

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

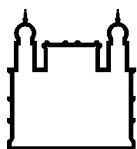
JOÃO RAMALHO ORTIGÃO FARIAS

O papel da integrina VLA-4 em linfócitos T: possível ação reguladora sobre os processos de ativação e diferenciação

Orientadores: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida
Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOÃO RAMALHO ORTIGÃO FARIAS

O papel da integrina VLA-4 em linfócitos T: possível ação reguladora sobre os processos de ativação e diferenciação

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida
Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO

2021

Ramalho Ortigão Farias, João.

O papel da integrina VLA-4 em linfócitos T: possível ação reguladora sobre os processos de ativação e diferenciação / João Ramalho Ortigão Farias.
- Rio de Janeiro, 2021.

159 f.; il.

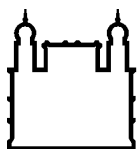
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Vinícius Cotta de Almeida.

Co-orientador: Wilson Savino.

Bibliografia: f. 133-140

1. Integrina. 2. VLA-4. 3. Linfócito T. 4. Expressão gênica. 5. Imunologia.
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JOÃO RAMALHO ORTIGÃO FARIAS

O papel da integrina VLA-4 em linfócitos T: possível ação reguladora sobre os processos de ativação e diferenciação

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida
Prof. Dr. Wilson Savino**

Aprovada em: 30/03/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado – **Presidente** (IOC - Fiocruz)

Prof. Dr. Patricia Cuervo Escobar (IOC - Fiocruz)

Prof. Dr. Joao Paulo de Biaso Viola (INCA)

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos (IFF - Fiocruz)

Prof. Dr. Luiz Anastácio Alves (IOC - Fiocruz)

Rio de Janeiro, 30 de março de 2021

Dedico este trabalho à minha família que
sempre me apoiou na luta pela concretização dos
meus sonhos e foi fonte infinita de inspiração e paz.

“Se acender uma lamparina para outra pessoa,
iluminará também o seu próprio caminho.”

Nitiren Daishonin (1222-1282)

Agradecimentos

Ao meu primeiro orientador, Dr. **Vinícius Cotta de Almeida**, pela oportunidade, apoio e orientação. Seus ensinamentos me permitiram enxergar a imunologia sob a perspectiva da função do linfócito T, por meio de valiosas aulas que atravessavam da biologia celular aos aspectos clínicos da imunologia.

Ao meu segundo orientador, Dr. **Wilson Savino**, pela orientação, incentivos e conversas decisivas na interpretação dos resultados. Seu olhar crítico sobre a biologia é um grande exemplo a ser seguido por todos que passaram pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT). Nossos diálogos tramitaram da ciência à filosofia, possibilitando profícuas reflexões sobre o significado deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. **Mariana Boroni**, pela orientação, estímulo e acolhimento no Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional (LBBC) do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Seus ensinamentos aguçaram meu olhar crítico dentro da ciência de dados.

À Dra. **Nicole Scherer**, responsável da plataforma de bioinformática do INCA, por todo apoio e suporte para o processamento de dados e utilização dos computadores de alto desempenho. Suas lições sobre gestão de projetos de desenvolvimento de software foram muito importantes para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do LBBC pelo apoio, acolhimento e conhecimento compartilhado. Essa equipe maravilhosa foi fundamental para a fase de conclusão desse trabalho. Em especial, aos doutorandos **Cristóvão Lanna**, **Jéssica Cruz** e **Marco Pretti** e ao Dr. **Daniel Moreira** pelas inúmeras discussões e críticas que muito o enriqueceram. O ambiente de equipe e o compartilhamento de protocolos e códigos foi de suma importância para a agilidade e melhoria da qualidade das análises apresentadas aqui.

Ao grupo de bioinformática do Laboratório Nacional de Computação Científica por financiar e prestar todo o apoio para a realização do sequenciamento de RNA em larga escala. Em especial, à Dra. **Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos** por coordenar a assessoria técnica da etapa de sequenciamento, à Dra. **Alexandra Legerber** pelo preparo das bibliotecas e aos Drs. **Guilherme Loss** e **Joseane Carvalho** pelas discussões sobre a análise do sequenciamento.

Aos doutores **Rafael Cuadrat** e **Jorge Bocas** por todas as análises utilizando o pipeline do Cufflinks, realizadas na Unidade de Bioinformática do Instituto Max Planck para Biologia do Envelhecimento, em Colônia, na Alemanha. A estadia no instituto para fazer essas análises foi de crucial importância para minha formação em bioinformática, ciência de dados e ciência da computação. Os conhecimentos adquiridos impactaram profundamente minha forma de pensar a estruturação de dados biológicos com o objetivo de otimizar o seu armazenamento, processamento e visualização. Além disso, o aprendizado durante as visitas ao instituto transformou minha forma de escrever nas linguagens bash, R e python.

Às companheiras de laboratório, Dras. **Larissa Vasconcelos** e **Rafaela Reis**, pela ajuda na realização e análise dos experimentos de citometria, além da preciosa amizade que quero carregar por toda a vida.

Aos Drs. **Luiz Anastácio** e **Natiele Ferreira** pela ajuda na realização e discussão dos experimentos de mobilidade celular de cálcio.

Ao Dr. **Arnon Jurberg** pelo excelente trabalho técnico de construção das células ITGA4-KO e análises de citometria utilizando o programa flowjo.

Às Dras. **Daniella Arêas** e **Júlia Lemos** pela ajuda na realização e discussão dos experimentos de transmigração.

À Profa. Dra. **Tereza Serrano**, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio), pelas incríveis aulas sobre quantificação das incertezas e o pensar estatístico, além da revisão das análises utilizando o modelo matemático de crescimento celular.

A todos os **integrantes do LPT** que de forma direta e indireta contribuíram para o amadurecimento deste trabalho e por todo o apoio prestado ao longo desses anos que passaram tão rápido.

