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

**ÁLEX CARDOSO DE SOUZA**

# Identificação de fatores de transcrição em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) por meio de análise sequenciamento de RNA

**RIBEIRÃO PRETO - SP**
**2021**

**ÁLEX CARDOSO DE SOUZA**

# Identificação de fatores de transcrição em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) por meio de análise sequenciamento de RNA

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

**Área de Concentração**: Genética.

**Orientador:** Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2021**

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

**Catalogação da Publicação**

Souza, Álex Cardoso.

Identificação de fatores de transcrição em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) por meio de análise sequenciamento de RNA / Álex Cardoso de Souza; orientador Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder. Ribeirão Preto, 2021.

Nº páginas 80f.il.

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

1. Células tímicas epiteliais medulares. 2. Células tímicas epiteliais corticais (cTEC). 3. Timócitos. 4. Expressão gênica.

**APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) com apoio e suporte financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.378676/2019-01;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP.

Nome: SOUZA, Álex Cardoso

Título: Identificação de fatores de transcrição em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) por meio de análise sequenciamento de RNA

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

Aprovada em: ___/___/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

**Agradecimentos**

Agradeço a todos e a todas que acreditaram neste trabalho e de certa forma insistiram em sua realização com o apoio inerente de cada um.

Agradeço à minha família, especialmente meu pai Odaires e minha irmã Thállyta Lorrayne por serem meu porto, meu sustento de acreditar nos sonhos mesmo em dificuldades tornando os esforços realizáveis mesmo em toda distância física.

Aos meus colegas de trabalho que ajudaram em suas medidas possíveis na realização deste trabalho, apoio e conhecimento compartilhado.

Ao meu psiquiatra e psicólogo que socorreu à cuidados emergenciais de minha saúde mental durante o período deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos que estão na minha caminhada lutando sempre pelo meu bem-estar.

Aos padres Carmona e Borini pelo direcionamento espiritual em minha jornada diária.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Santa Casa – Sertãozinho (SP) que juntos na linha de frente enfrentamos a pandemia do coronavírus.

Meus sinceros agradecimentos aqueles que acreditam na ciência e reconhecem sua importância no enfrentamento da Covid-19, entendendo que ciência não é gasto, mas, investimento.

*“A vida trabalha para a nossa harmonia. Ninguém pode ter saúde física e mental sem limpar o coração, largar o passado e perdoar a ignorância alheia.”*

*(Desconhecido)*

**Resumo**

SOUZA, Álex Cardoso. **Identificação de fatores de transcrição em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) por meio de análise sequenciamento de RNA.** 2021. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A não responsividade dos autoantígenos que refere à tolerância imunológica central envolve processos de desenvolvimento e seleção de linfócitos T que caracteriza o crosstalk tímico entre os timócitos e células tímicas epiteliais. Em mTECs, o processo de eliminação de timócitos autorreativos contra a expressão de TRAs ocorre por meio da eliminação por apoptose antes destas células chegarem a periferia. Os principais genes envolvidos no processo da tolerância imunológica são o Aire e o Fezf2, correspondendo a aproximadamente 60% de todos os TRAs expressos nas células mTECs, logo, hipotetizamos que 40% desses TRAs expressos possa ser evidenciado e que existem genes ainda não identificados. Foi realizado um ensaio de adesão das células tímicas epiteliais medulares comparado com células tímicas epiteliais corticais aos timócitos extraídos por timectomia de camundongos, onde, demonstrou-se que houve uma redução no número de fatores de transcrição após o processo de adesão causando uma modulação. A análise de bioinformática dos dados de sequenciamento de RNA (análise de qualidade, trimagem, indexação do genoma e análise estatística) mostrou genes diferencialmente expressos que foram identificados e classificados por enriquecimento funcional. Identificamos os potenciais fatores de transcrição antes da adesão com 73 diferencialmente expressos, enquanto que, após adesão 55 genes diferencialmente expressos. Esse estudo demonstra a predição de novos fatores de transcrição no processo de adesão das células tímicas aos timócitos.

**Palavras-chave:** Células epiteliais tímicas medulares (mTECs), Células epiteliais tímicas medulares (cTECs), Aire, Fezf2, Sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

Abstract

SOUZA, Álex Cardoso**. Identification of transcription factors in medullary epithelial thymic cells (mTECs) through RNA sequencing analysis**. 2021. Master's Dissertation, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

The unresponsiveness of autoantigens that refers to central immunological tolerance involves processes of development and selection of T lymphocytes that characterize the thymic crosstalk between thymocytes and epithelial thymic cells. In mTECs, the process of elimination of autoreactive thymocytes against the expression of TRAs occurs through elimination by apoptosis before these cells reach the periphery. The main genes involved in the process of immunological tolerance are Aire and Fezf2, corresponding to approximately 60% of all TRAs expressed in mTECs cells, so we hypothesize that 40% of these TRAs expressed can be evidenced and that there are still unidentified genes. An adhesion assay of medullary epithelial thymic cells compared with cortical epithelial thymic cells to thymocytes extracted by mouse thymectomy was performed, where it was demonstrated that there was a reduction in the number of transcription factors after the adhesion process causing a modulation. Bioinformatics analysis of RNA sequencing data (quality analysis, trimming, genome indexing and statistical analysis) showed differentially expressed genes that were identified and classified by functional enrichment. We identified potential transcription factors before adhesion with 73 differentially expressed, while after adhesion 55 differentially expressed genes. This study demonstrates the prediction of new transcription factors in the process of thymic cell adhesion to thymocytes.

**Keywords:** Medullary thymic epithelial cells (mTECs), Medullary thymic epithelial cells (cTECs), Aire, Fezf2, RNA sequencing (RNA-Seq).

## Lista de Figuras


| Figuras | Descrição | Página |
|---|---|---|
| **Figura 1** | Localização anatômica do timo | **17** |
| **Figura 2** | Corte histológico hematoxilina/eosina do timo. | **18** |
| **Figura 3** | Representação esquemática dos processos de seleção positiva e seleção negativa no timo. | **20** |
| **Figura 4** | Representação das mutações encontradas no cromossomo 21 em pacientes com APECED/APS1 | **22** |
| **Figura 5** | Representação das mutações descritas no gene Aire | **22** |
| **Figura 6** | Representação descritiva dos sintomas de pacientes com APECED / APS1. | **23** |
| **Figura 7** | Representação esquemática dos éxons do gene Aire em humanos e camundongos. | **24** |
| **Figura 8** | Mecanismo de ação da proteína AIRE. | **25** |
| **Figura 9** | Representação da atuação da proteína AIRE nas mTECs | **26** |
| **Figura 10** | Representação gráfica em porcentagem de TRAs nas células mTECs controlados por Aire e Fezf2. | **28** |
| **Figura 11** | Pipeline de análises de dados de RNA-Seq | **41** |
| **Figura 12** | Gráfico resultante da análise comparativa entre cTECs em condições diferentes de tempo | **45** |
| **Figura 13** | Exemplificação de qualidade das sequências das amostras pelo sequenciamento Illumina | **46** |
| **Figura 14** | *Volcano plot* mostrando a distribuição dos genes diferencialmente antes adesão | **48** |
| **Figura 15** | Heatmap do agrupamento hierárquico não supervisionado dos genes diferencialmente expressos antes adesão | **45** |
| **Figura 16** | *Volcano plot* mostrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos após adesão | **52** |

| | | |
|---|---|---|
| **Figura 17** | Heatmap do agrupamento hierárquico não supervisionado dos genes diferencialmente expressos após adesão | **53** |
| **Figura 18** | Proporção dos tipos de genes diferencialmente expressos encontrados e fatores de transcrição nas células mTEC versus cTEC antes e depois do ensaio de adesão com timócitos | **56** |
| **Figura 19** | Proporção de quantidade de genes induzidos e reprimidos dos genes diferencialmente expressos classificados como fatores de transcrição | **57** |
| **Figura 20** | Heatmap genes diferencialmente expressos classificados pelo enriquecimento funcional como fatores de transcrição | **58** |

## Lista de Tabelas


| Tabela | Descrição | Página |
|---|---|---|
| **Tabela 1** | Total de reads de input e quantidade de reads mapeadas | **47** |
| **Tabela 2** | Lista dos genes diferencialmente expressos mais induzidos nas mTECs antes da adesão | **49** |
| **Tabela 3** | Lista dos genes diferencialmente expressos mais reprimidos nas mTECs antes da adesão | **50** |
| **Tabela 4** | Lista dos genes diferencialmente expressos mais induzidos nas mTECs após adesão | **53** |
| **Tabela 5** | Lista dos genes diferencialmente expressos mais reprimidos nas mTECs após adesão | **54** |
| **Tabela 6** | Ranking dos genes diferencialmente expressos antes da adesão | **59** |
| **Tabela 7** | Ranking dos genes diferencialmente expressos após adesão | **59** |

**Lista de Siglas e Abreviaturas**

µl: microlitro

µg: micrograma

ng: nanograma

>: maior

<: menor

≥: maior ou igual

≤: menor oi igual

aa: aminoácido

Aire: gene Autoimmune regulator

AIRE: proteína codificada pelo gene Autoimmune regulator

APC: célula apresentadora de antígeno

APECED: (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)

APS1: síndrome autoimune poliglandular do tipo 1

CARD: (Caspase recruitment domain): domínio recrutador de caspase Cas9: (CRISPR associated protein 9), Proteína 9 associada a CRISPR CBP: proteína ligadora de CREB

CD80: T-Lymphocyte Activation Antigen CD80

cDNA: DNA complementar

CPC: calculador de potencial codificador

cm2: centímetros quadrados

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

cTEC: célula epitelial tímica cortical

DC: Célula dendrítica

DN: Duplo negativo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA-PK: proteína quinase

DP: Duplo positivo

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

FASTQ: formato utilizado para representar sequências geradas por sequenciadores.

FDR (False Discovery Rate): Taxa de falsa descoberta

gRNA: RNA guia

H3K4me3: trimetilação da lisina 4 da histona H3

Indel: Inserções/deleções

IL: interleucina

IFN: interferon

kb: kilobase

kDa: kilodaltons

KO: knockout

LES: lúpus eritematoso sistêmico

lncRNA: RNA longo não codificante

mL: mililitro

mM: milimolar

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

mTEC: célula epitelial tímica medular

ncRNA: RNA não codificante

NF-κB (Nuclear Factor Kappa B): Fator Nuclear Kappa B

nt: Nucleotídeo

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PGE: expressão gênica promíscua

PHD (plant homeodomain): Homeodominio de planta

PRR: Região rica em prolina

P-TEFb: fator b alongador positivo da transcrição

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

Read: fragmento sequenciado.

RIN: número de integridade do RNA

RNA pol II: RNA polimerase II

rRNA: RNA ribossômico

RNA-Seq: sequenciamento de RNA

RNAi: RNA de interferência

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

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SP: Simples Positivo

TCR: receptor de célula T

TEC: célula tímica epitelial

Th: linfócitos T

Helper TNF: fator de necrose tumoral

TRA: Antígeno restrito ao tecido Treg: Célula T reguladora

tRNA: RNA transportador

U: unidade

V: volts

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

WT: Wild-type.

**Sumário**

**1. Introdução** ..... 16
**1.1 Localização anatômica do timo**..... 16
**1.2 O gene Aire (Autoimmune Regulator) controlador transcricional** ..... 20
**1.3 Fezf2 segundo controlador transcricional** ..... 27
**2. Hipótese** ..... 30
**3. Objetivos** ..... 31
**3.1. Objetivos Específicos** ..... 31
**4. Delineamento Experimental** ..... 33
**5. Materias e Métodos** ..... 36
**5.1 Linhagem celular mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18** ..... 36
**5.2 Processo de Timectomia para obtenção de timócitos**..... 36
**5.3 Ensaio de adesão de timócitos com as células mTECs e cTECs**..... 37
**5.4 Extração de RNA**..... 37
**5.5 Quantificação, grau de pureza e análise da integridade das amostras de RNA total**..... 39
**5.6 Análise do transcriptoma das células mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18**..... 40
**5.6.1 Sequenciamento do RNA e construção da biblioteca**..... 40
**5.6.2 Análise bioinformática das sequências de RNA**..... 40
**6. Resultados**..... 44
**6.1 Análise de qualidade, trimagem e montagem do genoma.** 45
**6.2 Análise de genes diferencialmente expressos**..... 47
**6.3 Identificação de fatores de transcrição**..... 55
**7. Discussão**..... 61
**8. Considerações finais**..... 66
**9. Referências Bibliográficas**..... 68
**10. Apêndice**..... 77
**11. Anexos**..... 80

# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O timo e a indução da tolerância imunológica central

O sistema imunológico é um mecanismo de combate contra microrganismos, vírus**,** células cancerosas e antígenos não próprios com consequências fisiológicas e/ou patológicas, que assim, são identificados pelas células de defesa e posteriormente eliminados, funcionando como um mecanismo de barreiras físicas, biológicas e químicas. Uma característica fundamental do sistema imunológico é que possui a capacidade de distinguir entre as moléculas do nosso próprio organismo, considerados antígenos próprios (ou autoantígenos) que representam os diversos tecidos e órgãos, daquelas derivadas de agentes infecciosos e canceres (antígenos não próprios), garantindo assim a homeostase imunológica, controlando a autorreatividade agressiva (MEDZHITOV, 2000; KLEIN *et. al.,* 2014*;* SATTLER, 2017).

Esse conceito é conhecido como *tolerância imunológica* e o equilíbrio desse processo é de suma importância, uma vez que, falhas podem desencadear o desenvolvimento de ataques autoimunes, caracterizadas pela responsividade de células T e B específicas aos antígenos próprios, levando a destruição de estruturas corpóreas importantes de tecidos e órgãos do corpo (GUPTA et al., 2013).

A tolerância imunológica compreende a tolerância central e periférica. Sendo a periférica responsável pela supressão da resposta inflamatória na periferia, as células envolvidas nesse processo são as células T reguladoras (*Treg*), que podem ser naturais (*nTregs*), as quais provêm dos processos de seleções tímicas ou as induzidas (*iTreg*), que são formadas na periferia a partir de células T CD4+ (LI MO, KYEWSKI, B. KLEIN, L. 2006).

Já a tolerância imunológica central, ocorre no timo. O timo é um órgão linfoide primário, envolvido no desenvolvimento e maturação das células T e é considerado de fundamental importância, uma vez que, elimina os linfócitos T com potencial autorreativo (HOGQUIST, 2005)

. O timo encontra-se situado no mediastino anterior, é um órgão bilobado onde cada lóbulo é envolto por tecido conjuntivo denso formando os septos fibrosos

que separam os parênquimas (Figura 1) (MILLER et al.,1961; NOWELL et al., 2007, RUEHL-FEHLERT, 2003).

O microambiente tímico é altamente dinâmico, histologicamente apresenta duas regiões bem definidas, a região externa denominada de córtex tímico e região interna denominada medula tímica (Figura 2) (PETRIE & ZUNIGA-PFLUCKER, 2007; BOEHM, 2008).

Os timócitos e as células tímicas epiteliais (TECs) classificadas como células tímicas epiteliais corticais (*cortical thymic epithelial cells – cTECs*) e células tímicas epiteliais medulares (*medullary thymic epithelial cells – mTECs*) são os principais componentes do microambiente tímico. Sendo que as TECs formam uma rede tridimensional na qual se encontram os timócitos em diferentes estágios. Além disso, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células mesenquimais também estão presentes no timo (NOWELL et al., 2007; BLACKBURN & MANLEY, 2004).

As células T precursoras migram da medula ossea para o timo onde se desenvolvem e amadurecem enquanto migram por esse orgão. As TECs fornecem sinais instrutivos importantes para a diferenciação de células T e aquisição de autotolerância. As cTECs promovem a seleção positiva de timócitos em desenvolvimento, enquanto os mTECs conferem sua seleção negativa. As interações recíprocas entre TECs e timócitos em desenvolvimento são chamadas de "crosstalk tímico" (SAVINO ET AL., 2002; MENDES-DA-CRUZ et al. 2008).

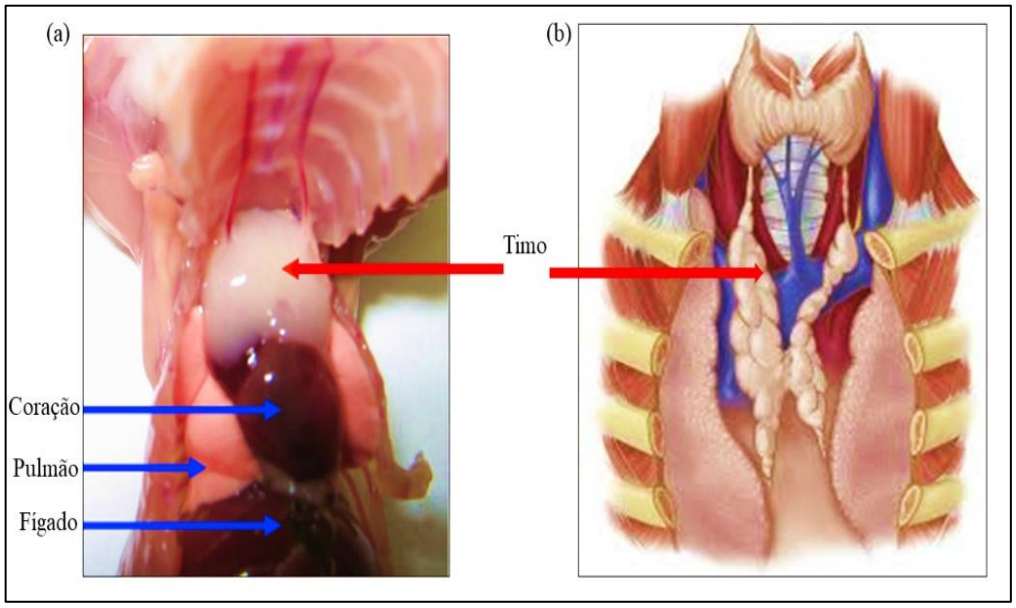


**Figura 1. Localização anatômica do timo. A)** Posição anatômica em camundongos. **B)** Posição anatômica em humanos. (Adaptado RUEHL-FEHLERT *et al*., 2003; SAFIEDDINE & KESHAVJEE, 2011).

