: Modulation of microbicidal activity and survival. **Infect Immun** 2001;69:6804-6812.

White NM, Masui O, Newsted D, Scorilas A, Romaschin AD, Bjarnason GA, Siu KW, Yousef GM. Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. Br **J Cancer.** 2014 Mar 4;110(5):1250-9.

WILSON TJ, FIRTH MN, POWELL JT, HARRISON FL. The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. **Biochemical Journal.** Vol. 261(3):847-852, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Geneve: WHO, 2002.

WU YL., DING YP., GAO J, TANAKA Y., et al. Risk Factors and Primary Prevention trials of Type 1 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, Vol.9, N. 6, 666-679, 2013. doi: 10.7150/ijbs.661.

ANEXOS

ANEXO 01: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do antígeno leucocitário humano-G (HLA-G) e da Galectina-1 (GAL-1) na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 1", protocolo nº 15.1.636.60.2, sob a responsabilidade de Flávia Porto Pelá e Marcelo Dias Baruffique envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) *ad referendum* em 30/09/2015.

Vigência do Projeto	20/09/2015 a 20/09/2016	
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico BALB/C	*Gallus gallus domesticus*
Nº de animais	06	03
Peso	20-25 g	1,4 – 1,6 kg
Sexo	Fêmea	Fêmea
Origem	Biotério da FCFRP-USP	Criadouro de galinhas da FCAV da UNESP-Jaboticabal

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2015.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892

ANEXO 02: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HC FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2012

Ofício nº 3402/2012
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"MARCADORES TRANSCRICIONAIS DE PREDIÇÕES DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS NO DIABETES MELLITUS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 354ª Reunião Ordinária realizada em 24/09/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – paciente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle,** de acordo com o Processo HCRP nº 12541/2012.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

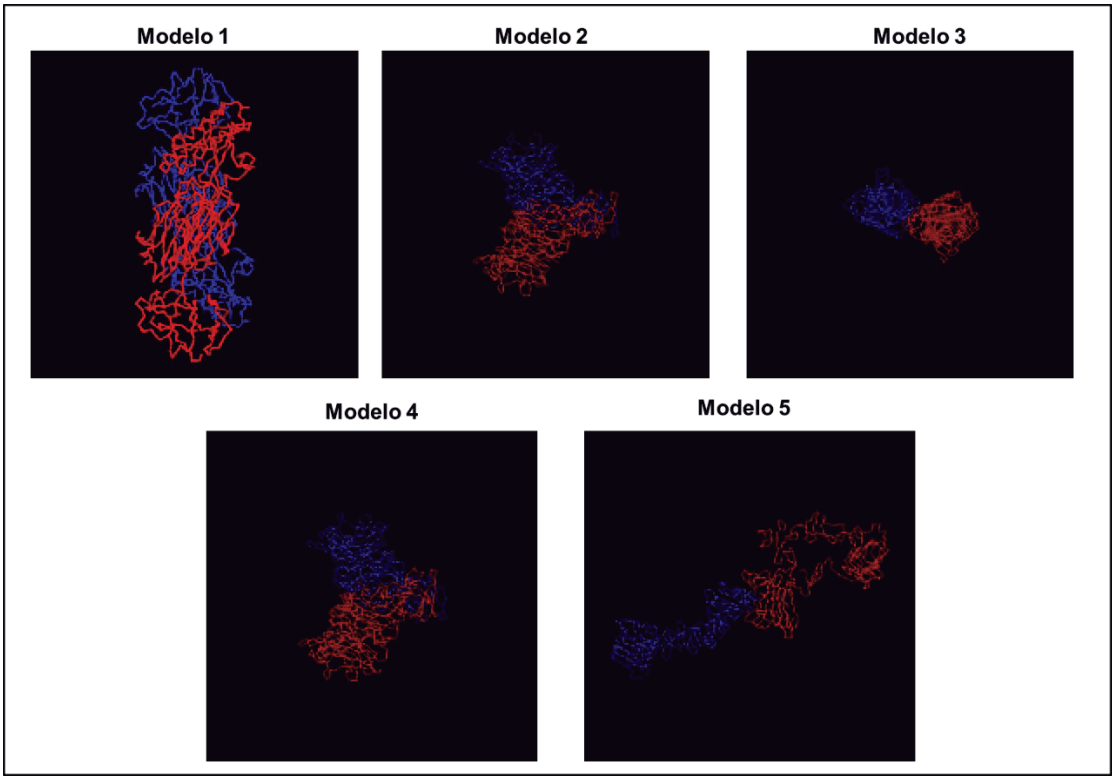
Atenciosamente.

Marcia Villanova

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI
Depto. de Clínica Médica

ANEXO 03: Predição da estrutura complexa do rhHLA-Gproteína-proteína por rearranjo multimérico a partir da sequência da proteína recombinante.



Fonte: Mukherjee S. & Zhang Y., 2011.