Na jornada do meu doutoramento, tive a oportunidade de conviver com quatro cientistas que foram importantíssimos para a minha formação, mas que não atuaram diretamente neste projeto. De todas as formas, deixo aqui meu agradecimento pois seus ensinamentos estiveram comigo durante toda a trajetória que culminou na escrita dessa tese. Ao Dr. **Thomas Kornberg**, pesquisador da Universidade da Califórnia – unidade de São Francisco (UCSF), por ter me recebido em sua equipe durante nove meses e ter transformado minha forma de ver a biologia em tão pouco tempo. À Dra. **Isabel Guerreiro**, pesquisadora do Conselho Superior de Investigação Científica espanhol (CSIC), pelos preciosos ensinamentos sobre transgênese, genética e comunicação celular. À Dra. **Vasiliki Lalioti**, pesquisadora da Universidade Autônoma de Madrid (UAM), pela amizade, apoio e valiosos ensinamentos sobre bioquímica de proteínas e cultivo celular. Ao Dr. **Ignacio Sandoval**, também pesquisador da UAM, pela amizade e por haver compartilhado seu valioso conhecimento em biologia celular adquirido ao longo de uma vida dedicada a ciência.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| Abreviaturas, siglas e unidades..... | xiv |
| Índice de ilustrações..... | xviii |
| Figuras..... | xviii |
| Tabelas..... | xxi |
| Equações..... | xxi |
| Resumo..... | 22 |
| Abstract..... | 23 |
| 1) Introdução..... | 24 |
| 1.1) A homeostasia e o sistema imune: papel das células T..... | 24 |
| 1.2) O desenvolvimento das células T no timo..... | 24 |
| 1.3) Os linfócitos T..... | 27 |
| 1.3.1) Linfócito T $\gamma\delta$ | 27 |
| 1.3.2) Linfócito T $\alpha\beta$ | 28 |
| 1.4) A migração celular no desenvolvimento de linfócitos T..... | 31 |
| 1.6) Integrinas..... | 35 |
| 1.6.1) História e função das integrinas..... | 35 |
| 1.6.2) Estrutura e sinalização das integrinas..... | 36 |
| 1.7) Importância das integrinas em processos biológicos envolvendo células T maduras .. | 39 |
| 1.7.1) A importância de integrinas para o processo de diapedese..... | 40 |
| 1.7.2) A importância de integrinas na formação da sinapse imunológica..... | 42 |
| 1.8) A integrina VLA-4..... | 43 |
| 1.8.1) O papel de VLA-4 e seu bloqueio terapêutico na neuroinflamação..... | 45 |
| 1.8.2) A integrina VLA-4 na modulação funcional de células T..... | 46 |
| 2) Justificativa..... | 47 |
| 3) Objetivos..... | 48 |
| 3.1) Objetivo geral..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 3.2) Objetivos específicos | 48 |
| 4) Material e métodos | 49 |
| 4.1) Células Jurkat, genotipagem e nomenclatura das células selvagens e mutantes | 49 |
| 4.1.1) Rotina de cultivo celular..... | 49 |
| 4.1.2) Congelamento..... | 49 |
| 4.1.3) Descongelamento..... | 50 |
| 4.2) Construção de célula mutante <i>ITGA4</i> ^{-/-} | 50 |
| 4.2.1) Mutagênese sítio dirigida por CRISPR/Cas9 | 50 |
| 4.2.2) Confirmação de mutante nulo para <i>ITGA4</i> | 52 |
| 4.3) Caracterização funcional de células Jurkat mutantes para <i>ITGA4</i> | 52 |
| 4.3.1) Mobilização de cálcio intracelular..... | 52 |
| 4.3.2) Ensaio de transmigração em câmeras Transwell | 54 |
| 4.3.3) Ensaio de motilidade em superfície plana..... | 55 |
| 4.3.4) Medição e análise de crescimento celular | 55 |
| 4.3.5) Medição e análise de tamanho celular..... | 57 |
| 4.4) Caracterização do perfil de expressão de células Jurkat <i>ITGA4</i> -KO | 57 |
| 4.4.1) Caracterização do perfil de expressão por citometria de fluxo | 57 |
| 4.5) Ativação de células Jurkat | 58 |
| 4.6) Sequenciamento de RNA em larga escala | 58 |
| 4.7) Análise do sequenciamento do RNA total..... | 59 |
| 4.7.1) Análises de expressão diferencial feitas com o pacote de programas Cufflinks ... | 61 |
| 4.7.2) Análises de expressão diferencial feitas com o DESeq2..... | 63 |
| 4.7.3) Construção de um conjunto de dados com os resultados do Cufflinks e DESeq2 | 65 |
| 4.7.4) Análise da distância entre amostras..... | 65 |
| 4.7.5) Gráficos para visualização de expressão gênica..... | 66 |
| 4.7.6) Análises de enriquecimento de função | 66 |
| 4.7.7) Busca por elementos-chaves na regulação de transcrição gênica..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| 4.7.8) Análise de lncRNA..... | 68 |
| 5) Resultados e discussão – Parte 1: A construção de um mutante nulo para <i>ITGA4</i> e observação de fenótipos <i>in vitro</i> | 69 |
| 5.1) Mutagênese dirigida por CRISPR/Cas9 e isolamento de um mutante <i>ITGA4</i> ^{-/-} | 69 |
| 5.2) Alterações no cultivo | 71 |
| 5.2.1) Curva de crescimento das células mutantes e não mutantes | 71 |
| 5.2.3) Análise de tamanho de células mutantes e não mutantes | 74 |
| 5.3) Conclusão parcial da primeira parte dos resultados e discussão..... | 75 |
| 6) Resultados e discussão – Parte 2: RNA-Seq como ferramenta de caracterização molecular | 76 |
| 6.1) Produção de RNA de alta qualidade e sequenciamento | 76 |
| 6.2) Quantificação de expressão gênica | 78 |
| 6.3) Análise de expressão diferencial..... | 79 |
| 6.3.1) Resultados obtidos com o pipeline do Cufflinks e DESeq2..... | 79 |
| 6.3.2) Genes DE não codificantes para proteína..... | 84 |
| 6.4) Conclusão parcial da segunda parte dos resultados e discussão | 85 |
| 7) Resultados e discussão – Parte 3: A análise de enriquecimento de função indicou um aumento de expressão de genes associados à ativação e à regulação da ativação nas células <i>ITGA4-KO</i> | 86 |
| 7.1) Enriquecimento de função na comparação <i>ITGA4-KO</i> vs WT..... | 86 |
| 7.1.1) Análise funcional frente às anotações do GO..... | 86 |
| 7.1.1) Análise funcional frente às anotações do KEGG | 89 |
| 7.2) Conclusão parcial da terceira parte dos resultados e discussão | 96 |
| 8) Resultados e discussão – Parte 4: análise de reguladores transcricionais envolvidos na ativação e diferenciação de células T..... | 97 |
| 8.1) Reguladores transcricionais centrais nas células <i>ITGA4-KO</i> | 97 |
| 8.2) O regulador epigenético TRIM28..... | 98 |
| 8.3) Sub-rede contendo TBX21 | 101 |

| | |
|---|-----|
| 8.4) Conclusão parcial da quarta parte dos resultados e discussão | 105 |
| 9) Resultados e discussão – Parte 5: A inativação de ITGA4 promoveu alterações no perfil de moléculas de superfície com implicações funcionais em adesão, migração e sinalização | 106 |
| 9.1) Moléculas de adesão e de interação célula-célula diferencialmente expressas em células ITGA4-KO | 106 |
| 9.2) Perfil de expressão de integrinas..... | 111 |
| 9.3) Ensaio de mobilidade celular | 113 |
| 9.4) Mobilização intracelular de cálcio | 116 |
| 9.5) Conclusão parcial da quinta parte dos resultados e discussão | 120 |
| 10) Resultados e discussão – Parte 6: Mimetização da ativação via TCR com anticorpos ativadores | 121 |
| 10.1) Expressão de marcadores de ativação..... | 121 |
| 10.2) Avaliação da intensidade do efeito do tratamento com anticorpos ativadores sobre as células mutantes | 123 |
| 10.3) Conclusão parcial da sexta parte dos resultados e discussão | 125 |
| 11) Conclusão e perspectivas..... | 129 |
| 11.1) Proliferação celular | 129 |
| 11.2) Motilidade e quimiotaxia | 130 |
| 11.3) Controle de expressão de moléculas relacionadas à adesão celular | 130 |
| 11.4) Efeitos da inativação de ITGA4 sobre a ativação e a diferenciação celular..... | 130 |
| 12) Referências bibliográficas | 133 |
| 13) Anexos | 141 |
| ANEXO 1 | 141 |
| 13.1) Genotipagem das células Jurkat | 141 |
| ANEXO 2..... | 142 |
| 13.2) Ajuste da curva de crescimento com modelo matemático | 142 |
| ANEXO 3..... | 143 |
| 13.3) Análise de qualidade do RNA-seq com o programa FastQC | 143 |

| | |
|---|-----|
| ANEXO 4..... | 145 |
| 13.4) Biotipos de RNA não codificantes de proteína | 145 |
| ANEXO 5..... | 146 |
| 13.5) Via de sinalização das TGF β | 146 |
| ANEXO 6..... | 149 |
| 13.6) Rede de reguladores transcricionais | 149 |
| ANEXO 7..... | 152 |
| 13.7) Variações metabólicas nas células ITGA4-KO | 152 |
| ANEXO 8..... | 158 |
| 13.8) genes DE entre as amostras WT4h vs WT ou KO4h vs KO | 158 |
| ANEXO 9..... | 159 |
| 13.9) TRADUZIR..... | 159 |

ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

| | |
|---------|---|
| ACADS | Cadeia curta de acil-CoA desidrogenase (<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain</i>) |
| ACKR3 | receptor atípico 3 de quimiocina (<i>atypical chemokine receptor 3</i>) |
| ACSL | Membro da família de cadeia longa de acil-CoA sintetase (<i>Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member</i>) * |
| APC | células apresentadora de antígeno (<i>antigen presenting cells</i>) |
| ARRB1 | Arrestina beta 1 (<i>Arrestin β 1</i>) |
| ATP | adenosina trifosfato |
| auc_e | área empírica sob a curva |
| auc_1 | área sob a curva calculada pela integral da equação logística |
| BCL2 | CLL de células B/Linfoma 2 (<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>) |
| BCRJ | Banco de Células do Rio de Janeiro |
| BH | Benjamini e Hochberg (<i>Benjamini and Hochberg</i>) |
| BSA | albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>) |
| cat# | código ou número de catálogo |
| CBX | Cromobox (<i>Chromobox</i>) * |
| CD | complexo/grupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>) * |
| CPT | Carnitina Palmitoiltransferase (<i>Carnitine Palmitoyltransferase</i>) * |
| CRISPR | Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>) |
| CXCL | quimiocina com motivo C-X-C (<i>C-X-C motif chemokine</i>) * |
| CXCR | receptor de quimiocina com motivo C-X-C (<i>C-X-C motif chemokine receptor</i>) * |
| DE | diferencialmente expresso |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DPBS | PBS de Dulbecco (<i>Dulbecco's PBS</i>) |
| DPBS-/- | DPBS sem cálcio e magnésio |
| DTX | Deltex E3 Ubiquitina Ligase * |
| EC | Número da comissão de enzima (<i>Enzyme Commission Number</i>) |
| ECM | matriz extracelular (<i>extracellular matrix</i>) |
| ERK | quinasas extracelulares reguladas por sinal (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>) |
| FC | <i>Fold Change</i> |
| FDR | razão de descoberta falsa (<i>false discovery ratio</i>) |
| FN | fibronectina |
| FNh | fibronectina humana |
| FPKM | milhão de quilobase por fragmentos (<i>fragments per kilobase million</i>) |
| FU | unidades de fluorescência (<i>fluorescent units</i>) |
| g | unidade gravitacional para força centrífuga relativa |
| GDE | gene diferencialmente expresso |
| GO | Ontologia Gênica (<i>Gene Ontology</i>) |
| GSEA | análise de enriquecimento de grupos gênicos (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>) |