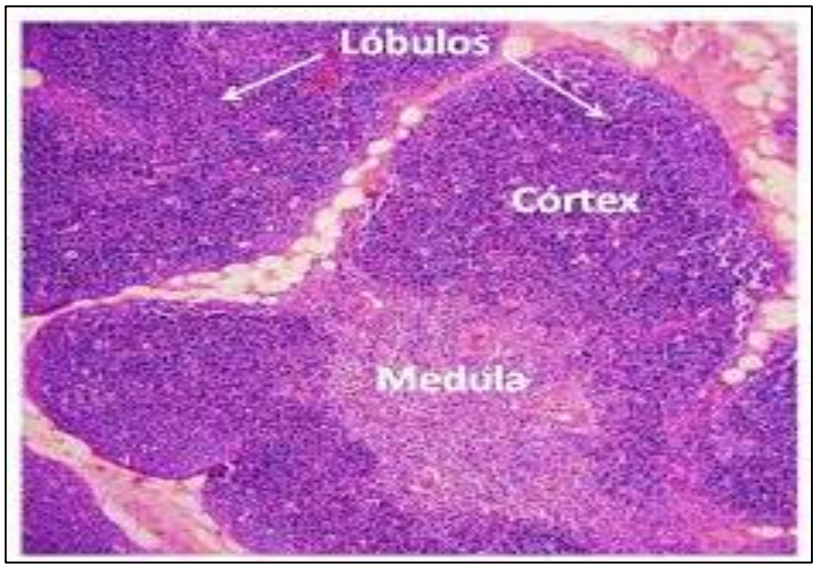



**Figura 2. Corte histológico hematoxilina/eosina do timo**. Representação histológica da região do córtex e da medula tímica e separação dos lóbulos pelos septos fibrosos (NISHINO *et al.,* 2006).

A indução da tolerância imunológica, têm inicio quando os precursores das células T (ou linfócitos T) derivados da medula óssea entram no timo na junção cortico-medular e então migram para a junção subcapsular desse órgão e passam pelo córtex e medula. Nessa etapa as células T passam a ser chamadas de timócitos.

Primeiramente, os timócitos duplo-negativos $CD4^-$ e $CD8^-$ e duplo positivos $CD4^+$ e $CD8^+$ inicialmente interagem com a estrutura cortical aderindo às células epiteliais tímicas corticais (cTECs). Esse processo permite a apresentação de peptídeos próprios via molécula do complexo de histocompatibilidade principal MHC (MHC) de CTECs para os timócitos duplo positivos, os timócitos cujo TCRs se ligam ao complexo peptídeo-MHC próprio com afinidade/avidez intermediária são estimulados a sobreviver. O resultado dessa interação é denominada seleção positiva e faz com que os timócitos duplo positivos se diferenciem em timócitos simples positivos maduros ($CD4^+$ ou $CD8^-$, $CD4^-$ ou $CD8^-$). Aqueles clones de timócitos DP que não reconhecem as moléculas de MHC ou que não passam por essa seleção são induzidos a apoptose (Figura 3) (PASSOS et al. 2015; TAKABA E TAKAYANAGI, 2017).

Em seguida, os timócitos SP e DP restantes migram para a medula onde passarão pela seleção negativa que é mediada pelas células mTECs. As mTECs são células peculiares pois expressam milhares de proteínas típicas de outros órgãos denominados de antígenos restritos a tecidos (TRA), esse processo é denominado *expressão gênica promíscua (Promiscuous Gene Expression – PGE*) e é parcialmente controlada por *Aire* e/ou por *Fezf2* (ANDERSON et al. 2007; PASSOS et al. 2015, 2018; TAKABA et al., 2015). Em camundongos as mTECs expressam cerca de 19 mil genes, que representam cerca de 80% do total do genoma murino (ST-PIERRE et al. 2013, 2015; SANSOM et al. 2014).

A seleção negativa é caracterizada pela adesão entre mTEC-timócito, processo esse crucial, pois permite a exposição da população diversa de timócitos (em termos de suas especificidades TCR α / β) a uma vasta diversidade de antígenos de tecido periférico (TRAs) que são expressos e apresentados pelas mTECs. Os timócitos que expressam TCR de alta afinidade para o peptídeo próprio apresentado via MHC da célula mTEC apresentam potencial autorreativos e são eliminadas por apoptose. Dessa forma, a seleção negativa previne possíveis ataques autoimunes de células T autorreativas à antígenos próprios expressos por tecidos e órgãos na periferia (Figura 3) (ABRAMSON E ANDERSON, 2017; KLEIN et al. 2019)

É importante ressaltar que os timócitos em desenvolvimento e as TECs (mTECs e cTECs) possuem interações essenciais para o processo de migração e diferenciação dos timócitos. Estas interações se dão através da adesão mTEC-timócito / cTEC-timócito, sendo elas, ligadas por proteínas de matriz celular (ECM) e seus receptores. Assim, o processo de adesão é crucial para a seleção positiva e negativa. Desta forma, o comprometimento nas funções moleculares no processo de adesão das TECs aos timócitos perturbam diretamente o processo de adesão célula-célula acarretando autorreatividade e mau funcionamento da seleção positiva e negativa (SAVINO, et al., 2015; PEZZI, et al. 2016)

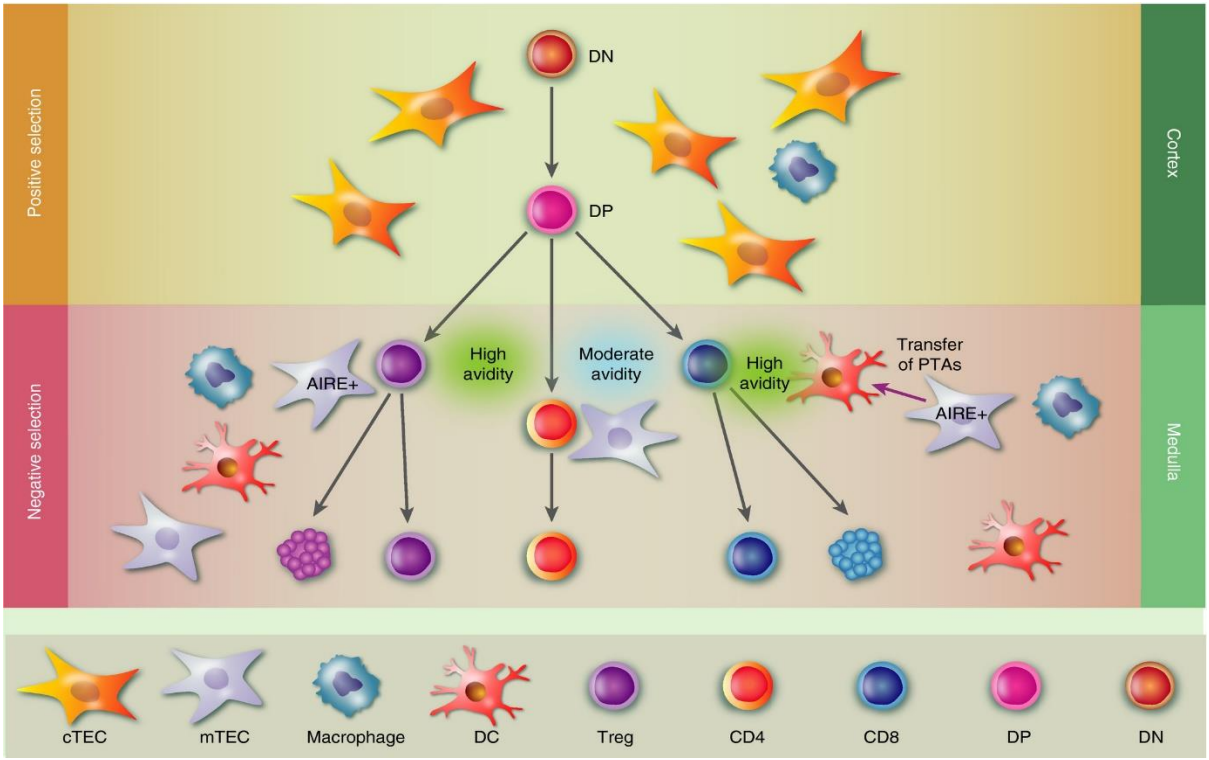



**Figura 3. Representação esquemática dos processos de seleção positiva e seleção negativa no timo.** No córtex tímico, os timócitos duplo negativo $CD4^-$ $CD8^-$ passam pela seleção positiva, os quais, serão testados pelas cTECs em sua capacidade de fraco reconhecimento ao MHC próprio, eliminando assim, por apoptose os timócitos que tiveram falhas neste processo. Os timócitos sobreviventes da seleção positiva passam para segunda etapa, sendo agora, timócitos duplo positivo $CD4^+$ $CD8^+$ migram para a medula tímica, onde passarão pela seleção negativa, sendo assim, testados pelas mTECs que expressam TRAs com auxílio das células apresentadoras de antígenos (APCs), quando apresentados aos timócitos, aqueles reconhecidos com alta avidez dos autoantígenos são eliminados por apoptose e/ou diferenciadas em Tregs, tornando assim, os timócitos sobreviventes desta etapa em simples positivo $CD4^+$ $CD8^-$ / $CD4^-$ $CD8^+$ onde atuarão na periferia (PASSOS *et al.,* 2018).

## 1.2 O gene Aire (*Autoimmune Regulator*) controlador transcricional

O gene *Aire* (*Autoimmune Regulator*) é um dos principais genes responsáveis pelo controle da PGE. Este gene codifica a proteína AIRE que atua como modulador ou controlador transcricional, conduzindo a expressão de milhares de TRAs em mTECs, denominados de Aire-dependentes (MATHIS AND BENOIST, 2009; LAAN and PETERSON, 2013; ANDERSON and SU, 2016). Além de TRAs,

Aire também regula a expressão de uma gama de genes não PTA em mTECs (ANDERSON et al., 2002).

O gene *Aire* está localizado no cromossomo 21q22.3 em humanos, possui 14 éxons, e codifica uma proteína de 545 aminoácidos (aproximadamente 56kDa). Em camundongos Aire é encontrado no cromossomo 10 na posição 39_72CM e também possui 14 éxons. Tanto em humanos quanto em camundongos, a proteína AIRE possuem os mesmos domínios CARD (*caspase-activation and recruitment domain*), NLS (*nuclear localization signal*), SAND domain (Sp100, Aire1,Nucp41/p75 e Deaf1), PHD1/PHD2 (*Plant-homeodomains*) e regiões ricas em prolina que separam os domínios, nesta virtude, considera-se quando em comparação do genoma de ambas espécies uma similaridade de aproximadamente 80% (Figura 4) (ABRAMSON *et al*., 2010 BRUSERUD *et al*., 2016; PASSOS *et al*., 2018).

As mutações no gene *Aire* (Figura 5) levaram a descoberta de uma doença autoimune rara chamada de APECED ou APS1 (*Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy /* Poliendocrinopatia autoimune tipo 1), caracterizada por manifestações imunológicas envolvendo infiltração linfocítica nos órgãos afetados e presença de autoanticorpos específicos (WOLFF, OFTEDAL, 2019).

A mutação mais comum encontrada em pacientes com APECED, foi visto na mudança da Arginina para um códon de parada R257X no éxon 6, apesar de ter sido localizado outras três mutações nos éxons 2, 8 e 10 que geram produtos de proteína AIRE truncados. Nesta descoberta que possibilitou grandes avanços nas pesquisas do gene Aire, foram descritas mais de 100 mutações (Figura 6) que variam desde alterações de nucleotídeos à diversas deleções de grandes regiões (PETTERSON *et al.,*1997; BRUSERUD *et al*., 2016).

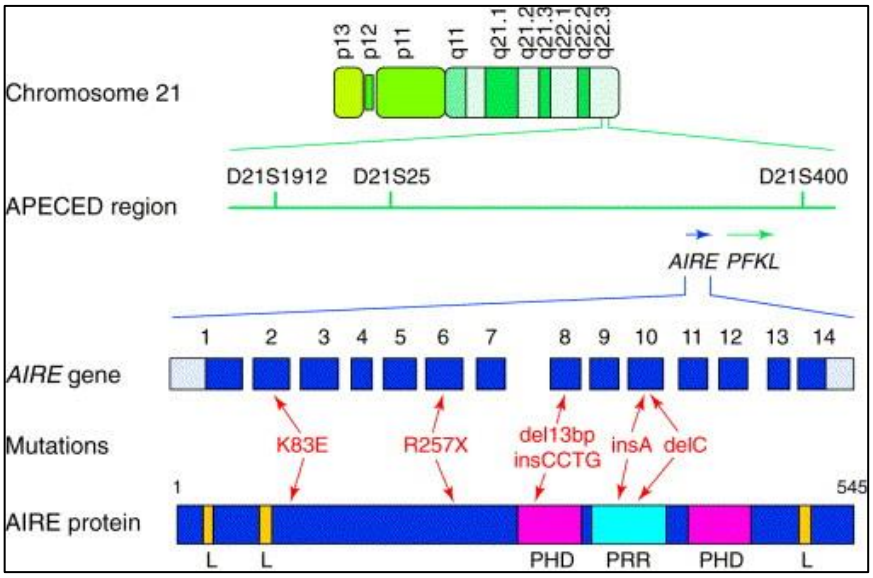



**Figura 4. Representação das mutações encontradas no cromossomo 21 em pacientes com APECED/APS1.** O gene Aire possui 14 éxons, mapeada próxima a extremidade 5' da fosfofructoquinase do tipo hepático (PFKL), a mutação mais comumente descrita está na mudança da Arginina (Arg) para o códon de parada R257X no éxon 6, apesar de existir três outras mutações encontradas em outros éxons, como demonstrados nas setas do esquema (PETTERSON *et al.,* 1998).

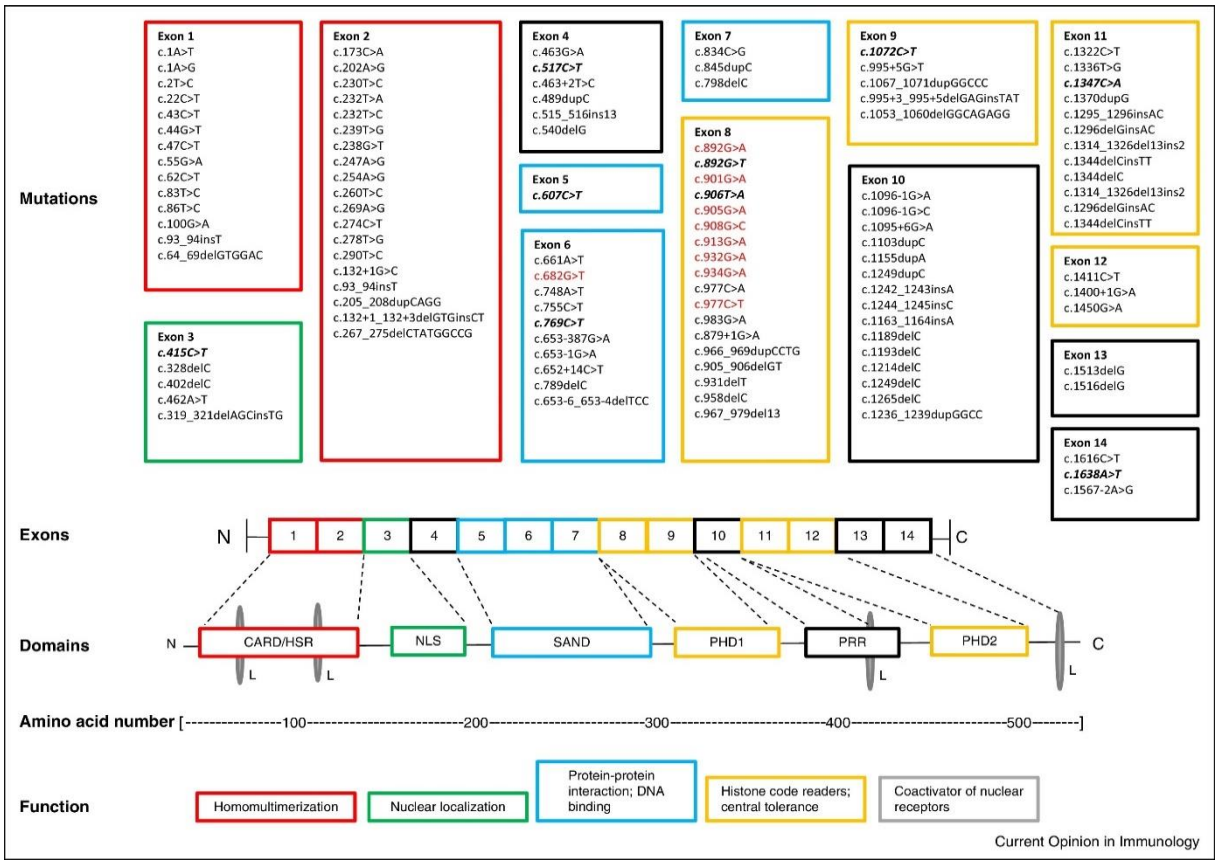


**Figura 5. Representação das mutações descritas no gene Aire.** Os avanços nas pesquisa do gene Aire possibilitou a identificação de 100 mutações em diferentes domínios na proteína AIRE (BRUSERUD *et al.,* 2016).

A APECED tem caráter autossômico recessivo e a maior incidência está em finlandeses, sardenhos e judeus iranianos. Tem como característica em seus principais sintomas, a candidíase mucocutânea, o hipoparatireodismo e a insuficiência adrenal (Figura 7). Para diagnóstico, o portador da síndrome precisa apresentar pelo menos dois destes sintomas, mesmo obtendo diversas outras manifestações autoimunes que variam de indivíduo para indivíduo. (NAGAMINI *et al*., 1997; PETERSON *et al*., 2004; ANDERSON, 2007; HUSEBYE *et al*., 2009; BRUSERUD et. al., 2016; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES - NIAD, 2016).

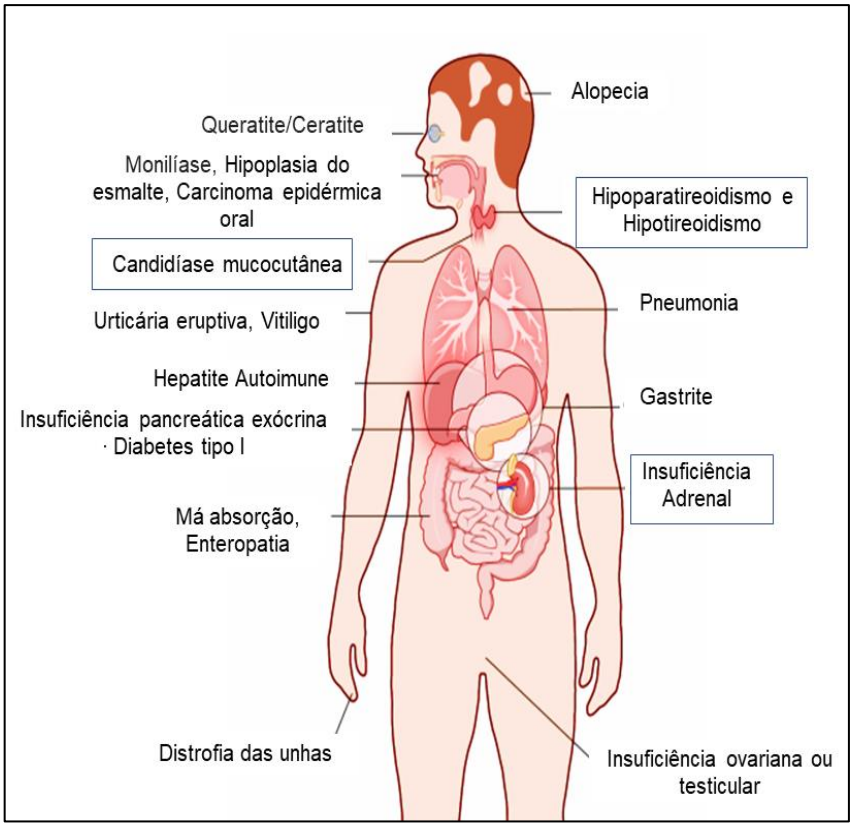



**Figura 6. Representação descritiva dos sintomas de pacientes com APECED / APS1.** O quadro clínico dos pacientes com APECED varia de indivíduo para indivíduo, entretanto, os três principais sintomas encontrados entre os pacientes são: (a) candidíase mucocutânea, (b) hipoparatireodismo e (c) insuficiência adrenal (adaptado de NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES - NIAD, 2016; BRUSERUD et. al., 2016).

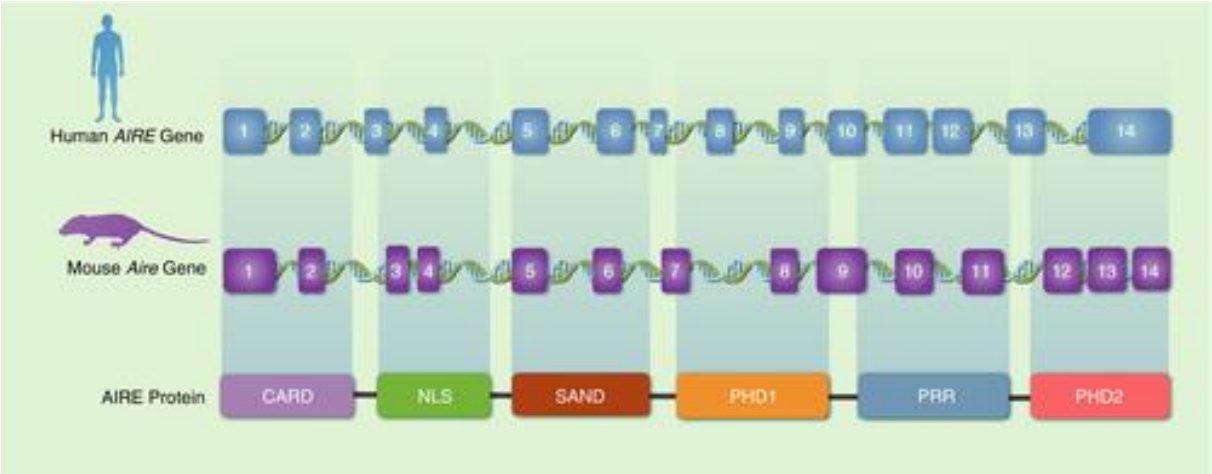



**Figura 7. Representação esquemática dos éxons do gene Aire em humanos e camundongos.** Os éxons e os domínios da proteína AIRE tanto em humanos quanto em camundongos apresentam grandes similaridades (PASSOS et. al., 2018).

Aire controla a expressão de cerca de 3.900 genes em mTECs, mas ao invés de se ligar diretamente ao DNA, como os fatores de transcrição clássicos, a proteina Aire atua como moduladora da transcrição, desempenhando o seu papel dentro de um complexo formado por um conjunto de proteinas denominadas de parceiras de Aire (ANDERSON AND SU 2016; ST-PIERRE et al.2015; MEREDITH et al. 2015; ABRAMSON AND GOLDFARB 2016; PASSOS et al. 2018). Assim, dentro da maquinaria de transcrição das células mTECs, Aire se liga diretamente a RNA Pol II que embora tenham iniciado a transcrição, encontra-se parada nas regiões promotoras dos genes. Assim, Aire facilita a liberação da RNA Pol II para que prossiga com a transcrição gênica, promovendo assim o alongamento da transcrição (GIRAUD et al. 2012).

Como já mencionado, a proteína Aire necessita de associações com outras proteínas parceiras para expressão de genes dependentes de Aire nas mTECs, para isso, a SIRT-1 (Desacetylase sirtuin 1) desacetila resíduos de lisina que ativam a proteína AIRE, a qual, será capaz de reconhecer e ligar a regiões com marcas epigenéticas de repressão da transcrição H3K4me0, logo, a TOP2a (Topoisomerase II) é então associada ao AIRE para promover a quebra de dupla fita do DNA pelas interações de DNA PKs levando o relaxamento da cromatina. Os complexos Brd4 (Bromodomain-containing 4) e pTEFb (Positive transcription elongation fator b) são associados ao AIRE para liberarem a Polimerase II da cromatina, para que as CBPs

(CREB-binding protein) acetile resíduos de lisina para inativação do AIRE. Este processo complexo não é convencional, pois, possibilita além da transcrição de genes codificadores de proteínas, também os microRNAs e RNA longos não codificadores (Figura 8) (PASSOS *et al., 2018;* MACEDO *et. al.,* 2013).

A relação do gene Aire com as mTECs, mostra além da necessidade do controle da maturação e proliferação, ações nos processos de adesão entre mTECs e timócitos, por sua vez, na seleção negativa. Apesar do gene Aire ser expresso em alguns tecidos, especificamente no timo, as mTECs possuem subpopulações que altamente expressam TRAS, sendo elas, as $mTEC^{hi}Aire^{+}$ (fenótipo $CD80^{hi}$ $MHC\text{-}II^{hi}$), e outras que expressam um conjunto menor de TRAs e não expressam o Aire, sendo as $mTEC^{low}Aire^{-}$ (fenótipo $CD80^{low}$ $MHC\text{-}II^{low}$). As mTECs maduras são responsáveis pela expressão de aproximadamente 62% de genes codificadores de antígenos restritos a tecidos nos murinos. No núcleo das mTECs a proteína AIRE (Figura 9) promove em sua maior parte a expressão de TRAs, apresentados via MHC aos timócitos e eliminados por apoptose aqueles reconhecidos em alta avidez, entretanto, outros genes controlados por Aire estão envolvidos em diversos processos não relacionados a expressão de TRAs (MATHIS & BENOIST, 2007; SANSOM *et* al., 2014; ST-PIERRE *et al*., 2015).

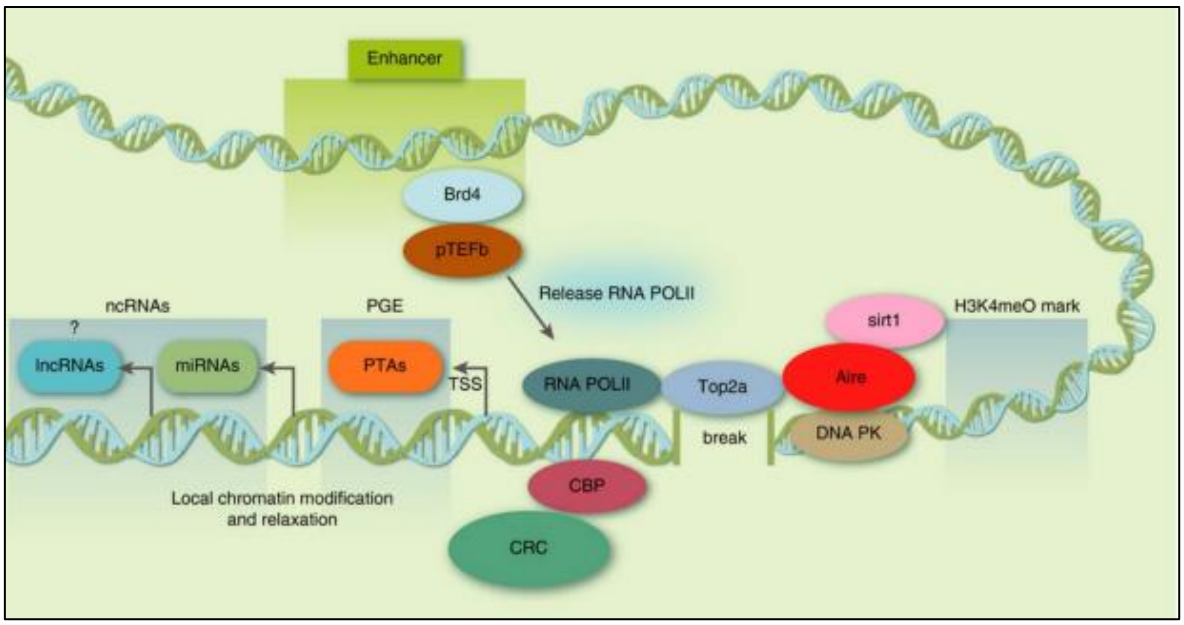



**Figura 8. Mecanismo de ação da proteína AIRE.** A Sirt-1 desacetila resíduos de lisina para ativação do AIRE. Com o reconhecendo das marcas epigenéticas da repressão de H3K4me0 e recrutamento de outras proteínas, poderão assim, ligarem as mesmas. A TOP2a e associações de DNA PKs com proteínas parceiras permitem

a quebra da dupla fita e relaxamento da fita de DNA. Logo, a RNA Polimerase II ancorada na cromatina é liberada pelos complexos Brd4 e pTEFb, ocorrendo assim, a transcrição de variados genes. Por fim, a acetilação dos resíduos de lisina feita pelas CBPs, inativam a proteína AIRE (PASSOS et. al., 2018)

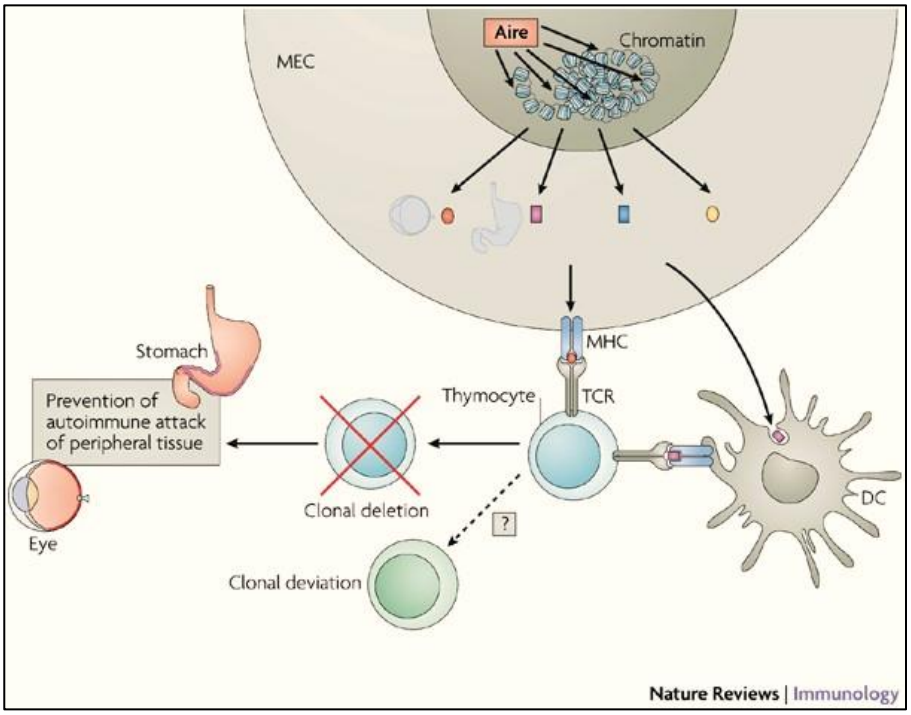



**Figura 9. Representação da atuação da proteína AIRE nas mTECs.** A proteína AIRE atua no núcleo das mTECs promovendo a expressão de TRAs onde serão apresentos aos timócitos por MHC na seleção negativa, dentre esses, quando reconhecidos a alta avidez aos autoantígenos desses TRAs são eliminados por apoptose (MATHIS & BENOIST, 2007).

Aire é considerado um gene pleiotrópico, implicado em diferentes funções ou fenótipos, já que em associação com as proteínas parceiras de Aire, controla a expressão de milhares de genes que estão envolvidos em diferentes funções biológicas nas mTECs. Dessa forma, além de TRAs, Aire pode controlar a tolerância de Células B, um processo observado fora do compartimento tímico (Meyer et al. 2016), regula a expressão de genes que influenciam o recrutamento de células por indução da expressão de quimiocinas (LEI et al. 2011), a adesão mTEC-Timócitos (PEZZI et al., 2016).

Além disso, Aire regula a expressão de miRNAs no timo processo com implicações importantes, uma vez que, os miRNAs atuam no controle pós-transcricional da expressão gênica, consequentemente, pode controlar a PGE

(PASSOS et al. 2015; OLIVEIRA et al. 2016) bem como estão envolvidos na manutenção da arquitetura tímica (MACEDO et al. 2013).

### 1.3 *Fezf2* o segundo controlador da PGE

No que concerne a expressão gênica promíscua e expressão de TRAs em mTECs, o Aire é considerado o principal gene envolvido nesta modulação, todavia, existem ainda outras parcelas de importantes genes que modulam os TRAs na ausência de Aire (DERBINSK et. al., 2005; KLEIN et. al., 2014; TAKABA et. al., 2015).

Um estudo realizado por Takaba e colaboradores (2015), por meio de análises transcriptômicas, comparando a expressão diferencial entre mTECs e cTECs identificou um outro regulador transcricional que atua na indução da expressão de autoantígenos em mTECs, o gene Fezf2 (forebrain-expressed zinc finger 2). A função desse gene era desconhecida com relação ao sistema imunológico, sendo sua função associada até então a diferenciação de neurônio motores (SHIN et. al., 2011; TAKABA et. al., 2015).

Aire e Fezf2 funcionam de forma independente, mas sinergicamente. Enquanto a proteina Aire proteína está associada a várias proteinas parceiras e atua na etapa alongamento da transcrição, a proteína Fezf2 atua como um fator de transcrição clássico, ou seja, liga-se diretamente ao DNA (TAKABA et al. 2015; KLEIN 2015).

Os TRAs expressos em mTECs modulados por Fezf2 e Aire correspondem concomitantemente a cerca de 12,3%d o total de TRAs expressos nessa célula, entretanto, ambos genes apresentam vias de sinalização independentes uma da outra. Enquanto a regulação de Aire corresponde a cerca de 28,9% da expressão de TRAs nas mTECs, o Fezf2 abrange quase 22% desta modulação. Além disso, existem aproximadamente 40% do total de TRAs expressos em mTECs que são regulados por fatores ainda desconhecidos (Figura 10) (TAKABA et. al., 2015).