| | |
|--------------------|---|
| GTF | Formato geral de transferência (<i>General Transfer Format</i>) |
| h | hora |
| HADH | Hidroxiacil-CoA Desidrogenase (<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase</i>) |
| HDAC | Histona desacetilase (<i>Histone deacetylase</i>) * |
| HK | hexoquinase (<i>Hexokinase</i>) * |
| HLA | antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>) |
| HP1 β/γ | proteína 1 β/γ da heterocomatina (<i>Heterochromatin Protein 1 β/γ</i>) |
| ICAM | molécula de adesão intercelular (<i>intercellular adhesion molecule</i>) * |
| IFNG | gene codificante para IFN- γ |
| IFN- γ | interferon γ |
| IFR | Fator Regulador de Interferon (<i>Interferon Regulatory Factor</i>) * |
| IHW | ponderação de hipótese independente (<i>independent hypothesis weighting</i>) * |
| IL | interleucina * |
| IL12RB1 | Subunidade β 1 do receptor de interleucina 12 (<i>Interleukin 12 Receptor Subunit β 1</i>) |
| ITGA | subunidade α de integrina (<i>Integrin α</i>) * |
| ITGB | subunidade β de integrina (<i>Integrin β</i>) * |
| k | capacidade de carga |
| KAP | Fosfatase associada a quinase (<i>Kinase Associated Phosphatase</i>) * |
| KEGG | Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>) |
| KO | nocaute (<i>knockout</i>) |
| KRAB | Caixa Associada de Krüppel (<i>Krüppel Associated Box</i>) |
| LCK | proteína tirosina quinase específica de linfócitos (<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>) |
| LFA | antígeno associado à função linfocitária (<i>lymphocyte function-associated antigen</i>) * |
| LFC | log na base 2 do fold change |
| LFC_cuff | LFC obtido com as análises do Cufflinks |
| LFC_des | LFC obtido com as análises do DESeq2 |
| LNCC | Laboratório Nacional de Computação Científica |
| lncRNA | RNA longo não codificante (<i>long non coding RNA</i>) |
| LPT | Laboratório de Pesquisas sobre o Timo |
| MADCAM | molécula de adesão da célula a adressina mucosal (<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule</i>) * |
| MAPK | proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>) * |
| MDS | escala multidimensional (<i>multi-dimensional scaling</i>) |
| MHC | complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| min | minuto |
| miRNA | microRNA |
| mRNA | RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>) |
| MT-ND | NADH-ubiquinona oxidoreductase * |
| mtrRNA | RNA ribossomal mitocondrial (<i>mitochondrial ribosomal RNA</i>) |
| N0 | concentração inicial ajustada |

| | |
|-----------|--|
| NK | exterminadoras natas (<i>natural killers</i>) |
| ORF | fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>) |
| padj | p-valor ajustado |
| padj_cuff | p-valor ajustado obtido com as análises do Cufflinks |
| padj_des | p-valor ajustado obtido com as análises do DESeq2 |
| PBS | tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCA | análise de componente principal (<i>principal component analysis</i>) |
| PCR | reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDK | Piruvato Desidrogenase Quinase (<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase</i>) * |
| PECAM | Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais (<i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>) * |
| PIAS | Inibidores de proteínas STAT ativadas (<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>) |
| PKA | proteína quinase A (<i>protein kinase A</i>) |
| PKB | proteína quinase B (<i>protein kinase B</i>) ou Akt |
| PKC | proteína quinase C (<i>protein kinase C</i>) |
| PLC | fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>) |
| PMA | forbol 12-miristato de 13-acetato (<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>) |
| pMHC | complexo peptídeo-MHC |
| PTP | Proteína Tirosina Fosfatases (<i>Protein Tyrosine Phosphatases</i>) |
| PTPN | proteína tirosina fosfatase do tipo não receptor (<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type</i>) * |
| r | taxa de crescimento intrínseca da população |
| RB | Proteína associada ao retinoblastoma (<i>Retinoblastoma-Associated Protein</i>) * |
| RBBP | Proteína de ligação ao retinoblastoma (<i>Retinoblastoma-Binding Protein</i>) * |
| RIN | Número de integridade de RNA (<i>RNA integrity number</i>) |
| RNA-seq | sequenciamento em larga escala de RNA |
| RORC | Receptor órfão C relacionado a RAR (<i>RAR-Related Orphan Receptor C</i>) |
| rRNA | RNA ribossomal (<i>ribosomal RNA</i>) |
| RUNX | fator de transcrição relacionado ao Runt (<i>Runt-Related Transcription Factor</i>) * |
| scaRNA | pequenos RNAs específicos de corpos de cajal (small cajal body-specific RNA) |
| SDHA | Subunidade A da flavoproteína do complexo succinato desidrogenase (Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A) |
| SELL | L selectina (selectin L) |
| SFB | soro fetal bovino |
| SLC2A1 | Membro 1 da família 2 de portadores de soluto (Solute Carrier Family 2 Member 1) |
| SMAC | clusters de ativação supramolecular (<i>supramolecular activation clusters</i>) |
| SMAD | Mães contra o homólogo de decapentaplégico (<i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog</i>) * |
| SNP | polimorfismo de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorphism</i>) |
| snRNA | pequenos RNAs nucleares (<i>small nuclear RNA</i>) |
| STAT | Transdutor de sinal e ativador de transcrição (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>) * |
| STR | repetições curtas em tandem (<i>Short Tandem Repeat</i>) |

| | |
|--------|--|
| t_gen | tempo de duplicação |
| t_mid | tempo para a população atingir a metade da densidade máxima populacional |
| TBX21 | Fator 21 de transcrição de caixa T (<i>T-Box Transcription Factor 21</i> ou T-bet) |
| TCR | receptor de célula T (<i>T-cell receptor</i>) |
| TEC | célula epitelial tímica (<i>thymic epithelial cell</i>) |
| TFDP1 | Fator de Transcrição Dp-1 (<i>Transcription Factor Dp-1</i>) |
| Th | T auxiliar (<i>T helper</i>) |
| TNF | Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) * |
| TNFRSM | Membro da Superfamília de Receptor de TNF (<i>TNF Receptor Superfamily Member</i>) * |
| TNFSF | Membro da Superfamília TNF (<i>TNF Superfamily Member</i>) * |
| TPM | transcrito por milhão de quilobase (<i>transcripts per kilobase million</i>) |
| Treg | T reguladora |
| TRIM | Contendo Motivo Tripartido (<i>Tripartite Motif Containing</i>) * |
| tRNA | RNA transportador |
| v | volume |
| VCAM | molécula de adesão vascular (<i>vascular cell adhesion molecule</i>) * |
| VLA | antígeno muito tardio (<i>very late antigen</i>) * |
| vs | versus |
| WT | tipo selvagem (<i>wild type</i>) |
| ZAP70 | cadeia ζ do TCR associada a proteína quinase 70 (ζ <i>Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70</i>) |
| ZFHX | homeobox de dedo de zinco (<i>zinc-finger homeobox</i>) * |
| ZNF | proteína de dedo de zinco (<i>zinc-finger protein</i>) * |

* A sigla pode ser utilizada em associação com um numeral identificador do parágrafo.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1) Anatomia e histologia do timo..... | 25 |
| Figura 2) Esquema ¹ de desenvolvimento de células T..... | 32 |
| Figura 3) Famílias das α e β integrinas e suas possíveis interações proteína-proteína ... | 36 |
| Figura 4) Esquema mostrando a estrutura das moléculas de integrina e a organização de outras proteínas importantes para sua ativação e sinalização..... | 38 |
| Figura 5) Principais etapas do processo de migração de um linfócito circulante para o tecido inflamado | 42 |
| Figura 6) Sinapse imunológica..... | 44 |
| Figura 7) Representação esquemática do sistema de transmigração em câmara Transwell | 55 |
| Figura 8) Representação esquemática mostrando a forma de preparo do material para fotografar as células com o propósito de medir o tamanho celular | 57 |
| Figura 9) Representação esquemática mostrando o sequenciamento pareado e orientado das extremidades de um fragmento de RNA | 59 |
| Figura 10) Fluxograma de processamento do RNA-Seq com os pipelines do Cufflinks e DESeq2..... | 60 |
| Figura 11) Esquema mostrando as 6 possibilidades de comparação pareada para identificação de genes diferencialmente expressos..... | 61 |
| Figura 12) Fluxograma detalhado do processamento de dados utilizando o protocolo adaptado do Cufflinks | 63 |
| Figura 13) Sequência obtida a partir da PCR para amplificar o éxon 1 da linhagem mutante para o gene <i>ITGA4</i> | 70 |
| Figura 14) Análise por citometria da expressão membranar da integrina $\alpha 4$ (CD49d) em células mutantes (clone E8H4E5) e não mutantes para o gene <i>ITGA4</i> | 71 |
| Figura 15) Comparação do crescimento das células <i>ITGA4</i> -KO e WT | 72 |
| Figura 16) Métricas calculadas a partir das curvas de crescimento ajustadas..... | 73 |
| Figura 17) Curva de crescimento com meio condicionado | 74 |
| Figura 18) Medida de tamanho celular de células mutantes e não mutantes em condições de alta e baixa concentração celular..... | 75 |
| Figura 19) Resultado Gráfico do bioanalyzer | 77 |
| Figura 20) MDS (<i>multi-dimensional scaling</i>) plote com resultado do Cufflinks | 79 |