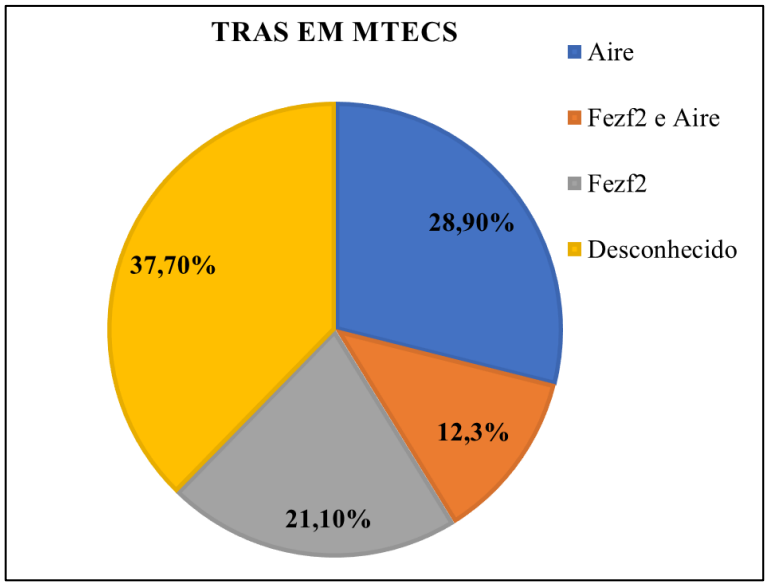



**Figura 10. Representação gráfica em porcentagem de TRAs nas células mTECs controlados por Aire e Fezf2.** Uma significativa porcentagem, cerca de 12,3%, dos TRAs expressos nas mTECs são controlados por Aire e Fezf2 concomitantemente, em contraste, é visto aproximadamente 60% de TRAs dependentes e quase 38% de TRAs são regulados por fatores ainda desconhecidos (Adaptado TAKABA et. al., 2015).

# HIPÓTESE

## 2. Hipótese

Considerando que aproximadamente 60% do total de TRAs são controlados por Aire e/ou Fezf2, e que existe uma parcela correspondente a aproximadamente 40% dos TRAS expressos em mTECs regulados por controladores e/ou fatores transcricionais ainda não conhecidos, formulamos a **hipótese** de que existem genes específicos da célula mTEC que ainda não foram identificados, mas que podem

atuar como fatores de transcrição chave na adesão mTEC-timócitos e no controle da transcrição de TRAs, influenciando assim o processo de seleção negativa no timo.

# OBJETIVOS

## 3. Objetivo Geral

Identificar fatores de transcrição específicos de células mTECs antes e após o ensaio de adesão com timócitos

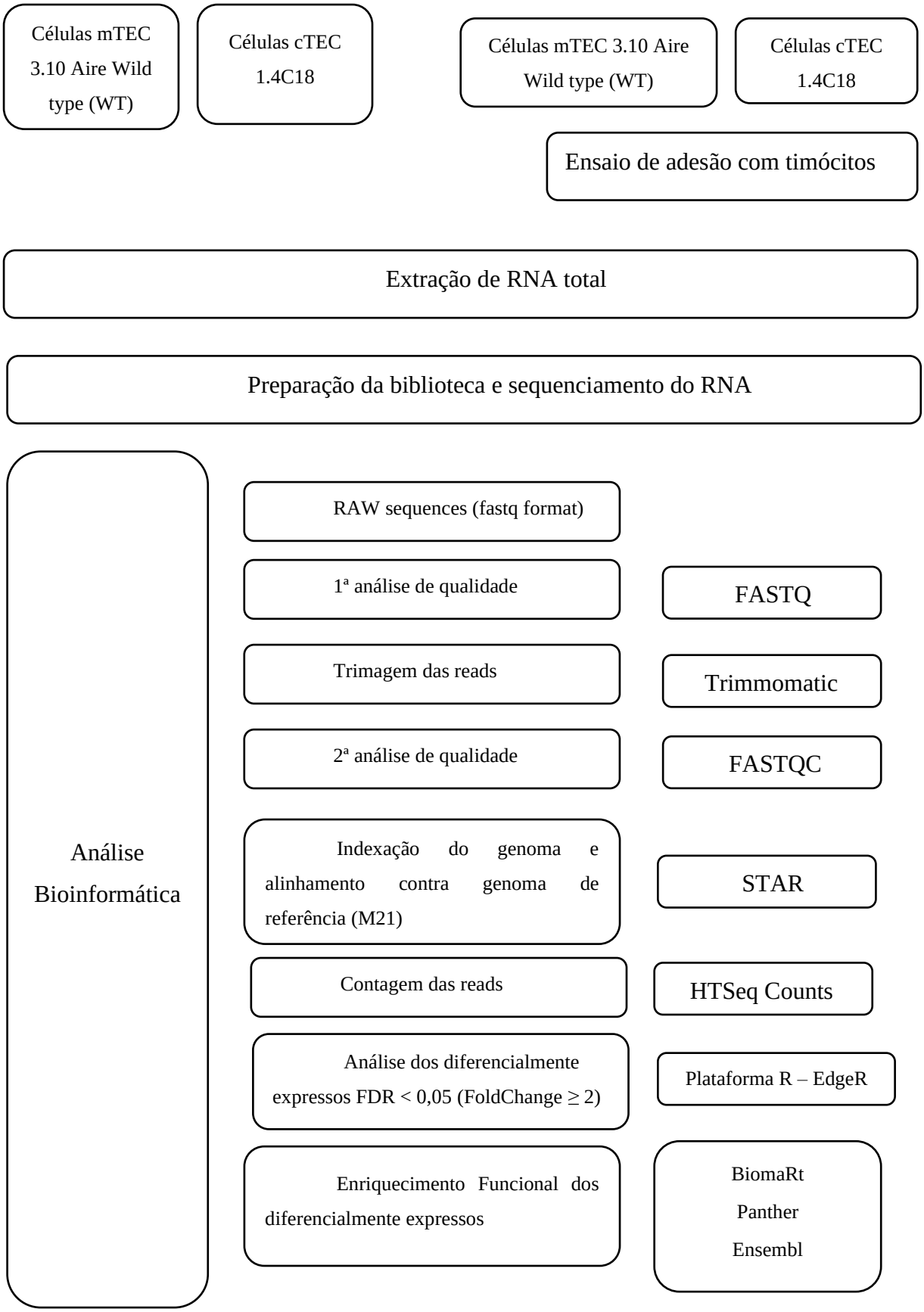
### 3.1 Objetivos específicos

- Identificar os genes diferencialmente expressos em células mTEC3.10WT vs cTEC1.4C18 por meio de análise de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) antes e após o ensaio de adesão com timócitos;

- Identificar os fatores de transcrição diferencialmente expressos em células mTEC3.10WT vs cTEC1.4C18 antes e após o ensaio de adesão com timócitos.

# DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

## 4. Delineamento Experimental



# MATERIAIS E MÉTODOS

## 5. Material e Métodos

### 5.1. Linhagem celular mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18

As linhagens primárias das células tímicas epiteliais medulares e corticais (mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18), utilizadas neste trabalho, foram cedidas pelo professor Dr. Wilson Savino do Laboratório de Pesquisas sobre Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, RJ. Os dados brutos de sequenciamento das mTECs utilizados foram obtidas do trabalho de mestrado de Cesar Augusto Speck-Hernandez, orientado pelo professor Dr. Geraldo A. Passos.

As células tímicas epiteliais medulares e corticais foram estabelecidas a partir do timo de camundongos C57BL/6 recém-nascidos com fenotipagem para células Epcam+ Ly51- UEA1$^{+}$CD80$^{lo}$MHC-II$^{lo}$ e expressão do gene *Autoimmune regulator* (*Aire*) (Macedo et al., 2009, Pezzi et al., 2016). As mTECs e cTECs são aderentes ao plástico poliestireno, o qual, foram cultivadas em garrafas T25 e/ou T75 (25cm$^{2}$ e 75cm$^{2}$) contendo cerca de entre 5 e 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco – El Paso. TX, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), logo, mantidas em estufa com atmosfera de 5% de $CO^{2}$ à 37ºC.

### 5.2 Processo de timectomia para obtenção de timócitos

Para realização do processo de timectomia para obtenção de timócitos foram utilizados camundongos C57BL/6 de cinco a seis semanas de idade, os quais, sacrificados em câmara de $CO^{2}$ e removidos os timos por cirurgia torácica, logo transferidos para uma placa de Petri com meio de cultura RPMI 1640. As peças foram maceradas manualmente para desintegração do órgão e feito a suspensão celular das células tímicas. Para separação dessas células foi utilizado uma membrana de nylon de porosidade de 10µm para passagem apenas dos timócitos.

Após a separação, os timócitos foram suspendidos por centrifugação por 5 minutos a 1000 x g e lavados com PBS para ressuspensão em meio RPMI. Nessa obtenção, os timócitos foram utilizados para ensaio de adesão com as células mTECs e cTECs. Tendo em vista, já realizado esse procedimento para as células mTECs no trabalho de Cesar Speak-Hernandez foi realizado novamente o mesmo

processo agora para as células cTECs. Este procedimento foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) de número protocolo 006/2016-1 no trabalho supracitado (anexo 1).

### 5.3 Ensaio de adesão de timócitos com as células mTECs e cTECs

Os ensaios de adesão mTECs-timócitos e cTECs-timócitos possuem protocolos pré-estabelecidos baseados em trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (FIOCRUZ, RJ) e adaptados conforme as recomendações do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunogenética Molecular (FMRP/USP).

Os timócitos obtidos dos timos pela timectomia a partir dos camundongos foram colocados em co-cultura com as células mTECs e com as células cTECs numa proporção de 50:1 (timócitos:mTEC, timócitos:cTECs). As co-culturas foram armazenadas na estufa com 37ºC em 5% $CO^2$ durante 12 horas para mTEC-timócitos e 24 horas para cTEC-timócitos. Após o período de adesão, os timócitos que estiveram suspensos e não aderidos foram removidos da cultura com cautela e aspirados do meio de cultura para lavagem com PBS cuidadosamente, aqueles aderidos às mTECs e cTECs foram retirados por lavagem vigorosa com PBS a 4ºC para posterior contagem das células.

A remoção das células tímicas medulares e corticais das garrafas de cultura foi realizado por tratamento de tripsina/EDTA convencional (5mL de solução de tripsina 1x – 2,5g de tripsina suína por litro em HBSS + 0,5 ML de EDTA pH 8.0), logo feito a inativação da tripsina por RPMI com soro fetal bovino e colhidos após centrifugação a 1000 x g por 5 minutos. As contagens das células tímicas foram adquiridas pelo contador de células *Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter* (NEXCELOM BIOSCIENCE, Lawrence, MA, USA) e utilizado o índice de adesão (IA) através da divisão do número de timócitos aderidos por números de células mTEC / cTEC.

### 5.4 Extração de RNA

A extração de RNA total das células mTEC3.10 e cTEC 1.4C18 foi realizada utilizando *kit mirVana miRNA Isolation Kit Ambion* (*Grand Island*, NY, USA) antes e após o ensaio de adesão mTEC-timócitos e cTEC-timócitos.

As células foram removidas das garrafas de cultura por adição de 3mL de solução de tripsina/EDTA por 5 minutos, logo, inativada com meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino. As células foram colhidas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos, onde, aquelas resultantes foram lavadas com PBS estéril duas vezes e posteriormente adicionado 1mL de solução de lise.

Para homogeneização e lise completa, as células foram vigorosamente agitadas por 1 minuto no vórtex e posteriormente adicionado 100µL de *miRNA Homogenate Additive,* sendo misturado pelo vórtex por mais 20 segundos. As misturas de células mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18 permaneceram em banho de gelo por 10 minutos, em seguida, adicionado 1mL de fenol ácido-clorofórmio e agitado no vórtex por 1 minuto. A mistura lisada foi centrifugada em 10.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Na solução, a fase aquosa foi transferida cuidadosamente para outro tubo, e assim adicionado em temperatura ambiente aproximadamente 1,25 vezes do volume da fase aquosa após a centrifugação, o etanol 100%. Em cada tubo foi preparado uma coluna com tubos coletores, onde foi adicionado 700µL da solução e centrifugadas por aproximadamente 15 segundos em 10.000 x g, por fim, descartado novamente a parte líquida e repetido o procedimento para que as misturas estivessem totalmente filtradas.

Em prosseguimento, foram adicionados 700 µL de miRNA Wash Solution 1 na coluna e novamente centrifugado a 10.000 x g, sendo subsequentemente descartado  a parte líquida e adicionado mais 500 µL de *miRNA Wash Solution* 2/3 na coluna e repetidamente centrifugada por 10 segundos a 10.000 x g. Após sucessivas repetições dos processos supramencionados, foi descartado o líquido e centrifugado por 1 minuto para remoção de resíduos advindos do filtro, em suma, finalização a coluna foi colocada em um novo tubo e adicionado 100µL de água MilliQ/DEPC pré-aquecida em 95ºC e recuperado o RNA total das amostras após centrifugação por 30 segundos.

### 5.5 Quantificação, grau de pureza e análise da integridade das amostras de RNA total

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria UV visível, sendo considerado uma unidade de (1U) de absorbância A260 correspondente a 40µg de RNA/mL. Foi considerado e utilizado apenas amostras livres de fenóis e contaminação por proteínas, na razão de A260/230 e A260/280 entre 1.8 e 2.0, respectivamente, através de cálculo de razões de absorbância nos diferentes comprimentos de onda ultravioleta.

A análise da integridade das amostras de RNA total das células mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18 antes e após adesão foram realizadas pelo aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer® Agilent Technologies* por eletroforese microfluídica com RNA 6000 Nano chips. Os reagentes armazenados em 4ºC foram inicialmente mantidos por 30 minutos em temperatura e logo preparado o gel com 550µL do RNA 6000 Nano gel em coluna com filtro e centrifugado em 1.500 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Foi inserido uma alíquota com 65µL em tubo livre de nuclease de 0,5mL, sendo posteriormente adicionado 1µL de RNA 6000 Nano Dye, logo submetido ao vórtex para agitação por 10 segundos e centrifugado em temperatura ambiente a 13.000 x g por 10 minutos.

Para o preparo do RNA 6000 Nano chip foi inserido no *priming station* ajustes de leitura para RNAs, sendo pipetados 9µL de gel/*dye* na região G e com uma seringa acoplada foi distribuído o gel ao longo do chip. Por conseguinte, os 9µL da mistura foram pipetados em demais pontos da região G do chip e adicionado 5µL de RNA *6000 Nano Marker* em cada posição do marcador de cada amostra e 1µL do marcador na região com a indicação. Em diante, foi adicionado amostra de RNA nos poços marcados de 1 a 12 e agitado o chip com vórtex *IKA MS 3* na posição horizontal a 2.200 rpm por aproximadamente 1 minuto, em seguida, foi inserido o chip no aparelho bioanalisador para corrida eletroforética.

As respostas das integridades em eletroferograma e densitometria dos géis das corridas foram obtidas pelo software *Agilent 2100 Expert Software* após 30 minutos de corrida, os quais, as amostras apresentaram picos aos padrões das espécies de RNAr 28S, 18S, 5S e RNAt 4S com RIN (*RNA Integrity Number*) 10.0, sendo consideradas viáveis para utilização em experimentos amostras com notas RIN ≥ 8.0.

## 5.6 Análise do transcriptoma das células mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18 antes e após adesão com timócitos

### 5.6.1 Sequenciamento do RNA e construção da biblioteca

As replicatas biológicas das amostras de RNA total das células mTEC 3.10 e cTEC 1.4C18 antes e após adesão com timócitos foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), sendo parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), para sequenciamento com a plataforma *HiSeq 2500 Illumina*. Foram enviados 2µg de RNA total ao LaCTAD e no laboratório a integridade das amostras passaram por verificação da integridade pelo *Bioanalyser 2100 Technologies (Agilent),* sendo utilizadas as amostras com RIN ≥ 8.0. As amostras enviadas para sequenciamento foram feitas por duplicata, tendo em vista, a disponibilidade encontrada para análise mTEC versus cTEC.

Foi depletado o RNA ribossomal (RNAr) com oligos alvo-específicos biotinilados em combinação com esferas de remoção de RNAr citoplasmático Ribo-zero, onde foi preparado a biblioteca com *TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit* conforme as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas com a plataforma *HiSeq 2500* com tipo *paired-end stranded specific* com fragmentos de 100pb (2 x 100 pb) e com profundidade de 50 milhões de *reads*.

### 5.6.2 Análise bioinformática das sequências de RNA

As sequências de RNA provenientes do RNA-seq foram analisadas conforme o *pipeline* predefinido no Laboratório Imunogenética Molecular. O LaCTAD disponibilizou os dados das sequências de RNA em formato *Fastq* onde foram submetidas a uma primeira avaliação de qualidade do preparo da biblioteca e sequenciamento por meio do programa *FASTQC* (ANDREWS, 2010) (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) para detectar possíveis problemas gerados pelo sequenciador e apresentação de relatórios de controle de qualidade do sequenciador e biblioteca.

A consideração do tamanho das sequências quanto a qualidade de cada base e *read* são representados por valores *Phred*, sendo resultados de boa qualidade

bases ≤ 30 na escala *Phred*. O gráfico representado por cores qualifica a partir da divisão de eixos de ordenadas em sinais de muito boa qualidade (verde), sinais de qualidade razoável (laranja) e sinais de péssima qualidade (vermelho).