| | |
|--|------------|
| Figura 21) Número de genes diferencialmente expressos por cada comparação entre amostras | 80 |
| Figura 22) Gráfico de dispersão evidenciando a diferença de expressão entre amostras | 81 |
| Figura 23) Atributos compostos por genes diferencialmente expressos de acordo com as análises feitas com o Cufflinks e DESeq2 | 82 |
| Figura 24) Diagramas de venn comparando nomes de genes diferencialmente expressos detectados com os protocolos do Cufflinks e DESeq2 | 83 |
| Figura 25) Gráfico de barra mostrando o LFC obtido para as 10 maiores variações de expressão negativas e positivas para cada um dos métodos utilizados | 84 |
| Figura 26) Análise de enriquecimento de termos com base na anotação de GO para comparação KO vs WT | 87 |
| Figura 27) Gráfico de pontos mostrando termos ativados ou suprimidos de acordo com a análise GSEA para anotação do GO dos genes DE na comparação KO vs WT | 88 |
| Figura 28) Visualização em rede do resultado da GSEA com genes DE na comparação KO vs WT | 90 |
| Figura 29) GSEA com base na anotação de KEGG para os genes DE na comparação KO vs WT | 93 |
| Figura 30) Via de sinalização de JAK-STAT | 94 |
| Figura 31) Via de interações de citocinas e receptores de citocinas | 95 |
| Figura 32) Redes de interação proteína-proteína entre reguladores transcricionais na comparação WT x KO..... | 98 |
| Figura 33) Sub-rede de reguladores de transcrição associados à proteína TRIM28 | 99 |
| Figura 34) Níveis de expressão dos genes codificantes para proteínas que podem ligar-se a elementos do complexo regulador epigenéticos envolvendo TRIM28 | 102 |
| Figura 35) Sub-rede de reguladores de transcrição associados à ativação..... | 103 |
| Figura 36) Índice de transcrição de importantes genes na diferenciação dos subtipos Th1, Th2 e Th17..... | 104 |
| Figura 37) Variação de expressão de genes associados a adesão celular | 108 |
| Figura 38) Nível de expressão de genes codificantes para moléculas de (A) (B) (C) MHC de classe I e (D) (E) (F) MHC de classe II..... | 109 |
| Figura 39) Nível de expressão medido em TPM para os genes (A) <i>CD2</i>, (B) <i>CD58</i> e (C) <i>CD28</i>..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| Figura 40) Nível de expressão medido em TPM para os genes (A) <i>JAM-3</i> e (B) <i>PARD3</i>. | 110 |
| Figura 41) Gráfico de barra mostrando os valores de TPM que representam o perfil de transcrição de integrinas nas células WT e KO | 112 |
| Figura 42) Análise da expressão da subunidade $\alpha 5$ (CD49e) | 113 |
| Figura 43) Ensaio de motilidade sobre superfície recoberta com fibronectina | 114 |
| Figura 44) Transmigração frente à fibronectina (FN) e estímulo com CXCL12 | 115 |
| Figura 45) Perfil de transcrição de receptores de CXCL12 | 116 |
| Figura 46) Medida do deslocamento intracelular de cálcio por citometria de fluxo | 118 |
| Figura 47) Medida do deslocamento de cálcio feita em leitor de microplaca FlexStation III | 119 |
| Figura 48) Nível de expressão medido em TPM para genes envolvidos no influxo de cálcio mediado por canais voltagem dependentes do tipo L | 120 |
| Figura 49) Nível de expressão de genes codificantes para marcadores de ativação linfocitária | 121 |
| Figura 50) Nível de expressão de genes codificantes para fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação de expressão de CD69 | 122 |
| Figura 51) Clusterização das amostras com base nos genes diferencialmente expressos de acordo com o método do DESeq2 | 124 |
| Figura 52) Mapa de calor mostrando o perfil de expressão de 55 genes diferencialmente expressos durante a ativação das células WT e KO com um valor de FC ≥ 2 | 126 |
| Figura 53) Nível de expressão de genes envolvidos na produção de IL-2 | 127 |
| Figura 54) Nível de expressão de genes da família EGR | 127 |
| Figura 55) Nível de expressão de genes reguladores da via do TCR | 128 |
| Figura 56) Curvas de crescimento ajustadas | 142 |
| Figura 57) Gráfico da qualidade média por base | 143 |
| Figura 58) Gráfico do percentual de contaminação de adaptador por base | 144 |
| Figura 59) Gráfico de barra mostrando número de genes DE codificantes para RNA que não são traduzidos em proteína | 145 |
| Figura 60) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo “<i>TGF-beta signaling pathway</i>” (hsa04350) | 147 |
| Figura 61) Gráfico de barra mostrando os valores de LFC para genes da via de TGF-β diferencialmente expressos na comparação KO vs WT | 148 |

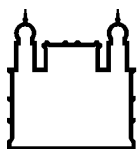
| | |
|---|------------|
| Figura 62) Rede de interação proteína-proteína para reguladores de transcrição diferencialmente expressos na comparação KO vs WT | 149 |
| Figura 63) Redes de interação proteína-proteína entre reguladores de transcrição..... | 150 |
| Figura 64) Rede de interação proteína-proteína montada por crescimento da sub-rede contendo TRIM28 | 151 |
| Figura 65) Metabolismo energético de açúcares | 153 |
| Figura 66) Modulação negativa da glicólise com possível ativação do ciclo do citrato . | 154 |
| Figura 67) Alteração do metabolismo energético com favorecimento do ciclo do citrato nas células mutantes | 155 |
| Figura 68) Alterações metabólicas das células mutantes condizem com uma alimentação baseada em β-oxidação | 156 |
| Figura 69) Mapa de calor para genes DE entre as amostras WT4h vs WT ou KO4h vs KO. | 158 |
| Figura 70)..... | 159 |

Tabelas

| | |
|--|------------|
| TABELA 1) Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese e confirmação..... | 51 |
| TABELA 2) resultado do sequenciamento de RNA | 78 |
| TABELA 3) Resultado da genotipagem da linhagem Jurkat Clone E6.1 do LPT | 141 |

Equações

| | |
|---|-----------|
| Equação 1) Equação logística que representa o número de células N_t no tempo t (90) .. | 56 |
|---|-----------|



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

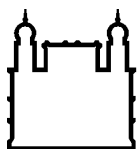
O papel da integrina VLA-4 em linfócitos T: possível ação reguladora sobre os processos de ativação e diferenciação

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

João Ramalho Ortigao Farias

As integrinas são moléculas de adesão celular cruciais para o funcionamento do sistema imunológico. Entre elas, a integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) desempenha relevante papel no processo de extravasamento dos linfócitos T nos locais de inflamação ou lesão e na comunicação entre a célula T e as células apresentadoras de antígeno. O bloqueio de VLA-4 tem sido testado e utilizado para o tratamento de doenças autoimunes com consequente redução da localização tecidual dessas células por seu efeito inibitório sobre a migração de células T. Entretanto, a intervenção farmacológica sobre as integrinas tem se mostrado um grande desafio devido ao seu complexo mecanismo de sinalização, perfil de expressão distribuído por quase todas as células do corpo e composição com subunidades comuns a diferentes integrinas com funcionalidades bastantes distintas. Nesse contexto, esse projeto visa aprofundar o conhecimento sobre o papel de VLA-4 no funcionamento das células T através da inativação do gene *ITGA4* como forma de estudo da participação deste gene nos processos de ativação, adesão e migração. O gene *ITGA4* (codificante para a subunidade $\alpha 4$ de integrina) foi inativado por CRISPR/Cas9 em células Jurkat, uma linhagem linfoblástica de células T. A caracterização funcional das células *ITGA4*-KO revelou um aumento da transmigração *in vitro* frente à fibronectina, enquanto que a motilidade sobre uma superfície plana coberta com esta proteína foi prejudicada. As células mutantes apresentaram um padrão de crescimento diferente das células não mutantes quando ambos os cultivos estavam em alta concentração. Curiosamente, as células *ITGA4*-KO apresentaram menor mobilização de cálcio em relação às células Jurkat não mutantes. Para melhor compreendermos as alterações moleculares que poderiam estar associadas a essas alterações fenotípicas, foi realizado um sequenciamento massivo de RNA para comparar o perfil de transcrição das células mutantes e não mutantes sob as condições de ativação e não ativação via TCR. As células mutantes possuem um padrão de transcrição gênica compatível com um perfil de ativação celular e diferenciação para o subtipo Th1. Entretanto, quando submetemos as duas linhagens a tratamento com anticorpos ativadores da via de sinalização pelo TCR, as células não mutantes apresentaram índices de expressão mais elevados para genes relacionados à ativação celular. A inativação de *ITGA4* em células Jurkat indicou um mecanismo de regulação negativa da via do TCR, pois promoveu a elevação de transcrição de moléculas envolvidas na ativação linfocitária como os marcadores CD69 e Nur77 (NR4A1). Embora o LFA-1 tenha função bem definida sobre a coestimulação da via do TCR, o papel de VLA-4 ainda não está bem estabelecido. Assim, nossos resultados trazem novas perspectivas para funções de VLA-4 na biologia da célula T e novas implicações em abordagens que visam a essa integrina como alvo terapêutico. Até então, as integrinas nunca haviam sido relacionadas a tal função e apenas a importância de LFA-1 para a coestimulação da via do TCR havia sido reportada. Este resultado traz uma nova perspectiva para abordagens que visam o *ITGA4* como alvo para terapia gênica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The role of VLA-4 integrin in T lymphocytes: possible regulatory action on activation and differentiation processes

ABSTRACT

PhD Thesis

João Ramalho Ortigao Farias

Integrins are cell adhesion molecules crucial for the functioning of the immune system. Among them, the integrin VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) plays an important role in the extravasation process of T lymphocytes at the sites of inflammation or injury and in the communication between the T cell and the antigen presenting cells. VLA-4 blockade has been tested and used for the treatment of autoimmune diseases, with a consequent reduction in the tissue localization of these cells due to its inhibitory effect on the migration of T cells. However, pharmacological intervention on integrins has proved to be a major challenge due to its complex signaling mechanism, expression profile distributed by almost all cells of the body and composition with subunits common to different integrins with quite different functionalities. In this context, this project aims to deepen the knowledge about the role of VLA-4 in the functioning of T cells through the inactivation of the ITGA4 gene as a way of studying the participation of this gene in the processes of activation, adhesion and migration, in addition to evaluating the possibility of use this gene as a target for gene therapy. The ITGA4 gene (coding for the $\alpha 4$ subunit of integrin) was inactivated by CRISPR / Cas9 in Jurkat cells, a lymphoblastic lineage of T cells. The functional characterization of ITGA4-KO cells revealed an increase in transmigration in vitro against fibronectin, while the motility on a flat surface covered with this protein was impaired. The mutant cells showed a different growth pattern than non-mutant cells when both cultures were in high concentration. Interestingly, ITGA4-KO cells showed less calcium mobility compared to non-mutant Jurkat cells. To better understand the molecular changes that could be associated with these phenotypic changes, massive RNA sequencing was performed to compare the transcriptional profile of mutant and non-mutant cells under the conditions of activation and non-activation via TCR. The mutant cells have a gene transcription pattern compatible with a cell activation profile and differentiation for the Th1 subtype. However, when we submitted both strains to treatment with antibodies that activate the signaling pathway by TCR, non-mutant cells showed higher expression rates for genes related to cell activation. The inactivation of ITGA4 in Jurkat cells indicated a mechanism of negative regulation of the TCR pathway, as it promoted the elevation of transcription of molecules involved in lymphocyte activation such as the CD69 and Nur77 markers (NR4A1). Although LFA-1 has a well-defined function on the TCR costimulation, the role of VLA-4 is not yet well established. Thus, our results bring new perspectives for VLA-4 functions in T-cell biology and new implications in approaches aimed at this integrin as a therapeutic target. Until then, integrins had never been related to this function and only the importance of LFA-1 for the co-stimulation of the TCR pathway had been reported. This result brings a new perspective to approaches that target ITGA4 as a target for gene therapy.

1) INTRODUÇÃO

1.1) A homeostasia e o sistema imune: papel das células T

O sistema imune contribui para a homeostasia do organismo através da interação com moléculas exógenas, como as derivadas de alimentos e microrganismos, e também endógenas, como as moléculas derivadas das próprias células e de componentes da microbiota. A interação e o reconhecimento desses componentes permitem a eliminação de patógenos e o combate às células cancerosas, assim como a ausência de processos inflamatórios exacerbados ou de resposta imune contra padrões de moléculas endógenas normais ou necessárias para o nosso organismo. A resposta a esses eventuais riscos à homeostase é finamente regulada e, além disso, as células do sistema imune se adaptam a diferentes condições biológicas através da integração e interpretação de diferentes sinais que chegam de forma simultânea ou em uma sequência temporal (1). Particularmente, os linfócitos T são agentes cruciais para esse processo, contribuindo para uma fina e ao mesmo tempo ampla regulação da atividade do sistema imune. Nesse contexto, a presente tese busca compreender a importância da integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ ou CD49d/CD29) na atividade das células T, usando como modelo de análise um mutante nulo para o gene codificante da subunidade $\alpha 4$ de integrina (*ITGA4*) em uma linhagem de linfócito T.

1.2) O desenvolvimento das células T no timo

A descoberta da função do timo possui uma história interessante e cheia de mistérios até 1961, quando o pesquisador Jacques Miller associou o seu papel ao sistema imune (2). O timo foi o último órgão do ser humano a ter sua função completamente compreendida, e as hipóteses a respeito dessa questão acompanharam a evolução da medicina como ciência. Desde a antiguidade os mistérios da atividade tímica circundam o imaginário do ser humano e as especulações a respeito da sua serventia perpassaram coisas como um possível papel para o assento da alma ou uma atividade no desenvolvimento dos membros inferiores (3). Na primeira metade do século XX, já se conhecia a existência dos linfócitos, mas sua origem ainda era desconhecida. Nesse momento, acreditava-se que o timo havia perdido sua função ao longo da evolução e que atualmente servia apenas para o depósito de linfócitos mortos. No final da década de 1950, os imunologistas enfatizavam que importantes elementos da resposta imune conhecida até então, como os centros germinativos e as células plasmáticas, não eram vistos neste órgão. Apenas na década de 1960 é que um conjunto de artigos revelaram sua função na produção de linfócitos em associação com a medula óssea (4).

O timo é o órgão linfóide primário que fornece as condições necessárias para o desenvolvimento das células T. Este órgão é composto por dois lobos simétricos localizados no mediastino superior anterior, na frente do coração e atrás do esterno. Cada lobo é revestido por tecido conjuntivo denso que adentra o órgão, forma septos e divide o parênquima em lóbulos (**Figura 1**). Por sua vez, cada lóbulo pode ser subdividido em regiões subcapsular, cortical externa, cortical interna e medular (5).

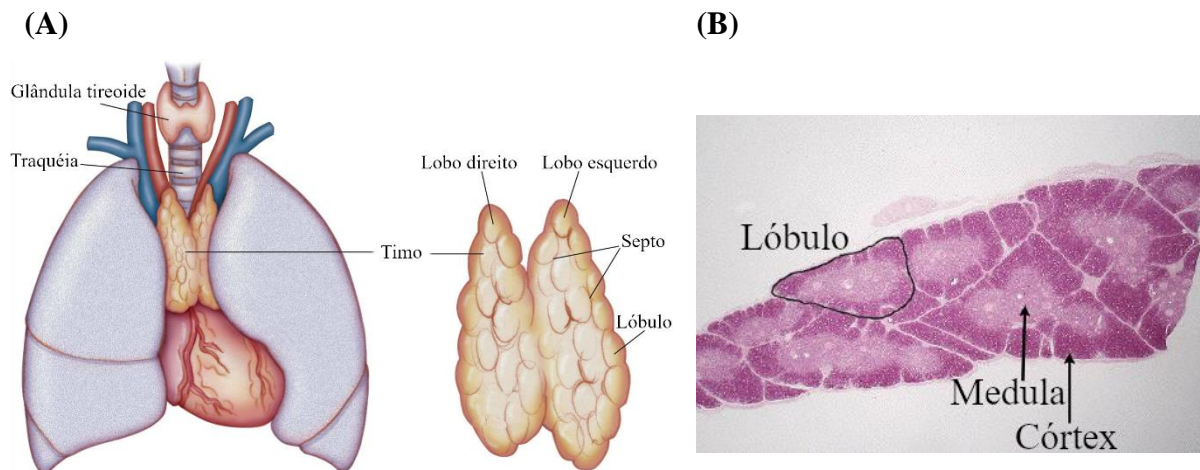


Figura 1) Anatomia e histologia do timo

A) ilustração¹ da posição anatômica do timo e representação ampliada do órgão com a nomenclatura de suas subdivisões; **B)** fotografia² de corte histológico do timo de um bebê humano corado com hematoxilina e eosina.

1 – A ilustração foi adaptada do atlas online Anatomy Medicine acessado em julho de 2019 (<https://anatomy-medicine.com/endocrine-system/96-the-thymus-gland.html>).

2 – A imagem foi adaptada do atlas histológico do Dartmouth College acessado em julho de 2019 (https://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_6/lymphoid/DMS117/popup.html).

Essa organização anatômica do timo representa uma dinâmica histofuncional que revela uma rica rede de interações celulares governadas por múltiplos fatores moleculares (solúveis e membranares) que definem o desenvolvimento intratímico das células T. A diferenciação de uma célula precursora oriunda da medula óssea em um linfócito T especializado ocorre ao longo da sua migração para o interior do lóbulo, desde a entrada via vasos na região córtico-medular, caminhando em direção ao córtex subcapsular e retornando até a região medular. Ao percorrer essa trajetória, as células em diferenciação recebem inúmeros sinais do microambiente tímico que é composto por células não linfóides, matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*), citocinas e hormônios tímicos como timulina, timopoiatina e timosinas (6). De fato, nichos de diferenciação podem ser observados no timo, com papéis de distintas moléculas e grupos celulares em diferentes etapas do desenvolvimento das células T (7).

Compondo o complexo repertório de redes celulares do microambiente tímico temos vários tipos de células residentes como as células epiteliais tímicas (TEC), células vasculares e células mesenquimais. Entretanto, mais de 99% das células do timo de um jovem adulto correspondem a timócitos em desenvolvimento. As TEC e as células mesenquimais compartimentalizam diferentes microambientes necessários para a diferenciação apropriada dos timócitos. As TEC possuem o repertório molecular apropriado para definir o destino de diferenciação ou morte do timócito como veremos mais adiante no tópico de diferenciação de células T. Também estão presentes no timo outros tipos celulares de origem hematopoiética como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (8).