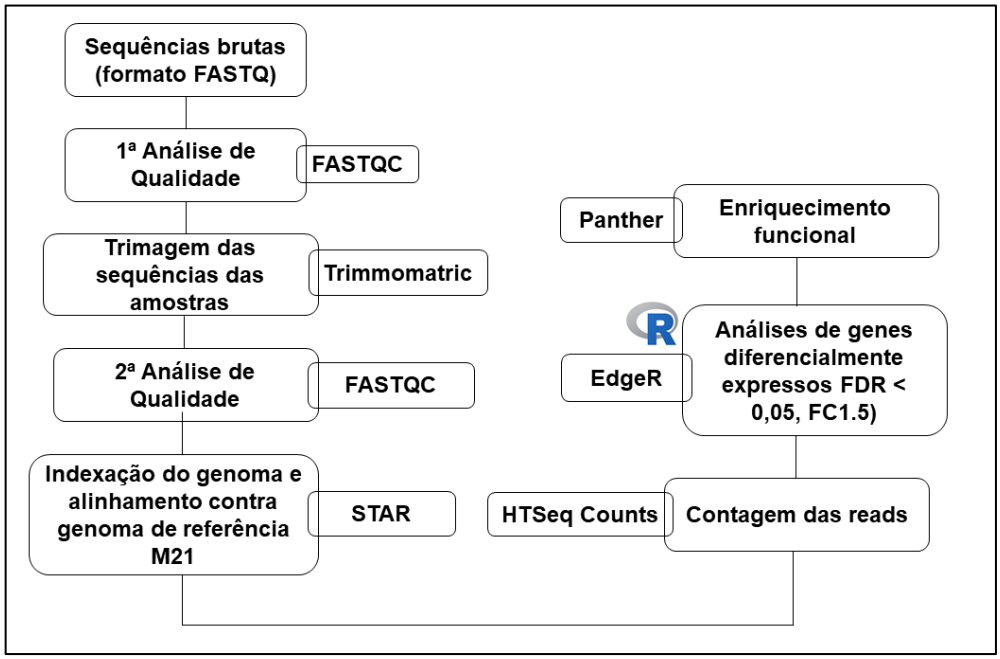



**Figura 11. Pipeline de análises de dados de RNA-Seq por bioinformática utilizadas neste trabalho.** Laboratório de Imunogenética Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Departamento de Genética.

A trimagem foi o conseguinte processo após a primeira análise qualidade das amostras de RNA onde fora utilizado linha de comando *Trimmomatic* versão 0.36 (BOLGER et al., 2014). Este processo foi realizado para remoção dos adaptadores que permaneceram durante o sequenciamento e *reads* com péssima qualidade e curtas (< 36pb) que poderiam causar problemas nas próximas decorrentes análises de dados e níveis de expressão gênica. Após a trimagem, as amostras foram novamente avaliadas quanto a qualidade pelo *FASTQC* visando a garantia e qualidade do processo de trimagem, onde foram verificadas remoções além dos adaptadores e *reads* para montagem contra o genoma.

A formação do índice na indexação do genoma de referência permitiu que o genoma fosse separado em grupos com características similares para aceleramento do mapeamento, devido que, o índice de grandes sequências de DNA permite que *reads* encontrem rapidamente a sequência do genoma a qual faz o alinhamento. A indexação do genoma de referência da espécie *Mus musculus* versão M21 obtida no

*GENCODE* (https://gencodegenes.org/mouse/release_M21.html) foi realizada por meio da linha de comando *STAR Spliced Aligner* 2.5 (https://github.com/alexdobin/STAR) (DOBIN et al., 2013).

As sequências *Fastq* foram alinhadas ao genoma de referência M21 por meio da ferramenta *STAR Spliced Aligner 2.5*, tendo um output de arquivo BAM contendo tanto sequências com suas respectivas coordenadas genômicas quanto arquivos *GTF* (*General Transfer Format*). Posteriormente a montagem do transcriptoma, foi utilizado a ferramenta *HTSeq Counts* (ANDERS; PYL; HUBER, 2014) para contagem das reads que se alinharam ao genoma de referência murinho, contendo assim, as variáveis que possibilitou determinar o número total de reads por transcritos mapeados ao genoma. Logo, foi gerado uma lista total de genes com suas contagens para realização da análise de genes diferencialmente expressos por cada amostra sequenciada.

As análises dos genes diferencialmente expressos foram realizadas pela plataforma R (versão 4.1) (https://www.r-project.org/), utilizamos o pacote *EdgeR* disponível na plataforma de bioinformática *Bioconductor* para normalização e determinação dos genes diferencialmente expressos. O pacote *EdgeR* calcula o *FoldChange* (FC) de cada gene em conta matriz de contraste para uma determinada condição, utilizamos desta forma, aqueles considerados diferencialmente expressos quando FC ≥ 1.5 e valor de $p < 0,05$ com correção *False Discovery Rate (FDR)* de *Benjamin Hochberg*. Além deste ambiente estatístico-matemático, o pacote *EdgeR* permite construção de gráficos com análise de dados no máximo 12 amostras.

Os dados gerados por FC em escala log2, valores de P, valores brutos corrigidos por FDR, além de nomes dos genes, também a localização cromossômica e a posição genômica dos genes diferencialmente expressos. Os genes diferencialmente expressos obtidos foram submetidos a novas análises com agrupamentos hierárquicos e *heatmap* para avaliação do padrão de expressão gênica.

A lista dos mRNAs diferencialmente expressos foi submetida à análise de enriquecimento funcional por meio da ferramenta de anotação *Panther* versão 15.0 (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (http://www.pantherdb.org/), o qual a plataforma permite uma classificação de proteínas e seus respectivos genes com finalidade na facilidade em análises com alto rendimento. A plataforma *Panther*

foi utilizada para identificar a partir da lista de mRNAs, os principais processos envolvidos em funções moleculares, componentes celulares e até mesmo vias que representam os genes diferencialmente expressos codificadores de proteínas para identificação daqueles com potencial papel como fator de transcrição.

# RESULTADOS

## 6. RESULTADOS

Os dados utilizados quanto ao ensaio de adesão com timócitos, extração de RNA e sequenciamento das células mTECs foram obtidos a partir do trabalho de mestrado no Laboratório de Imunogenética Molecular de César Speck-Hernandez para comparação cTECs.

Realizamos um ensaio de adesão conforme detalhado na metodologia, tanto os timócitos quanto as cTECs, provenientes do ensaio de adesão foram quantificadas e calculada a razão entre o número total de timócitos aderidos e o número total das cTECs nas garrafas, que representou o valor da média de timócitos aderidos por cTEC, sendo este o Índice de Adesão conforme mostra a figura 12.

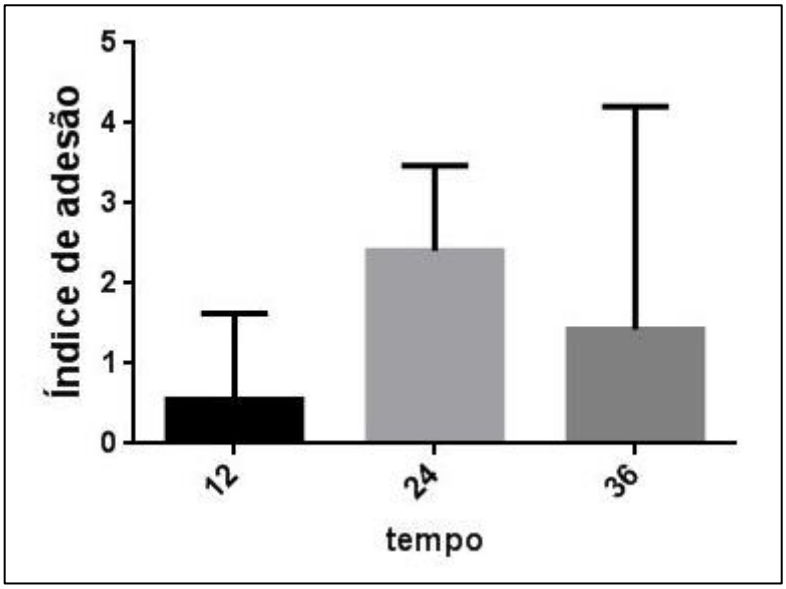
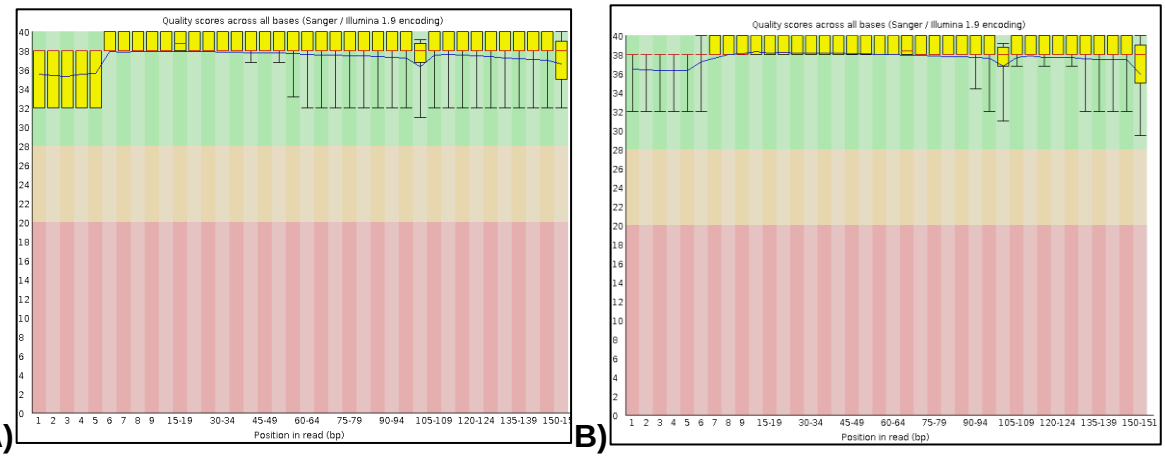



**Figura 12. Gráfico resultante da análise comparativa entre os las das cTECs em condições diferentes de tempo**. Representação do número médio de timócitos aderidos por cTEC. Teste t-Student **p = 0,0019. Os ensaios de adesão foram realizados em duplicatas.

### 6.1 Análise de qualidade, trimagem e montagem do genoma

A primeira análise de qualidade dos pares de bases foi realizada com o programa FASTQC que apresentaram valores de *read* representativos de qualidade. Como demonstrado na figura 13 A e B, a primeira análise de qualidade e qualidade após trimagem respectivamente mostram positivos com valores de *Phred* acima de

30 para as bases das reads, correspondendo assim, 99,9% de probabilidade para as chamadas de bases estarem corretas.




A) B)

**Figura 13. Exemplificação de qualidade das sequências das amostras pelo sequenciamento Illumina**. **A)** cTEC antes da adesão com timócitos sem trimagem; **B)** cTEC após adesão com timócitos com trimagem. Verde: Phred > 30 (boa qualidade); laranja: 20 > Phred < 30 (qualidade razoável); vermelho: Phred < 20 (qualidade ruim). As posições das bases das reds e as notas de qualidade Phred encontram-se no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas respectivamente.

Nossos resultados do controle de qualidade demonstraram que não ocorreram queda de qualidade dos pares de bases, sendo comum a ocorrência da perda no final das sequências em metodologias usadas em sequenciamentos Illumina.

O processo de trimagem das amostras foi realizado para retiradas de adaptadores que são utilizados durante o sequenciamento, o qual, removemos reads menores que 36pb, sendo consideradas reads muito curtas e de baixa qualidade. Após o processo de remoção dos adaptadores das amostras sequenciadas, utilizamos aquelas que tiveram reads sobreviventes maiores que 36pb e boa qualidade de sequenciamento.

Após a segunda análise de qualidade as amostras foram mapeadas contra o genoma de referência murino versão M21 (Ano 2019) (GRCm38.p6), obtendo-se uma média de 89,96% (Tabela 1).

| **Amostra** | **Total de Reads** | **Reads Mapeadas** | **Reads Mapeadas (%)** |
|---|---|---|---|
| **cTEC1_1_SA** | 14988812 | 13713477 | 91,49% |
| **cTEC2_2_SA** | 15763839 | 14579958 | 92,49% |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **cTEC1_1_CA** | 12322778 | 11325390 | 91,91% |
| **cTEC2_2_CA** | 14988812 | 13713477 | 91,49% |
| **mTEC1_SA** | 19537448 | 18058746 | 92,43% |
| **mTEC1_CA** | 20570971 | 17790868 | 86,49% |
| **mTEC2_SA** | 18176342 | 14701594 | 80,88% |
| **mTEC2_CA** | 23314049 | 21565819 | 92,50% |
| | | | **Média** 89,96% |

**Tabela 1.** Total de reads de input e quantidade de reads mapeadas contra o genoma de referência versão M21 (GRCm38.p6) das células mTEC 3.10 WT e cTEC1C18.

Logo após a segunda análise de qualidade feita posteriormente a trimagem as amostras foram mapeadas contra o genoma de referência murinho versão M21 (Ano 2019) (GRCm38.p6). Após o mapeamento nossas amostras foram separadas em grupos compostos por linhagens celulares mTEC versus cTEC antes do ensaio de adesão com timócitos e outro após o ensaio de adesão com timócitos, o qual, obtivemos os genes diferencialmente expressos.

### 6.2 Análise dos genes diferencialmente expressos

O pacote *EdgeR* foi utilizado para análise dos genes diferencialmente expressos nas células mTEC em comparação com as células cTEC antes e após o ensaio de adesão com timócitos, definiu-se como genes diferencialmente expressos aqueles que tivessem *Fold Change* > 2.0 com valor de p ajustado *FDR* ≤ 0,05.

Na análise de expressão diferencial dos genes das células mTECs em comparação com a linhagem de células cTECs antes do ensaio de adesão foram identificados 1173 genes diferencialmente expressos, entre os quais, 661 estavam reprimidos e 513 induzidos, conforme demonstrado no *volcano plot* (Figura 14) e no *heatmap* de agrupamento hierárquico não supervisionado (Figura 15); os mais reprimidos e induzidos estão destacados nas tabelas 2 e 3. Consideramos que os genes diferencialmente expressos são codificadores de proteínas quando comparados as células mTEC versus cTEC.

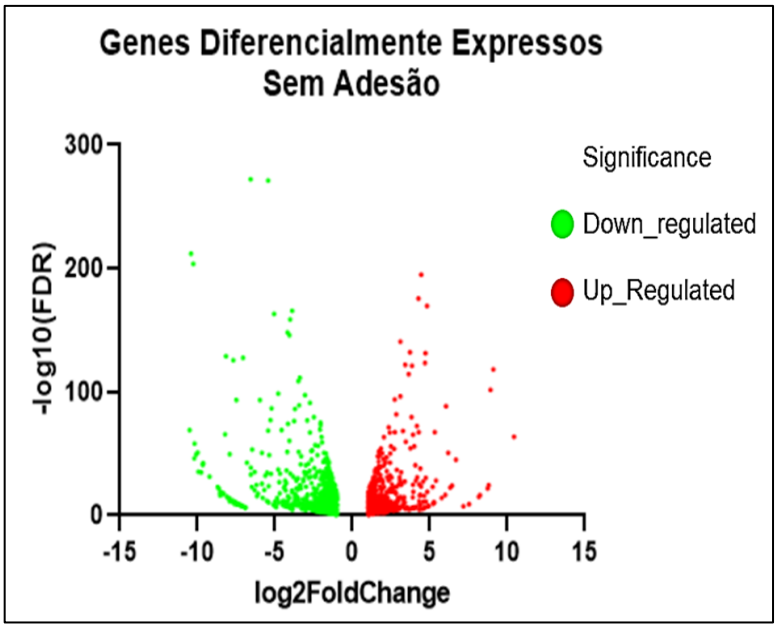



**Figura 14.** *Volcano plot* mostrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos em células mTEC em comparação com células cTEC antes do ensaio de adesão com timócitos (fold change ≥ 2.0, FDR ≤ 0.05), verde: Induzidos (UP_regulated), vermelho: Reprimidos (Down_regulated).

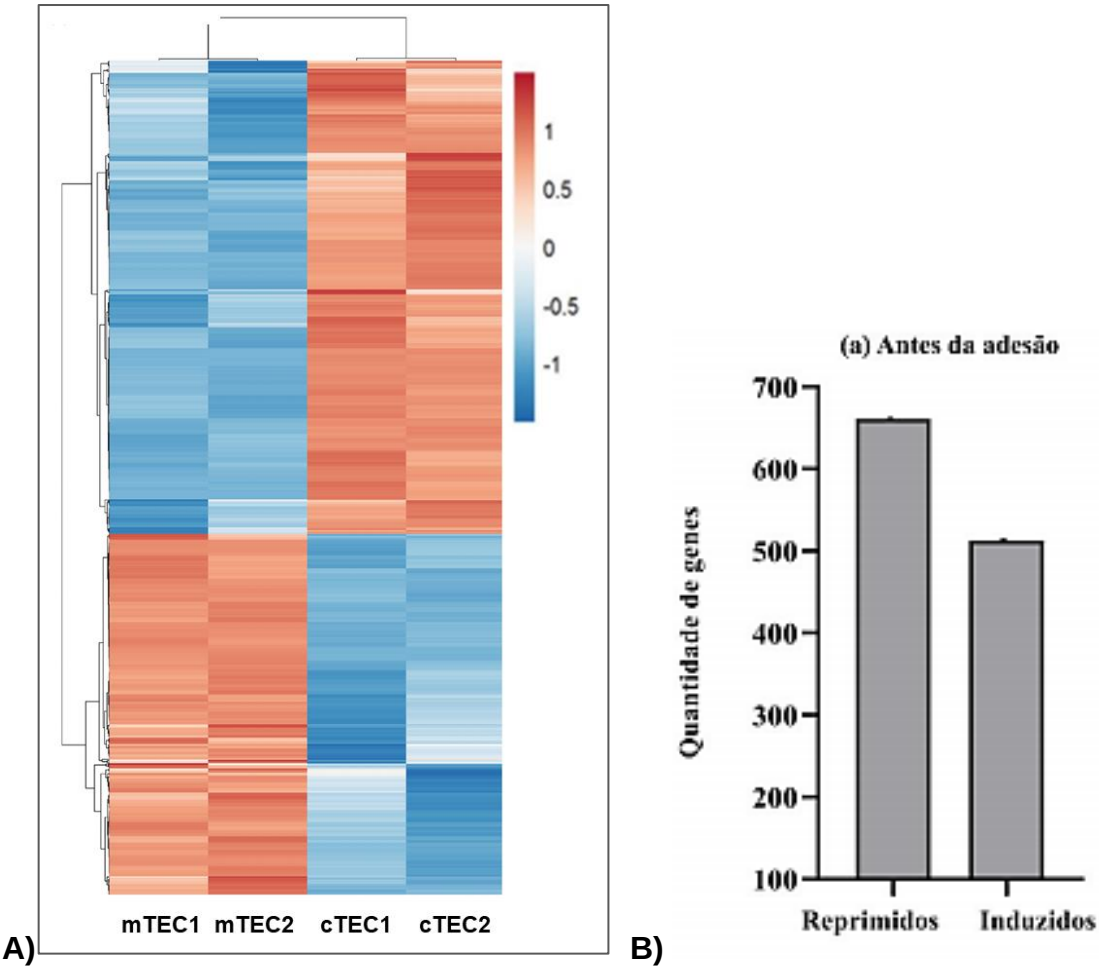


**Figura 15. A)** *Heatmap* do agrupamento hierárquico não supervisionado dos genes diferencialmente expressos em mTECs em comparação com células cTECs antes do ensaio de adesão com timócitos (fold change ≥ 2.0, FDR ≤ 0.05), mTEC1: mTEC3.10 sem adesão amostra 1, mTEC2: mTEC3.10 sem adesão amostra 2, cTEC1: cTEC 1.4C18 amostra 1 sem adesão, cTEC2: cTEC 1.4C18 amostra 2 sem adesão. **B)** Do total de genes diferencialmente expressos (1173), 661 foram reprimidos e 513 induzidos.