Em humanos, o timo atinge seu tamanho máximo já no primeiro ano de vida e em neonatos chega a tocar a glândula tireoide (9) (3). Com o passar do tempo esse órgão tende a involuir, sendo substituído por tecido adiposo com consequente diminuição de tecido linfoide. A involução tímica relacionada à idade resulta em timopoiiose ineficiente devido a um conjunto de fatores, tais como menor número de células progenitoras hematopoiéticas, alterações nos níveis de hormônios sexuais e mudanças estruturais e funcionais no microambiente tímico (10). Essas últimas alterações parecem ser as mais importantes, que incluem a expressão reduzida de *Foxn1* (*Forkhead Box N1*), importante regulador transcricional da funcionalidade das TEC, associado a danos estruturais e apoptose de TEC, além da perda da junção córtico-medular e aumento no número de fibroblastos. A saída deficiente de timócitos influencia a expansão oligoclonal de células T de memória, contribuindo para uma menor amplitude do repertório de moléculas de TCR e a consequente resposta prejudicada a patógenos e tumores (10). De fato, além da deficiência numérica, a involução tímica relacionada ao envelhecimento também se associa a uma menor qualidade de resposta à estimulação antigênica, como reportado que células T recém-emigrantes do timo produzem baixos níveis de interleucina 2 (IL-2) e proliferam menos (11). Essa perda da capacidade funcional tímica, associada a uma tolerância central ineficaz, está intimamente envolvida no quadro geral de imunosenescência com redução da responsividade a novos antígenos e aos eventos de inflamação associada ao envelhecimento e autoimunidade.

Ainda que progressivamente deficitária, a contínua diferenciação intratímica de células T é influenciada pelos grupos celulares do microambiente tímico, que promovem a formação do repertório de TCR gerados durante a recombinação somática, eliminando células potencialmente autorreativas e selecionando positivamente aquelas com propriedades de tolerância a antígenos próprios (7). Em conjunto, essa complexa rede de eventos celulares e moleculares resulta na consequente geração de pelo menos cinco subpopulações relevantes e

funcionalmente distintas: i) células T *helper* (Th); ii) células T citotóxicas; iii) células T regulatórias (Treg); iv) células NKT; e células T $\gamma\delta$.

1.3) Os linfócitos T

As células T possuem a função de controlar a ativação de outras células imunes, induzir a apoptose de células que apresentam padrões moleculares estranhos ao corpo e suprimir uma resposta imune exacerbada (12). Sua atividade é exercida por meio do reconhecimento de peptídeos realizado por um receptor específico de células T descoberto em 1984, o TCR (*T cell receptor*) (13). Esta classe de receptor é formada por duas cadeias de proteínas denominadas de α - β ou γ - δ e as células T são nomeadas de acordo com o tipo de TCR que produzem (linfócito T $\alpha\beta$ ou T $\gamma\delta$). Outros receptores precisam ser acionados em paralelo ao TCR para que ocorra a devida ativação da célula T como veremos a seguir. O TCR e os receptores coestimuladores de célula T fazem com que os linfócitos T virgens se ativem e diferenciem em células maduras. As diferenças na natureza desse processo de ativação dão origem a distintas formas de diferenciação celular aumentando ainda mais o repertório de células T maduras.

1.3.1) Linfócito T $\gamma\delta$

As células T do tipo $\gamma\delta$ correspondem de 0,5 a 10% dos linfócitos T encontrados no sangue periférico, mas constituem a maior parte dos linfócitos T em tecidos epiteliais de órgãos como a pele, pulmões e intestinos (14,15). O número de antígenos que podem ser reconhecidos por linfócitos T $\gamma\delta$ é reduzido quando comparado às possibilidades de reconhecimento pelas células T $\alpha\beta$. O TCR $\gamma\delta$ possui afinidade por padrões moleculares específicos como antígenos prenilícos fosforilados, lipídios apresentados por proteínas da família CD1 e moléculas de estresse celular que podem indicar dano ao DNA, infecção viral ou transformação maligna (15). Desta forma, os linfócitos T $\gamma\delta$ podem ser considerados como parte da resposta imune inata especializada em reconhecer células que estão em condição de estresse por infecção ou neoplasia (14). Este tipo de linfócito também pode detectar fosfoantígenos presentes na superfície de bactérias e induzir sua lise (15). As células T $\gamma\delta$ também são ativadas durante o processo de combate a infecções causadas por protozoários (14).

Para a devida ativação dos linfócitos T $\gamma\delta$ é necessário a coestimulação de moléculas independentes do TCR, como a integrina LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) e CD2, que são os receptores para as moléculas de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (CD54) e LFA-3 (CD58), respectivamente. O homodímero α - α da proteína CD8 também é um importante receptor para a interação do linfócito T $\gamma\delta$ com células infectadas por vírus (15).

1.3.2) Linfócito T $\alpha\beta$

As células T $\alpha\beta$ constituem o “centro de processamento de dados” da imunidade adaptativa e essencial indutor das células fagocíticas. São capazes de aumentar a resposta imune e ao mesmo tempo impedir que o corpo reaja contra moléculas próprias ou de forma exacerbada a ponto de gerar malefícios para a saúde. Estes linfócitos também são capazes de induzir a apoptose ou lise de células com padrões de moléculas de superfície estranhos ao corpo.

O TCR $\alpha\beta$ consegue reconhecer apenas antígenos que estejam associados a moléculas de MHC (*major histocompatibility complex*) e apresentados na superfície da célula apresentadora de antígenos. Para que ocorra a devida interação do TCR com a molécula de MHC, é necessário a presença das glicoproteínas CD4 ou CD8. Estas moléculas atuam como correceptores e se ligam ao MHC por um sítio diferente ao reconhecido pelo TCR. Os linfócitos T $\alpha\beta$ podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com a presença destes correceptores. As células T que expressam CD8 são capazes de reconhecer antígenos apresentados via MHC de classe I (MHC-I) e as que possuem o correceptor CD4 são capazes de reconhecer antígenos apresentados via MHC de classe II (MHC-II) (16,17). Dentro de cada um desses grandes grupos existem subpopulações de linfócitos efetores, reguladores ou de memória.

As células efectoras exercem seu papel e entram em apoptose após eliminação do agente que originou a resposta imune. As células de memória podem perdurar por anos, ou mesmo toda a vida, e são mais rápidas que as células imaturas para estabelecerem uma resposta imune. Algumas células T efectoras podem se tornar células de memória após o término do processo inflamatório (17).

1.3.2.1) Linfócito T citotóxico

As células T CD8 efectoras são denominadas funcionalmente de linfócitos T citotóxicos e induzem a morte celular ou lise das células que apresentam, via MHC-I, peptídeos alterados devido a mutações no seu DNA ou provenientes de patógenos intracelulares. Todas as células nucleadas do corpo enviam constantemente para a membrana plasmática fragmentos peptídicos de proteínas degradadas pela via ubiquitina-proteassoma. Os peptídeos resultantes da ação do proteassoma são importados do citosol para o retículo endoplasmático rugoso pelas proteínas TAP (*transporter associated with antigen processing*). Dentro do retículo, os fragmentos proteicos são associados a moléculas MHC-I recém-formadas e transportados até a membrana via retículo de Golgi (19). Os linfócitos T citotóxicos estão constantemente monitorando estes

fragmentos apresentados e se ativam caso seu TCR possua alta afinidade pelo complexo peptídeo-MHC.

Caso haja ativação, o linfócito T citotóxico exocita em direção à célula alvo, nas regiões de interação sináptica, os grânulos citolíticos contendo moléculas como perforina, granzima e granulísina. As perforinas são capazes de se ligar à membrana plasmática e torná-la permeável às moléculas de granzima e granulísina. A granzima possui atividade de serino-protease e, uma vez no citoplasma da célula alvo, pode ativar a via das caspases e induzir o processo de apoptose. A granulísina em altas concentrações, na ordem de micromolar, pode perturbar estruturas lipídicas causando danos na membrana celular, lipossomos e mitocôndria; esta molécula também pode interagir com a caspase 9 e o processo de apoptose. Em baixas concentrações, na ordem de 10 nanomolar, a granulísina atua como um potente atrator e ativador de células do sistema imune como monócitos, células dendríticas, NK e T (20).

A liberação de grânulos de perforina, granzima e granulísina também é o mecanismo utilizado pelas células NK para eliminar células que não possuem moléculas de MHC-I em sua superfície. A molécula de MHC-I tem ação inibitória sobre as células NK, o que garante a sobrevivência das células saudáveis e com a habilidade de apresentar antígenos via MHC-I (17).