**Tabela 2.** Lista dos genes diferencialmente expressos mais induzidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC sem ensaio de adesão com timócitos.

| Gene | Log2FC | FDR |
|---|---|---|
| Dpysl5 | 9,091157 | 4,75E-119 |
| Igfbp7 | 8,913344 | 1,51E-102 |
| Foxa2 | 8,797546 | 2,71E-25 |
| Sytl5 | 8,721618 | 6,31E-23 |
| Mest | 8,165978 | 5,23E-16 |
| Ldhd | 7,529089 | 3,66E-10 |
| Ovgp1 | 7,164187 | 2,95E-08 |
| Poglut1 | 6,681473 | 4,28E-46 |
| Mark1 | 6,417094 | 4,00E-25 |
| Bmpr1b | 6,308716 | 1,05E-23 |
| P3h2 | 6,175675 | 1,04E-51 |
| Gprin3 | 6,03932 | 1,85E-89 |
| Lypd6b | 5,996713 | 1,22E-17 |
| Colca2 | 5,755213 | 3,92E-15 |
| Crlf1 | 5,397995 | 4,21E-29 |
| Tmem266 | 5,307309 | 2,58E-68 |
| Gm3776 | 5,269855 | 2,79E-11 |
| Tifa | 5,242768 | 3,38E-11 |
| Slurp1 | 5,234273 | 7,43E-11 |

| | | |
|---|---|---|
| Npy1r | 5,212533 | 8,08E-11 |
| Ntrk3 | 5,180077 | 3,20E-24 |

**Tabela 3.** Lista dos genes diferencialmente expressos mais reprimidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC sem ensaio de adesão com timócitos.

| **Genes** | **LogFC** | **FDR** |
|---|---|---|
| Tmem47 | -9,9846 | 7,35E-52 |
| Hs6st2 | -9,94911 | 2,30E-36 |
| Defb41 | -9,76211 | 8,91E-36 |
| Galnt12 | -9,65603 | 7,57E-42 |
| Prrg1 | -9,63509 | 9,73E-43 |
| Gspt2 | -9,22119 | 2,16E-32 |
| Ociad2 | -8,6902 | 9,81E-24 |
| Nes | -8,60486 | 1,19E-22 |
| Slc41a2 | -8,54791 | 5,81E-20 |
| Pkd1l1 | -8,54643 | 4,88E-17 |
| Zswim5 | -8,51885 | 1,08E-18 |
| Kctd4 | -8,47269 | 2,01E-19 |
| Orai2 | -8,33054 | 1,45E-18 |
| Anks6 | -8,32114 | 2,22E-18 |
| Bdkrb2 | -8,23224 | 1,08E-66 |
| Gpr141 | -8,16086 | 6,03E-130 |
| Cd55 | -8,08341 | 5,44E-16 |
| Stc2 | -8,02284 | 6,63E-15 |
| Gfra2 | -7,93136 | 1,71E-50 |
| Chn2 | -7,9285 | 2,20E-12 |
| Cntln | -7,69079 | 1,01E-126 |

| | | |
|---|---|---|
| Olfr1349 | -7,66206 | 5,30E-12 |

Na análise da expressão dos genes diferencialmente expressos nas células mTEC em comparação com as linhagens de células cTECs após o ensaio de adesão com timócitos foram identificados 1428 genes diferencialmente expressos, sendo 817 induzidos e 611 reprimidos. Tendo em vista em analisar o padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos assim como no grupo sem adesão com timócitos, foi realizado a construção de um *volcano plot* (figura 16) e um *heatmap* de agrupamento hierárquico não supervisionado (Figura 17), como também, as tabelas 4 e 5 com os genes expressos diferencialmente entre mais induzidos e reprimidos.

Nossos resultados demonstraram que houve um aumento no número de genes diferencialmente expressos durante o processo de adesão com timócitos nas células mTEC *vs* cTEC, apontando que o processo de adesão influencia no padrão de expressão gênica das células epiteliais do timo favorecendo a indução da tolerância imunológica central.

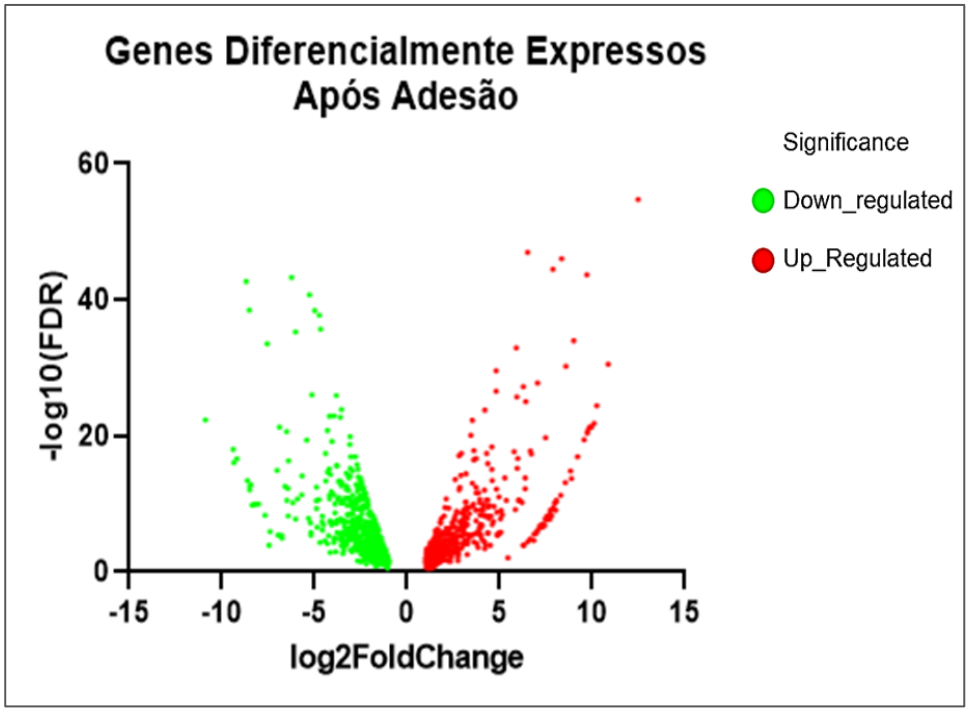



**Figura 16.** *Volcano plot* mostrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos em mTEC em comparação com células cTEC após o ensaio de adesão com timócitos (*fold change* ≥ 2.0, *FDR* ≤ 0.05), verde: induzidos (*UP_regulated*), vermelho: Reprimidos (*Down_regulated*).

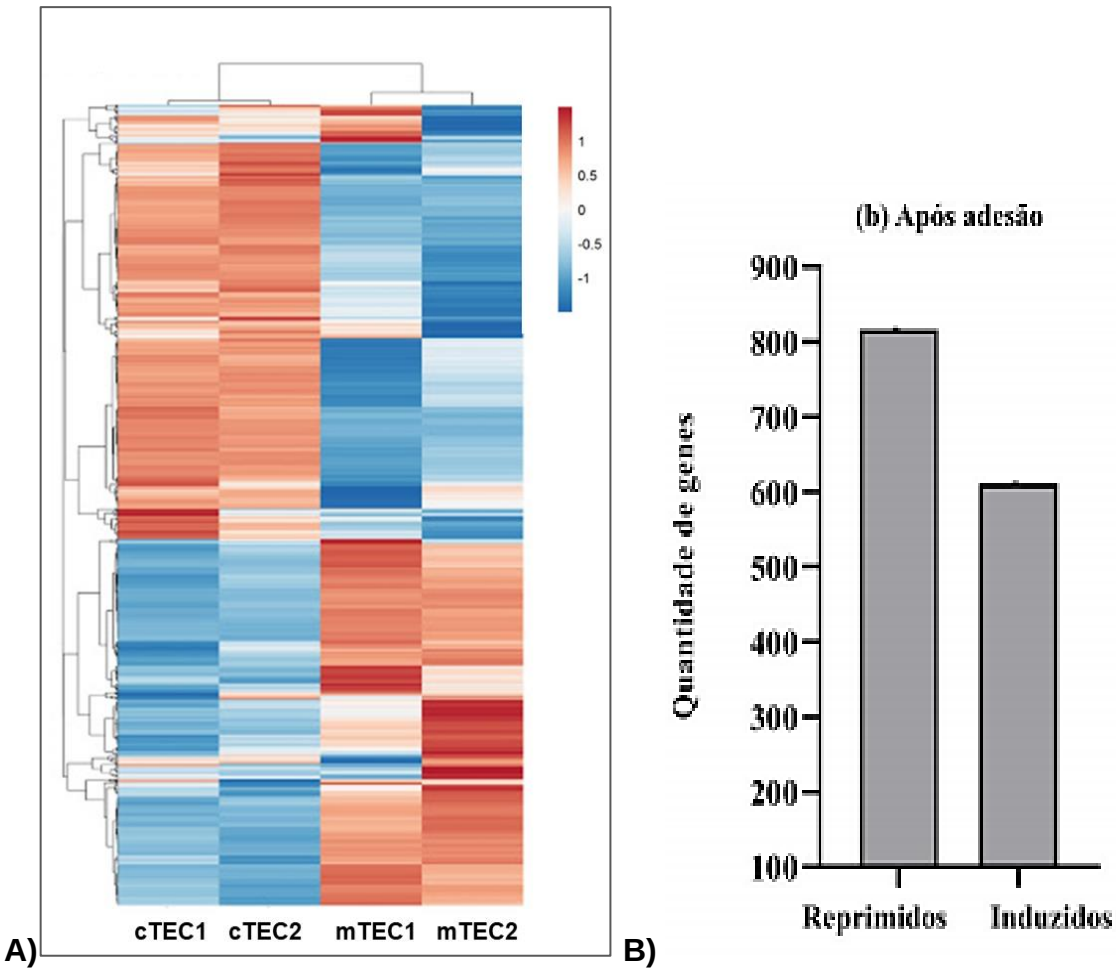



**Figura 17.** *Heatmap* do agrupamento hierárquico não supervisionado dos genes diferencialmente expressos em mTEC3.10 em comparação com células cTEC1.4C18 após ensaio de adesão com timócitos (*fold change* ≥ 2.0, *FDR* ≤ 0.05), mTEC1: mTEC3.10 após adesão amostra 1, mTEC2: mTEC3.10 após adesão amostra 2, cTEC1: cTEC 1.4C18 amostra 1 após adesão, cTEC2: cTEC 1.4C18 amostra 2 após adesão. B) 1428 genes diferencialmente expressos, 817 foram induzidos e 611 foram reprimidos.

**Tabela 4.** Lista dos genes diferencialmente expressos mais induzidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC após ensaio de adesão com timócitos.

| **Genes** | **Log2FC** | **FDR** |
|---|---|---|
| Ppp2r2c | 12,48028 | 54,77481 |
| Wincr1 | 10,85847 | 30,57206 |
| Pak6 | 10,2388 | 24,47467 |
| Bdkrb2 | 10,09167 | 21,85722 |

| | | |
|---|---|---|
| Add2 | 9,955824 | 21,30986 |
| Hs6st2 | 9,866136 | 21,32004 |
| Tmem47 | 9,758663 | 20,82013 |
| Defb41 | 9,733172 | 20,47306 |
| Gpr141 | 9,702316 | 43,71369 |
| Rny3 | 9,559077 | 19,47212 |
| Kctd17 | 9,209974 | 16,98904 |
| Rny1 | 8,991769 | 34,04412 |
| Gspt2 | 8,874197 | 13,77971 |
| Trdv4 | 8,831731 | 14,88557 |
| AA467197 | 8,58294 | 30,25572 |
| Slc41a2 | 8,536259 | 13,1702 |
| Ak4 | 8,346905 | 46,0763 |
| Agbl2 | 8,297054 | 11,34763 |
| n-R5-8s1 | 8,063007 | 10,44069 |
| Zswim5 | 8,060035 | 10,59075 |
| Stc2 | 8,031856 | 9,135075 |
| Anks6 | 8,023401 | 10,33032 |

**Tabela 5.** Lista dos genes diferencialmente expressos mais reprimidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC após ensaio de adesão com timócitos

| **Genes** | **logFC** | **FDR** |
|---|---|---|
| Hoxa9 | -10,8995 | 22,38971 |
| Foxa2 | -9,38466 | 18,08391 |
| Ptgs2os2 | -9,35863 | 16,14796 |
| Mark1 | -9,19714 | 16,67473 |
| Igfbp7 | -8,69605 | 42,70701 |
| Gm32554 | -8,63307 | 13,45206 |

| | | |
|---|---|---|
| Dpysl5 | -8,51989 | 38,54089 |
| Sytl5 | -8,50171 | 12,10007 |
| Acsl6 | -8,48653 | 12,63851 |
| Kazn | -8,44451 | 12,87844 |
| Tcf7l1 | -8,37717 | 9,895206 |
| Slc22a17 | -8,2224 | 9,969434 |
| Serpinb10 | -8,02662 | 10,02787 |
| Tprg | -7,67012 | 8,390693 |
| Gprin3 | -7,55926 | 33,58971 |
| Gm11407 | -7,45798 | 3,973382 |
| Gm12609 | -7,41048 | 5,96269 |
| Krt13 | -7,01995 | 14,96966 |
| Slc22a17 | -6,9728 | 5,468768 |
| P3h2 | -6,89175 | 21,30986 |
| Gm3776 | -6,77895 | 5,401853 |
| Eid2 | -6,75271 | 5,048531 |

### 6.3 Identificação de fatores de transcrição

Os genes diferencialmente expressos antes e depois do ensaio de adesão com timócitos foram classificados de acordo com a divisão do sistema *Panther* (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*), sendo separados em categorias descritas na figura 18. Em ambos os grupos, os genes diferencialmente expressos foram identificados em diversas classificações, entre eles, os fatores de transcrição.

Na classificação como potenciais fatores de transcrição identificamos no grupo mTEC *vs* cTEC antes da adesão com timócitos cerca de 10,9% do total de genes diferencialmente expressos, correspondendo 73 genes dos 1173 identificados. Após o ensaio de adesão esse número reduziu para 7,1% do total de genes diferencialmente expressos, correspondido por 55 genes dos 1428 encontrados.

Demonstramos que pelo enriquecimento funcional que o grupo de mTEC vs cTEC com maior proporção de genes como potenciais fatores de transcrição foi antes do ensaio de adesão com timócitos, podemos observar que o processo de adesão apresenta certa variabilidade entre os processos dos dois grupos (antes e após o contato com timócitos).

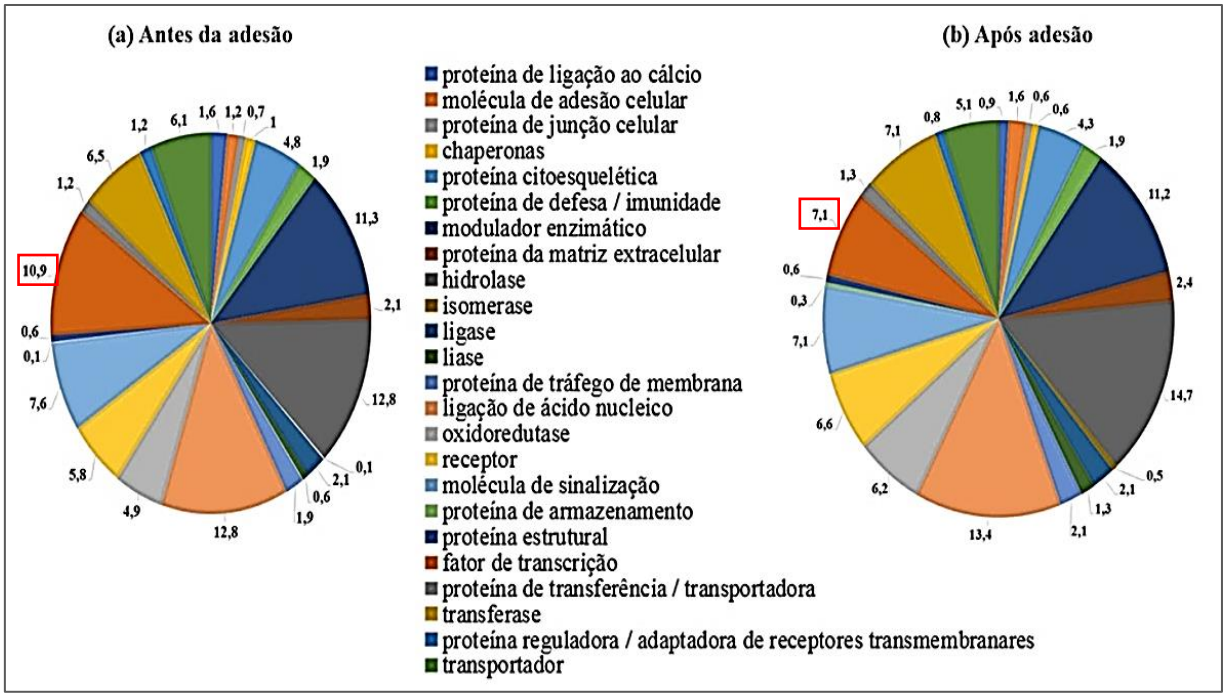



**Figura 18.** Proporção dos tipos de genes diferencialmente expressos encontrados e fatores de transcrição nas células mTEC vs cTEC antes e depois do ensaio de adesão com timócitos. A distribuição foi feita pelo sistema de classificação *PANTHER* versão 15.0.

Na figura 19 mostramos que os fatores de transcrição diferencialmente expressos em mTEC versus cTEC antes do ensaio de adesão que 42 genes foram induzidos e 31 genes reprimidos, após o processo de adesão, houve um aumento no número de genes induzidos para 41 e uma redução no número de genes reprimidos para 31. Na identificação dos fatores de transcrição pelo enriquecimento funcional, realizamos a construção de um *heatmap* de agrupamento hierárquico não supervisionado desses genes diferencialmente expressos demonstrado na figura 20.

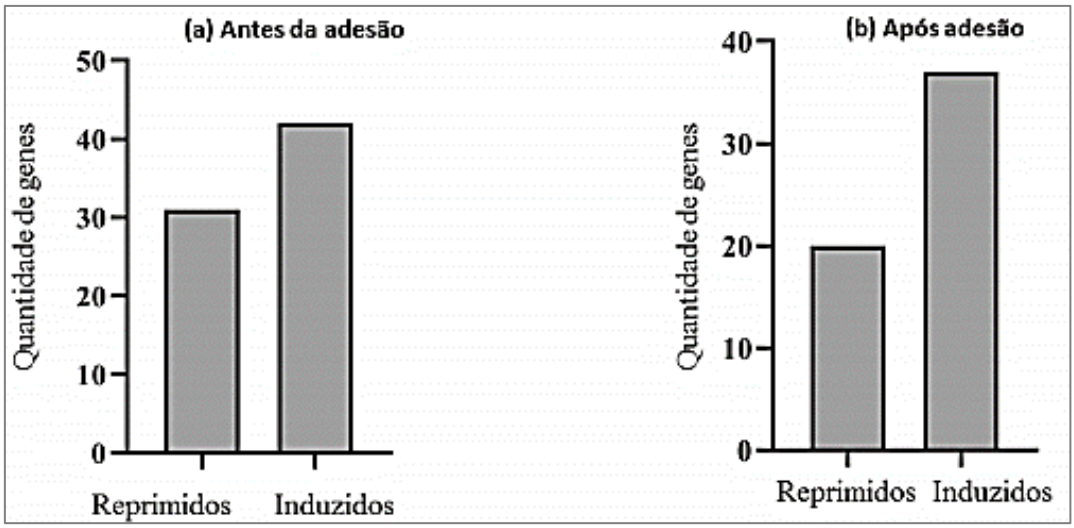



**Figura 19.** Demonstração da proporção de quantidade de genes induzidos e reprimidos dos genes diferencialmente expressos classificados como fatores de transcrição pelo enriquecimento funcional tanto (a) antes do ensaio de adesão com timócitos, sendo, 30 reprimidos e 41 induzidos e (b) após o ensaio de adesão com timócitos, sendo, 20 reprimidos e 38 induzidos.

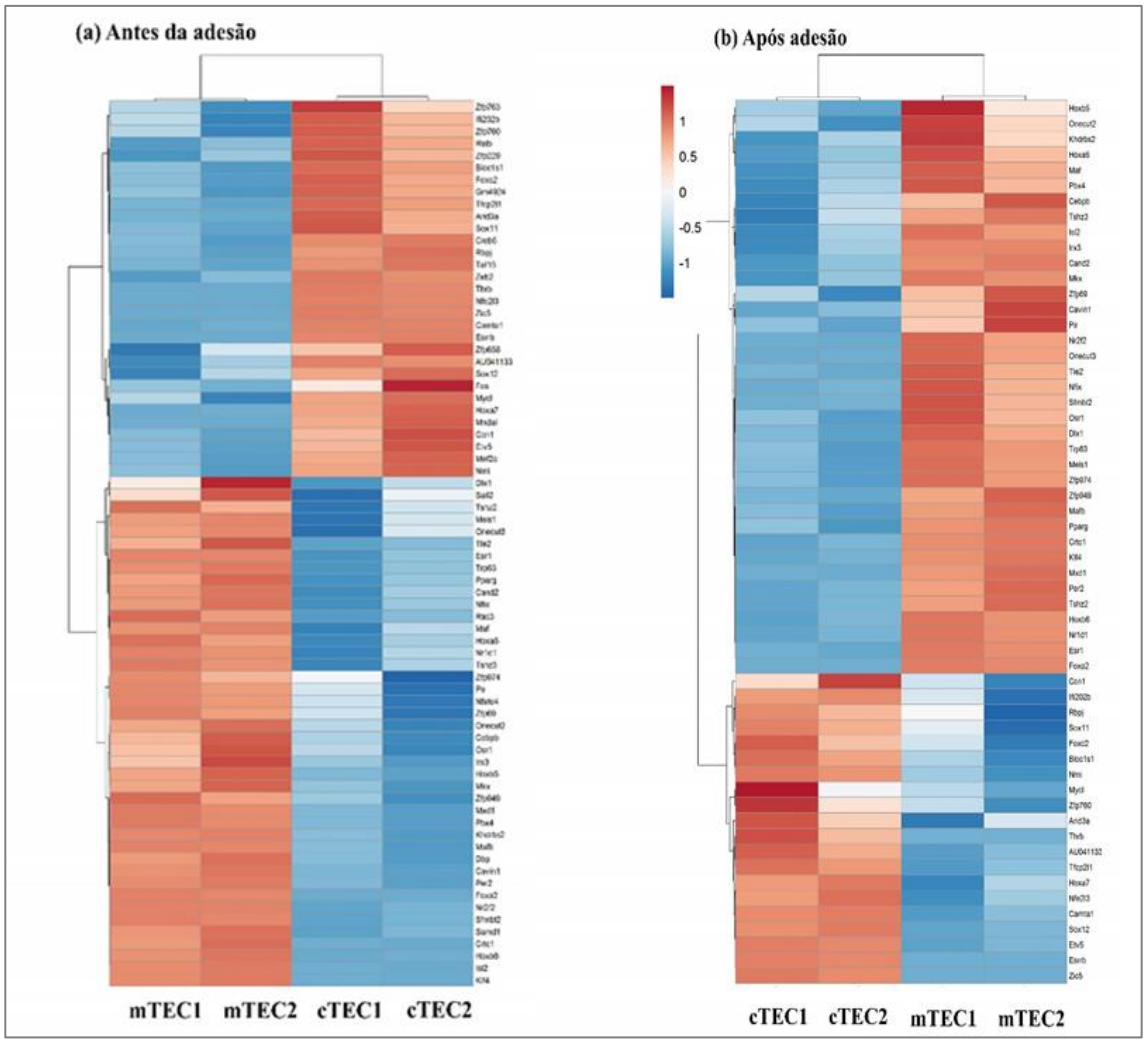



**Figura 20.** Heatmap de agrupamento hierárquico não supervisionado dos genes diferencialmente expressos classificados pelo enriquecimento funcional como fatores de transcrição (fold change ≥ 2.0, FDR ≤ 0.05).

Dos 73 genes classificados como fatores de transcrição das células mTEC vs cTECs antes do ensaio de adesão com timócitos obtivemos genes induzidos quanto ao nível de expressão pelo *logFC.* Os genes mais destacados como demonstrados na tabela são *Esrrb, Zic5, Thrb, Sox12 (*Tabela 6).

| **Genes** | **LogFC** | **FDR** |
|---|---|---|
| Zic5 | 7.62655370369379 | 7.4755477611073e-12 |
| Esrrb | 7.55654060174729 | 2.24714851721473e-11 |

| | | |
|---|---|---|
| Thrb | 7.20281912917207 | 3.63697826854024e-09 |
| Sox12 | 3.51030168800443 | 8.1654296741036e-09 |

**Tabela 6.** Ranking dos genes diferencialmente expressos mais induzidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC antes ensaio de adesão com timócitos. Os 5 genes diferencialmente expressos destacados pelo valor de expressão foram os mais induzidos dentre os classificados como fator de transcrição.

Dos 55 genes classificados como fatores de transcrição das células mTEC vs cTECs depois do ensaio de adesão com timócitos obtivemos genes mais reprimidos quanto ao nível de expressão pelo logFC. Os genes que mais destacaram nesse grupo foram *Hoxa9, Foxa2 e Ptgsos2, Mark1 e Igfbp7* (Tabela 7).

**Tabela 7.** Ranking dos genes diferencialmente expressos mais reprimidos nas células mTEC em comparação com a linhagem de células cTEC após ensaio de adesão com timócitos. Os 5 genes diferencialmente expressos pelo valor de expressão foram os mais reprimidos dentre os caracterizados como fatores de transcrição.

| **Genes** | **logFC** | **FDR** |
|---|---|---|
| Hoxa9 | -10,8995 | 22,38971 |
| Foxa2 | -9,38466 | 18,08391 |
| Ptgs2os2 | -9,35863 | 16,14796 |
| Mark1 | -9,19714 | 16,67473 |
| Igfbp7 | -8,69605 | 42,70701 |

# DISCUSSÃO

## 7. Discussão

A tolerância imunológica é caracterizada como a não responsividade a um antígeno, induzida pela exposição previa a este. Este reconhecimento entre o próprio e o não próprio é uma das funções primordiais do sistema imunológico, os quais, se destacam as células mTECs e cTECs na seleção positive e negative de Linfócitos T que expressam TRAs aos timócitos, tendo assim, uma expressão gênica promíscua (PASSOS et. Al., 2019)

Tendo em vista que as cTECs e mTECs atuam na tolerância imunológica central no timo, elas são classificadas de acordo com sua localização na estrutura do timo e sua função. A principal função das cTECs estão no suporte a proliferação, diferenciação e seleção positiva dos linfócitos T restritos ao MHC, e as mTECs que participam no papel crítico na prevenção dos aparecimentos de doenças autoimunes por meio da apresentação de antígenos restritos aos tecidos (TRAs) aos timócitos que estão em desenvolvimento (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004).

Uma atividade muito frequente ocorrente no timo é o "*crosstalk tímico*" que tende a realizar à expansão e organização da medula do timo, tendo grande participação de timócitos em desenvolvimento. As mTECs possuem uma população bem diversificada, que apresentam assim, subjuntos de populações podendo ser identificadas por marcadores de expressão MHCII e CD80, além do fator de transcrição AIRE, isso, favorece que as mTECs possam expressarem diversos genes codificadores de moléculas de adesão (claudinas, selectinas, etc) para garantir a adesão mTEC-timócitos/cTEC-timócitos (LOPES et al. 2015).

O grupo de Imunogenética molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto avaliaram a atuação do *Aire* no controle da expressão de genes de adesão que por sinal evidenciaram que o silenciamento de *Aire* pode atrapalhar a interação das células tímicas epiteliais aos timócitos, sendo essa etapa muito importante para o estabelecimento da tolerância imunológica central, onde seu comprometimento desenvolve doenças autoimunes (PEZZI et al., 2016; SPECK-HERNANDEZ et al., 2018).

A função mais conhecida das mTECs por sua vez está na atuação do Aire no controle da expressão de RNAs não codificadores de proteínas, *micro*RNAs e fatores de transcrições chaves para homeostase do sistema imunológico como o controle da tolerância de Células B, expressão de genes que influenciam o

recrutamento de células por indução da expressão de quimiocinas e a própria adesão que é crucial para apresentação de antígenos (LAAN & PETTERSON, 2013).

Tendo em vista que o *Aire* é considerado o principal gene envolvido na modulação da expressão gênica e expressão de TRAs existem outros genes tão importantes quanto, com ou sem ausência de Aire (TAKABA et al., 2015).

Por meio de análises complexas na ômica transcriptômica, Takaba e seus colaboradores compararam a expressão diferencial entre mTECs e cTECs que identificaram um outro regulador transcricional que atua também na indução da expressão de autoantígenos em mTECs, sendo ele, o *Fezf2*, que até então estava conhecidamente ligado ao sistema nervoso central na diferenciação de neurônios motores (SHIN et. al., 2011; TAKABA et. al., 2015).

*Aire* e *Fezf2* funcionam em sinergia, pois, enquanto a proteina *Aire* está associada a várias proteinas parceiras e atua na etapa alongamento da transcrição, a proteína *Fezf2* atua como um fator de transcrição clássico, ou seja, liga-se diretamente ao DNA (TAKABA et al. 2015; KLEIN 2015). Os TRAs expressos em mTECs modulados por Fezf2 e Aire correspondem concomitantemente a cerca de 12,3% do total de TRAs expressos nessa célula, enquanto a regulação de *Aire* corresponde a cerca de 28,9% da expressão de TRAs nas mTECs, o *Fezf2* abrange quase 22% desta modulação e outros 40% do total de TRAs expressos em mTECs que são regulados por fatores ainda desconhecidos (TAKABA et. al., 2015).

Nessa lacuna, surgiu a hipótese de que além de *Aire* e *Fezf2* existem genes específicos da célula mTEC quando comparada à cTEC que ainda não foram identificados e que possam atuar como fatores de transcrição chave na adesão de células tímicas epiteliais medulares aos timócitos e no controle da expressão de TRAs.

Para elucidarmos que possa ser específico de mTECs, inseridos o processo de adesão devido sua importância na apresentação de antígenos restritos aos tecidos e as células cTECs devido sua função no processo de seleção no timo. Essas células passaram por processos de adesão e foram analisadas tanto antes quanto após o processo e assim tiveram seus RNAs sequenciados por meio da tecnologia de sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-Seq) e ferramentas

de bioinformática. Essa técnica é extremamente indicada para quantificação dos níveis de expressão e sensível ao identificar e quantificar transcritos.

Essa presente dissertação buscou identificar apenas genes diferencialmente expressos classificados como fatores de transcrição que foram submetidas ao ensaio de adesão mTEC-timócitos durante 12 horas e cTEC-timócitos durante 24 horas, em sua potencialidade máxima de adesão com timócitos. A análise antes da adesão indicou 73 fatores de transcrição diferencialmente expressos, sendo 42 induzidos e 31 reprimidos. Após adesão houve uma redução no número de fatores de transcrição com expressão diferencial, com 55 no total, 37 induzidos e 20 reprimidos.

A redução da expressão dos fatores de transcrição após adesão reforça que as células tímicas epiteliais medulares são especializadas na expressão de TRAs e moléculas de adesão, uma vez, que o Aire gera uma remodulação do perfil transcricional para o *crosstalk* tímico.

Ao analisarmos o enriquecimento funcional realizado, a Plataforma Panther indicou a participação de fatores de transcrição diferencialmente expressos em mTECs antes da adesão com timócitos: *Hoxa7, Sox12, Thrb, Esrrb e Zic5*. Dentre esses, somente o *Hoxa7* foi descrito na literatura ao context tímico, onde utilizaram camundongo transgênico NHD13 num modelo de estudo da syndrome mieloplásica, o qual, revelaram que o timo desse animal foi reduzido e aumento da expressão de genes do cluster *Hoxa* (Hox9, Hox10), tendo assim redução da população de timócitos que acarreta na apresentação de TRAs no momento da adesão com as células tímicas epiteliais que corrobora com nossos resultados ao apresentar-se reprimido. Choi e colaboradores demonstraram que a expressão de *Hoxa7* está relacionada com a maturação de timócitos no timo, processo crucial para que os antígenos não possam exibidos no timo pela ausência de *Aire* funcional e que as células T específicas para os antígenos restritos ao tecidos escampem da deleção, maturam e entrem na periferia para atacarem tecidos alvos.

Para o fator de transcrição *Sox12*, Tanaka e seus colaboradores em 2018 demonstraram que sua não participação no desenvolvimento de células Tregs no timo estão envolvidas no desenvolvimento de células pré-tregs sob condições inflamatórias em colites. Esse fator de transcrição foi evidenciado como papel de induzir a expressão de Foxp3 em células T CD4+, sendo importante em repostas

nos processos inflamatórias excessivas, como um mecanismo adjacente à diferenciação das células pré-Tregs em condições, permitindo ser alvo terapêutico para prevenção de doenças autoimunes, como as doenças inflamatórias intestinais.

Outro resultado interessante deste trabalho demonstrado por Zhao e colaboradores é a correlação do *Zic5* como valor prognóstico em cânceres de colón pelo seu alto nível de transcrição *ZIC5*, tendo assim nos pacientes, uma melhor sobrevida Segundo análise de Kaplan-Meier. Este achado na literatura corrobora em suas características como fator de transcrição crucial no processo da homeostasia, onde a depleção deste fator de transcrição torna as células mais resistentes a apoptose por indução de baixa glicose e atuação como repressor transcricional para genes associados a glicólise.