1.3.2.2) Linfócito T auxiliar

As células T helper CD4⁺ (Th) são centrais para a homeostasia e orquestram a imunoproteção do hospedeiro, embora estejam também diretamente implicadas no desenvolvimento de diversos eventos de imunodesregulação, como nas doenças autoimunes. Essa classe de linfócitos pode ser subdividida em subpopulações com capacidade de secretar diferentes moléculas imunomoduladoras, e dentre as principais estão as assim definidas células Th1, Th2, Th17, Th22, Th9 e Tfh (*T helper follicular*). Particularmente, as células efetoras Th1, Th2 e Th17 têm ação efetora direta nos eventos de resposta a patógenos e tumores e de imunodesregulação, enquanto células Tfh contribuem para a montagem da resposta humoral efetora e as células Treg e Tr1 são importantes para a atividade anti-inflamatória e para a manutenção do estado de tolerância imunológica (21).

Essas subpopulações surgem a partir da diferenciação de linfócitos T CD4 virgens que podem receber diferentes estímulos das células apresentadoras de antígeno (APC) durante o processo de ativação dentro dos órgãos linfoides secundários. Fatores transcricionais e citocinas efetoras estão imbricadas na geração e atividade dessas células Th, mas outros fatores também exercem papel preponderante nas suas vias de diferenciação, tais como o seu estado

metabólico, a presença de microbiota e outros componentes do microambiente tecidual particular de ação dessas células (21).

As APC profissionais, células dendríticas e macrófagos, são capazes de fagocitar células ou partículas e apresentar os antígenos provenientes do fagolisossoma através de moléculas de MHC-II. Essas células fazem a fagocitose no local onde ocorre a inflamação e migram até os órgãos linfoides secundários, onde apresentam os antígenos a células T CD4 virgens. O contexto no qual ocorre a apresentação do antígeno é crucial para determinar o desenvolvimento do subtipo de célula T CD4 efetora. Essa fase de diferenciação final de uma célula T pode ser referida como polarização e é dividida em três etapas: indução, comprometimento e amplificação. Na fase de indução, a célula T recebe sinais da APC via TCR (apresentação do antígeno) e coestimuladores resultando na expressão de genes de citocinas que são específicos de cada grupo. À medida que as células T de um determinado nicho passam a receber estímulo constantes para se diferenciarem em um subtipo, elas entram na fase de comprometimento e sofrem alterações epigenéticas que moldam seu genoma, passando a expressar majoritariamente as citocinas relativas ao subgrupo específico. Por último, as células já comprometidas vão construindo a fase de amplificação, na qual suas citocinas estimulam a diferenciação das demais células T virgens no seu subtipo e inibem a diferenciação em outros subtipos.

As células T auxiliares do tipo Th1 são responsáveis, particularmente, por promover a resposta imune contra vírus e outros patógenos intracelulares, assim como a imunidade antitumoral. Através da liberação de INF- γ em grandes quantidades, estas células são capazes de ativar macrófagos e induzir as células B a produzirem anticorpos que facilitam a opsonização e fixação do complemento. As células Th1 também podem secretar outras citocinas, como por exemplo o TNF e a quimiocina CXCL10, contribuindo para recrutar mais leucócitos e ampliar o processo inflamatório. Os sinais iniciais para a diferenciação em células Th1 são mediados pelo estímulo do TCR e pela interação da citocina IL-12 com seu receptor em presença de INF- γ . A sinalização pelo TCR e pela IL-12 levam à ativação da via JAK/STAT, induzem a expressão do gene *Tbx21* (que codifica o T-bet, o fator de transcrição principal para a diferenciação em Th1) e a consequente produção de IFN- γ . A IL-12 induz a ativação de STAT4 e o INF- γ promove a atividade de STAT1, convergindo sinergicamente no aumento da expressão de T-bet, que por sua vez aumenta a expressão INF- γ , contribuindo para uma retroalimentação positiva da diferenciação Th1 (22) Dessa forma, o programa transcricional das células Th1 é estabelecido pela regulação integrada dos fatores de transcrição T-bet,

STAT4 e STAT1, além da participação de Runx3. É importante ressaltar que, paralelamente, essa programação transcricional inibe diferenciação das células Th2, através do silenciamento da expressão de IL-4 e Gata3 (21).

As células Th2 são responsáveis por promover a defesa contra helmintos que produzem uma leve e contínua estimulação do sistema imune. A resposta por linfócitos Th2 também pode ser ativada por uma vasta quantidade de alérgenos. O sinal necessário para induzir a polarização para Th2 é a IL-4 produzida por diversas células do sistema imune inato, que age sobre o linfócito T *naive*, levando à sua diferenciação. As primeiras células T a produzirem IL-4 são estimuladas através da via de Notch pelo contato com células dendríticas que expressam o ligante JAG1 (Jagged-1). No tubo digestivo de animais infestados por vermes, uma fonte alternativa inicial para IL-4 pode ser células com o fenótipo não-T, não-B, kit1⁺, FcεR1⁺ estimuladas por IL-25 produzida por macrófagos ou mastócitos (22).

O principal papel de células Th17 é o combate a patógenos como fungos e bactérias extracelulares por recrutamento e ativação de neutrófilos, podendo estar associada à indução de inflamação monocítica. Mas é preciso ressaltar que as células Th17 têm papel importante na homeostasia de tecidos epiteliais, particularmente em regiões de mucosa, além de apresentar relevante ação imunopatogênica em vários processos de inflamação tecidual desregulada. Assim, postula-se a existência de duas subpopulações de células Th17: uma não patogênica, que regula a função de barreira e controle de potencial invasor da microbiota; outra patogênica, que promove a inflamação tecidual e a autoimunidade (21). Essa diversidade funcional pode ser observada pela diferenciação *in vitro* seguida de transferência adotiva das células Th17, sendo as não patogênicas polarizadas com TGF-β1+IL-6 e as patogênicas polarizadas com IL-1β+IL-6+IL-23. Além disso, essas células podem ser distinguidas por assinaturas transcricionais, onde as células Th17 patogênicas co-expressam T-bet/IFN-γ e GM-CSF, enquanto as células Th17 não patogênicas expressam IL-10 e IL-1RN (23).

1.4) A migração celular no desenvolvimento de linfócitos T

A jornada de desenvolvimento de uma célula T começa na medula óssea ou no fígado fetal quando uma célula progenitora pré-tímica expressando o receptor CD117 (c-KIT) inicia seu processo de migração até o timo (**Figura 2**). Após chegarem no timo, as células precursoras se convertem em células progenitoras tímicas e passam por uma fase de multiplicação que é fundamental para manter o número adequado de timócitos (24). A grande maioria das células T em desenvolvimento é eliminada durante os processos seletivos intratímicos. Assim, as fases

de multiplicação são essenciais em diversos estágios da diferenciação da célula T, com um conjunto de fatores transcricionais regulando outros inúmeros fatores intratímicos que irão, por fim, definir a identidade da linhagem de células T e suas subpopulações (25).

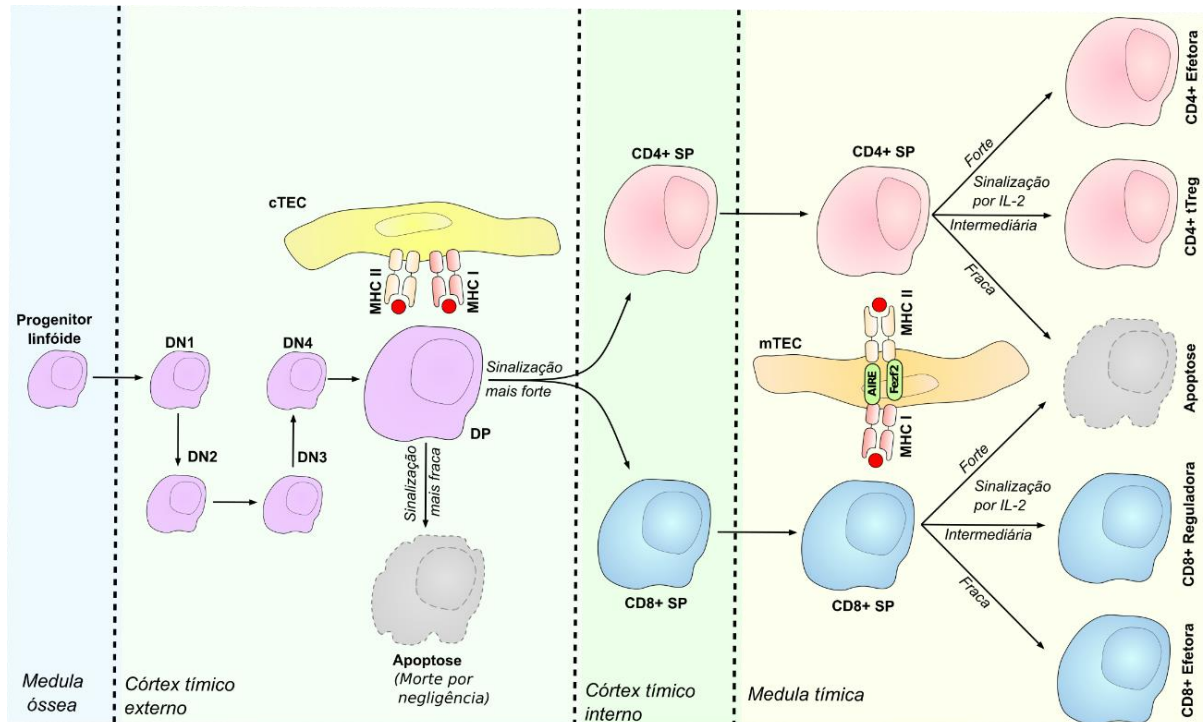


Figura 2) Esquema¹ de desenvolvimento de células T

1 – A ilustração foi adaptada do artigo *Thymocyte* publicado na enciclopédia online Wikipedia e acessado em julho de 2019 (<https://en.wikipedia.org/wiki/Thymocyte>).