Outro estudo evidencia *Esrrb* como fator de transcrição na regulação do desenvolvimento de células germinativas primordiais. O fator de transcrição *Esrrb* desempenha funções importantes na pluripotência, atuando nos estágios iniciais em camundongos, interferindo diretamente na autorrenovação em células troncos derivadas de embriões. Além do papel na condução da pluripotência, a capacidade de reprogramação de *Esrrb* se estende também para células somáticas, sendo, um reprogramador de identificação de genes que substituem *Klf4* em coquetéis convencionais constituídos por *Oct4, Sox2, Klf4 e cMyc* (OSKM).

Uma boa parte dos resultados deste trabalho apontam esses fatores de transcrições em correlações com cânceres e nenhum estudo têm sido associados diretamente com doenças autoimunes. Entretanto, notamos que ao compararmos mTECs com cTECs vimos uma redução no número de fatores de transcrição diferencialmente expressos mesmo não tendo associações em complexos transcricionais envolvendo *Aire* e *Fezf2*. Contudo, é necessário investigar mais interações entre os genes diferencialmente expressos e suas classificações para melhor filtragem de dados para fatores de transcrições preditos.

Em suma encontramos e identificamos alguns fatores transcricionais em baixos achados, demonstrando a participação principal de *Aire* e *Fezf2* como os mais cruciais para regulação do sistema imunológico e patologias autoimunes, estes mesmos ressalta-se a necessidade de validação para resultar em novos achados importantes para descobertas de novos fatores de transcrição.

# Considerações Finais

## 8. Considerações Finais

Foi possível identificar fatores de transcrições nos processos tanto antes quanto após a adesão das células tímicas aos timócitos. A partir desses dados de predição obtidos neste trabalho, infere-se que:

- *Aire* e *Fezf2* ainda atuam como fatores de transcrição chaves em mTECs;

- Adesão celular entre mTEC-timócito e cTEC-timócito promove uma remodulação do perfil transcricional quando reduz o número de fatores de transcrição diferencialmente expressos;

- Os fatores de transcrição encontrados são apenas predições que necessitam de melhores análises e validações.

# Referências Bibliográficas

## 9. Referências Bibliográficas


ABRAMSON, J.; GIRAUD, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Aire's Partners in the Molecular Control of Immunological Tolerance. **Cell,** v. 140, n. 1, p. 123–135, 2010.

ANDERSON, G., LANE, P. J. L., JENKINSON, E. J. Generating intrathymic microenmviroments to estabilish T-cell tolerance; **Nature Reviews Immunology**, v. 7; n. 12, p. 954-963, 2007.

BLACKBURN, C.C., MANLEY, N. R. Developing a new 68aradigma for thymus organogenesis. **Nat Ver Immunol**. v4, p. 278–289, 2004.

BOEHM, T. Thymus development and function; **Current Opinion in Immunology**; v. 20, p. 178-184; 2008.

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

CIOFANI, M. & ZUNIGA-PFLUCKER, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. (2007). **Annu Rev Cell Dev Biol**, 23, 463-493.

DAVID ROULOIS, MARC GRÉGOIRE, AND JEAN-FRANÇOIS FONTENEAU; MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge; **Hidawi Publishing Corporation**; v. 2013, p. 1-10; 2012.

DERBINSKI, J., GA¨ BLER, J., BRORS, B., TIERLING, S., JONNAKUTY, S., HERGENHAHN, M., PELTONEN, L., WALTER, J., AND KYEWSKI, B. gene expression. in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. **J. Exp. Med.** v. 202, p. 33–45, 2005.

FLAJNIJ, M. F.; PASQUIER, L.; Evolution of innate and adaptative immunity: can we draw a line?; **Trends in Immunology**; v. 25, p. 640-644; 2004.

FATOUROU, E.M., AND KOSKINAS, J.S. Adaptive immunity in hepatocelular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. **Expert Rev. Anticancer Ther**. V. 9, p. 1499–1510, 2009.

GIRAUD, M. & PETERSON, P. The Autoimmune Regulator (AIRE) Gene, the Master Activator of Self-Antigen Expression in the Thymus.In: PASSOS, G. A. (Ed.). **Thymus**
**Transcriptome and Cell Biology. Suiça: Springer Nature**, 2019. Cap. 7, p. 169-190.

GUI, J., MUSTACHIO, L. M. M., DONG-MING S., et. al. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma; **Aging and Disease**; v. 3; n. 3; p. 280-290; 2012.

HAN, W., KWAN, K.Y., SHIM, S., LAM, M.M., SHIN, Y., XU, X., ZHU, Y., LI, M., AND SESTAN, N. TBR1 directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 3041–3046, 2011.

HOGQUIST, K. A. BALDWIN, T. A., JAMENSON, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. **Nature Reviews Immunology**. v. 5, p. 772-782, 2005.

HUSEBYE, E. S.; PERHEENTUPA, J.; RAUTEMAA, R.; KÄMPE, O. Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, n. 5, p. 514–529, 2009.

Immunology – Immune System, Disponível em : < http://immunesystemimmunity.blogspot.com/2011/11/thymus.html > Acesso em Maio de 2020.

KLEIN, L., KYEWSKI, B., ALLEN, P.M., AND HOGQUIST, K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don’t see). **Nat. Rev. Immunol**. V. 14, p. 377–391, 2014.

KLEIN L, KYEWSKI B, ALLEN, P. M, HOGQUIST, K., A.; Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nature Reviews Immunology**; v. 14(6), p. 377-391; 2014.

KLEIN F, MITROVIC M, ROUX J, et al. The transcription factor Duxbl mediates elimination of pre-T cells that fail β-selection. ***J Exp Med***; v. 216, p. 638-655, 2019.

KYWESKI, B., KLEIN, L.. A central role for central tolerance. **Annual Review of Immunology**. V. 24, p. 571-606, 2006.

LAAN, M., PETERSON, P. The manis faces of aire in central tolerance. Front. Immunology. V. 11, p. 4, 2013.

LI MO, FLAVELL RA. TGF-β: a master of all T cell trades. **Cell**. 134:392-404, 2008.

LIND E. F., PROCKOP, S. E., PORRIT, H. E. & PETRIE, H. T.; Mapping precursor movement trough the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development; **Journal Experimental of Medicine**; v. 194, p. 127-134; 2001.

LODATO, S., MOLYNEAUX, B.J., ZUCCARO, E., GOFF, L.A., CHEN, H.H., YUAN, W., MELESKI, A., TAKAHASHI, E., MAHONY, S., RINN, J.L., ET AL. Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. **Nat. Neurosci**. V. 17, p. 1046–1054, 2014.

LYNCH HE, GOLDBERG GL, CHIDGEY A, VAN-DEN-BRINK MRM, BOYD R & SEMPOWSKI GD. Thymic involution and immune reconstitution. **Trends Immunol**, v. 30, p. 366-373, 2009.

LINHARES-LACERDA, L.; RIBEIRO-ALVES, M.; NOGUEIRA, A. C.; MENDES-DACRUZ, D. A.; MAGALHÃES, D. A.; DARDENNE, N.; PASSOS, G. A.; SAVINO, W. RNA interferencemediated knockdown of CD49e (α5 integrin chain) in human thymic epitelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion; **BMC Genomics**; v.22:11, 2010.

MATHIS, D., BENOIST, C. A decade of AIRE. **Nat. Rev. Immunology**. V. 7 (8), p. 645-650, 2007.

MACEDO, C.; EVANGELISTA, A. F.; MARQUES, M. M.; OCTACÍLIO-SILVA, S.; DONADI, E. A.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; PASSOS, G. A. Autoimmune regulator (Aire) controls the expression of microRNAs in medullary thymic epithelial cells. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 554–560, 2013.

MASCARENHAS, R. S.; PASSOS, G. A. S. J. **Análise da expressão e caracterização funcional in silico de lncRNAs em células epiteliais tímicas medulares nocauteadas no gene Aire**. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.17.2019.tde-27052020-081507>

MÖROY, T. & KARSUNKY, H.; Regulation of pre-T-cell development. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57; p. 957–975; 2000

MEDZHITOV R., JANEWAY, C. J. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**; v. 343; p. 338-44; 2000.

NAGAMINE, K.; PETERSON, P.; SCOTT, H. S.; et al. Positional cloning of the APECED gene. **Nature Genetics**, v. 17, n. 4, p. 393–398, 1997.

NISHINO M, ASHIKU SK, KOCHER ON, THURER RL, BOISELLE MP & HATABU H. **The Thymus: a comprehensive review**.. RadioGraphics, v. 26, p. 335-348; 2006.

NOWELL CS, FARLEY AM, BLACKBURN CC. Thymus organogenesis and development of the thymic stroma**. Methods Mol Biol**. v. 380, p.125–162, 2007.

OLIVEIRA, E. H., MACEDO, C., COLLARES, C. V., FREITAS, A. C., DONATE, P. B., SAKAMOTO-HOJO, E. T., PASSOS, G. A. Aire Downregulation Is Associated with Changes in the Posttranscriptional Control of Peripheral Tissue Antigens in Medullary Thymic Epithelial Cells**. Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 526. 2016.

PASSOS, G. A.; SPECK-HERNANDEZ, C. A.; ASSIS, A. F.; MENDES-DA-CRUZ, D. A. Update on Aire and thymic negative selection. **Immunology**, p. 10–20, 2018.

PETRIE HT & ZUNIGA-PFLUCKER JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus; **Annual Reviews of Immunology**; v. 25, p. 649-679; 2007.

PETERSON, P.; PITKÄNEN, J.; SILLANPÄÄ, N.; et al. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED): A model disease to
study molecular aspects of endocrine autoimmunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 135, n. 3, p. 348–357, 2004.

PEZZI, N.; ASSIS, A. F.; COTRIM-SOUSA, L. C.; LOPES, G. S.; MOSELLA, M. S.; LIMA, D. S.; BOMBONATO-PRADO, K. F.; PASSOS, G. A. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction. Molecular Immunology, v. 77, p. 157–173, 2016.

PEZZANO M, SAMMS M, MARTINEZ M & GUYDEN J. Questionable Thymic Nurse Cell. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 65, p. 390–403, 2001.

RUEHL-FEHLERT, C., KITTEL, B., MORAWIETZ, G., et. al., Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – part 1. **Experimental and Toxicology Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie**, v. 55(2-3), p. 91-106; 2003.

SAVINO, W., MENDES-DA-CRUZ, D. A. GOLBERT, D. C., RIEDERER, I., et. al.; Laminin-Mediated interactions in thymocytes migration and development. **Frontiers Immunology**, v. 17(6:579), p. 1-13, 2015.

SAVINO, W., The Thymus gland is a target in malnutrition. Eur. J. Clin-Nutr. V. 56, p. 546-49, 2002.

SAFIEDDINE, N., & KESHAVJEE, S. Anatomy of thymus gland; Thoracic Surgery Clinics, v. 21 (2); p. 191-195; 2011

SANSOM, S. N.; PONTING, C. P.; NUSSPAUMER, G.; et al. Population and singlecell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. Genome Research, v. 24, n. 12, p. 1918–1931, 2014.

SILVERSTEIN, A. M.; EHRLICH, P.; Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. **Nature Immunology**; v. 4; p. 425-428, 2003.

SHARMA, S., GHOSH, S., SINGH, L.K., SARKAR, A., MALHOTRA, R., GARG, O.P., SINGH, Y., SHARMA, R.S., BHAKUNI, D.S., DAS, T.K., AND BISWAS, S. Identification of autoantibodies against transthyretin for the screening and diagnosis of rheumatoid arthritis. PLoS ONE v. 9, p. 93905, 2014.

ST-PIERRE, C.; TROFIMOV, A.; BROCHU, S.; LEMIEUX, S.; PERREAULT, C. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 2, p. 498–506, 2015

SUDHIR GUPTA & Ankmalika Gupta Louis, Tolerance and Autoimmunity in Primary Immunodeficiency Disease: a Comprehensive Review. Clinic Rev Allerg Immunol (2013) 45:162–169 DOI 10.1007/s12016-012-8345-8

TANAKA, P. P.; PASSOS, G. A. S. J. **Controle pós-transcricional do gene autoimmune regulator (Aire) por meio do microRNA-155**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: < http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-18122019-153447/ >

TAUB, D. D., & LONGO, D. L.; Insights into thymic aging and regeneration**. Immunol Rev**, v. 205, p. 72-93, 2005.

TAKABA, H.; MORISHITA, Y.; TOMOFUJI, Y.; DANKS, L.; NITTA, T.; KOMATSU, N.; KODAMA, T.; TAKAYANAGI, H. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 975–987, 2015.

TOYOSHI ENDO, SOICHI TAKIZAWA, SHOICHIRO TANAKA, MASASHI TAKAHASHI, HIDEKI FUJII, TERUMI KAMISAWA AND TETSURO KOBAYASHI; **American Diabetes Association**, vol. 58, n. 3; p. 732-737; 2008.

WOLFF, A. S. B., OFTEDAL, B. E. Aire mutations and Autoimmune Diseases. In: Passos, G. A. (**Ed. Thymus Transcriptome and Cell Biology. Suiça: Springer Nature**) Cap 8, p 191-214, 2019.

VASCONCELOS-FONTES, L. et. al.; Development of Thymic Regulatory T Lymphocytes. In: PASSOS, G. A. (Ed.). **Thymus Transcriptome and Cell Biology. Suiça: Springer Nature**, 2019. Cap. 12, p. 255-272.

YOGANATHAN, K. et al. T-Cell Development: From T-Lineage Specification to Intrathymic Maturation. In: PASSOS, G. A. (Ed.). **Thymus Transcriptome and Cell Biology. Suiça: Springer Nature**, 2019. Cap. 4, p. 67-116.

# Apêndice

## 10. Apêndice

**Apêndice 10.1** - Lista de genes diferencialmente antes do ensaio de adesão

| Gene | Log2FC | FDR |
|---|---|---|
| Dpysl5 | 9091157 | 4,75E-119 |
| Igfbp7 | 8,913344 | 1,51E-102 |
| Foxa2 | 8,797546 | 2,71E-25 |
| Sytl5 | 8,721618 | 6,31E-23 |
| Mest | 8,165978 | 5,23E-16 |
| Ldhd | 7,529089 | 3,66E-10 |
| Ovgp1 | 7,164187 | 2,95E-08 |
| Poglut1 | 6,681,473 | 4,28E-46 |
| Mark1 | 6,417094 | 4,00E-25 |
| Bmpr1b | 6,308716 | 1,05E-23 |
| P3h2 | 6,175675 | 1,04E-51 |
| Gprin3 | 6,03932 | 1,85E-89 |
| Lypd6b | 5,996713 | 1,22E-17 |
| Colca2 | 5,755213 | 3,92E-15 |
| Crlf1 | 5,397995 | 4,21E-29 |
| Tmem266 | 5,307309 | 2,58E-68 |
| Gm3776 | 5,269855 | 2,79E-11 |
| Tifa | 5,242768 | 3,38E-11 |
| Slurp1 | 5,234273 | 7,43E-11 |
| Npy1r | 5,212533 | 8,08E-11 |
| Ntrk3 | 5,180077 | 3,20E-24 |

**Apêndice 10.2**- Lista de genes diferencialmente após do ensaio de adesão

| genes | logfc | fdr |
|---|---|---|
| Hoxa9 | -10,8995 | 22,38971 |
| Foxa2 | -9,38466 | 18,08391 |
| Ptgs2os2 | -9,35863 | 16,14796 |
| Mark1 | -9,19714 | 16,67473 |
| Igfbp7 | -8,69605 | 42,70701 |
| Gm32554 | -8,63307 | 13,45206 |
| Dpysl5 | -8,51989 | 38,54089 |
| Sytl5 | -8,50171 | 12,10007 |
| Acsl6 | -8,48653 | 12,63851 |
| Kazn | -8,44451 | 12,87844 |
| Tcf7l1 | -8,37717 | 9,895206 |
| Slc22a17 | -8,2224 | 9,969434 |
| Serpinb10 | -8,02662 | 10,02787 |
| Tprg | -7,67012 | 8,390693 |
| Gprin3 | -7,55926 | 33,58971 |
| Gm11407 | -7,45798 | 3,973382 |
| Gm12609 | -7,41048 | 5,96269 |
| Krt13 | -7,01995 | 14,96966 |
| Slc22a17 | -6,9728 | 5,468768 |
| P3h2 | -6,89175 | 21,30986 |
| Gm3776 | -6,77895 | 5,401853 |
| Eid2 | -6,75271 | 5,048531 |

# Anexos

## 11. Anexos

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

FMRP
65 anos USP

### *CERTIFICADO*

Certificamos que o Protocolo intitulado *"Efeito de mutações no gene AIRE (Síndrome APS1) induzidas por CRISPR-Ca9 na conformação da proteína, no transcriptoma de células mTEC e na sua interação com timócitos"*, registrado com o número **003/2017-1**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior,** envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) 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 nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 26 de junho de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 camundongos C57BL/6 fêmeas pesando 20g e oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/06/2017 a 30/07/2022.

We certify that the Protocol ***nº* 003/2017-1**, entitled ***"Effect of AIRE gene mutations (APS1 syndrome) induced by CRISPR-Cas9 in protein conformation, transcriptome of mTEC cells and its interaction with thymocytes"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *06/26/2017*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 female C57BL/e mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/30/2022.

Ribeirão Preto, 26 de junho de 2017

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