As células progenitoras tímicas se convertem em tímócitos duplo-negativos (DN), com expressão ausente das glicoproteínas CD4 e CD8. Os tímócitos DN podem ser divididos em 4 tipos denominados DN1, DN2, DN3 e DN4, que ocorrem no córtex tímico. Durante os primeiros estágios de diferenciação, o evento central se refere aos rearranjos dos genes *Trb*, *Trg* e *Trd* do receptor de células T (TCR). Na fase de célula pré-T (DN3), ocorre a recombinação da cadeia β do TCR que unida a uma cadeia α substituta e invariável forma o pré-TCR, essencial na seleção das células com capacidade de expressar uma cadeia β completa. Aquelas células cujo o processo de recombinação gerou uma quebra da janela de leitura, impossibilitando a produção de uma proteína β completa, são eliminadas por apoptose, e paralelamente uma maior força de sinalização do TCR direciona os tímócitos para células T $\gamma\delta$ (26). Já a seleção bem-sucedida da cadeia β leva à transição da fase DN3 para a fase DN4 e desencadeia uma sequência significativa de rodadas de proliferação.

Conforme estes timócitos iniciam a recombinação do TCR α e aumentam a expressão dos co-receptores CD4 e CD8, tornando-se células duplo-positivas (DP), dois eventos celulares relevantes ocorrem: a seleção positiva de timócitos e a migração direcional para a medula tímica (27). Os co-receptores CD4 e CD8 dos timócitos DP reconhecem, respectivamente, os complexos de MHC-II e MHC-I associados a peptídeos. Aqueles que apresentarem baixa afinidade contra antígenos próprios apresentados pelas TEC corticais (cTEC) são selecionados positivamente e originam, respectivamente, células T CD4⁺ e CD8⁺ simples-positivas (SP). A migração contínua em direção à medula permite o encontro com TEC medulares (mTEC), além de células dendríticas e macrófagos, que facilitarão a seleção negativa dos timócitos que exibirem alta afinidade para os complexos MHC-peptídeos próprios, resultando em eliminação celular medida pela estimulação excessiva do TCR (25). É importante ressaltar que, nessa última etapa seletiva, as células T reguladoras tímicas são selecionadas positivamente (28,29).

Toda essa capacidade de diferenciação intratímica de progenitores hematopoiéticos é impactada pelo fato de o timo não conter células-tronco ou células progenitoras auto-renováveis de longa duração. Embora haja evidências de que timos de camundongos neonatos (transplantados em animais com precursores hematopoiéticos da medula óssea irresponsivos à IL-7) sejam capazes de manter a diferenciação intratímica por períodos prolongados (30,31), o timo pós-natal parece depender fortemente do recrutamento semicontínuo de progenitores provindos da circulação sanguínea (32).

A entrada no órgão ocorre a partir da produção de quimiocinas por células endoteliais e pelas TEC presentes na junção córtico-medular e com a adesão ao endotélio mediada por P-selectina e por ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (33). Subsequentemente à entrada no timo, os progenitores hematopoiéticos multipotentes dependem diretamente dos múltiplos sinais específicos provenientes do microambiente tímico (7) que permitem o comprometimento com a linhagem linfóide de células T. Nesse contexto, o conjunto de relevantes eventos interativos entre as células T em desenvolvimento e as células do microambiente tímico está intimamente relacionado aos concomitantes processos de proliferação assíncrona e de migração intratímica desses timócitos. A resposta desses timócitos aos sinais indutores de adesão e motilidade parecem ser o evento crítico na orquestração do tráfego celular entre os distintos microambientes tímicos (7,34). Esses sinais parecem interferir diretamente nos estágios de desenvolvimento de células T, com papel no controle das adequadas interações espaciais e temporais entre o TCR dos timócitos e os complexos MHC-peptídeos apresentados pelas distintas células do microambiente timo (35,36). Dessa forma, a migração de células T em

desenvolvimento no timo é central para a regulação dos processos seletivos intratímicos, contribuindo diretamente para o paradigma de formação de um repertório com potencial de resposta a uma ampla gama de antígenos estranhos paralelamente à não-responsividade a antígenos próprios.

1.5) A migração celular na ativação e na resposta efetora de linfócitos T

Padrões adesivos e migratórios têm sido amplamente estudados nos processos de ativação de células T e na consequente efetuação da resposta imune efetora. Por exemplo, uma condição fundamental para a montagem de resposta imune protetora é a rapidez no reconhecimento de perigos antigênicos, de forma a eliminar patógenos e células tumorais eficientemente. Assim, a ativação da célula T requer um monitoramento rápido do maior número possível de APC (fenômeno definido como *T-cell scanning*), mas com uma regulação fina entre os processos de velocidade da motilidade celular e a permanência de contato íntimo com APC em determinado tecido por tempo suficiente para que a interação TCR/-MHC-peptídeo seja eficaz (37). Nesse contexto, estudos de imageamento por microscopia também revelam a participação de moléculas de adesão, quimiocinas e outros fatores inflamatórios na dinâmica de motilidade de células T na interação com células endoteliais, regulando o tráfego para diversos compartimentos teciduais periféricos, assim como na interação inicial com APC (38,39). Nesses eventos, a regulação da remodelagem do citoesqueleto de actina parece ser um mecanismo central na indução da migração transendotelial das células T e na subsequente interação com a rede de matriz extracelular (ECM) e células-alvo no sítio de resposta efetora (40).

Um dos mais relevantes exemplos da importância da adesão celular e da migração de células do sistema imune para uma resposta imunoprotetora eficiente envolve o extravasamento da circulação sanguínea em direção ao local da resposta efetora, em um sítio infeccioso ou tumorigênico. Esse processo tem início a partir da ativação local do endotélio mediada pela produção de citocinas pelo tecido inflamado. O endotélio ativado passa a expressar significativamente as moléculas de adesão E- e P-selectina, que medeiam o rolamento inicial e diminuem a velocidade dos leucócitos. Isso permite que, subsequentemente, moléculas de adesão do tipo integrinas, particularmente o LFA-1 e o VLA-4 (com alta expressão na superfície das células T ativadas), possam interagir respectivamente com as moléculas ICAM-1 e VCAM-1 presentes no endotélio, e então mediar uma forte adesão entre esses diferentes tipos celulares (41). Assim, a adesão célula-célula é um pré-requisito essencial para que os

leucócitos (em particular, os linfócitos T) consigam abandonar a circulação sanguínea e migrar pela matriz extracelular no tecido que abriga o estímulo inflamatório.

É importante salientar que os mecanismos moleculares dos eventos de migração de células efetoras, assim como de células reguladoras, também ocorrem em resposta a outros eventos inflamatórios, como em respostas autoimunes, alérgicas e rejeição a transplantes. Alterações no nível de expressão ou ativação das integrinas podem levar tanto a fenótipos de autoimunidade como de imunodeficiência. De fato, a relevância desses processos pode ser vislumbrada pelo fato de as integrinas compreenderem alvos moleculares centrais na terapêutica de diversas condições clínicas inflamatórias (42).

1.6) Integrinas

1.6.1) História e função das integrinas

As integrinas foram descobertas durante a década de 1970 enquanto pesquisadores buscavam por proteínas transmembranares envolvidas no controle de crescimento celular. Logo no início da caracterização dessa classe de moléculas, foi evidenciada a sua importância para os processos biológicos de adesão, morfologia e motilidade celular. Entretanto, somente anos mais tarde ficou claro que essas proteínas interagem com fibronectina e também possuíam um importante papel no controle da proliferação e morte celular. Já nos anos 70, foi cunhado o conceito de que deveriam existir proteínas de membrana integrando a organização dos filamentos extracelulares de fibronectina com a estrutura dos filamentos intracelulares de actina. Somente em meados da década de 1980 é que as integrinas foram responsabilizadas por tal mecanismo de ajuste entre o citoesqueleto e a ECM. Com a descoberta de um receptor de fibronectina. O nome integrina foi dado a esta família de proteínas justamente pela a capacidade de “integrar” o meio extracelular e intracelular (43).

Com o avanço da obtenção de sequências genômicas verificou-se que as integrinas são encontradas em todos metazoários e apenas neste filo. Este fato levou à hipótese de que as integrinas são necessárias para a organização de tecidos e órgãos e que seu aparecimento antecede a explosão cambriana. Um processo de evolução divergente gerou em vertebrados 18 subunidades α e 8 subunidades β . Essas subunidades podem combinar-se em 24 heterodímeros que possuem afinidade a mais de um ligante, assim como, alguns ligantes podem ligar-se a mais de uma integrina (**Figura 3**) (43).

Atualmente, é sabido que as integrinas estão envolvidas em adesão célula-célula e célula-ECM, além de atuarem na transdução de sinais importante para processos biológicos como sobrevivência celular, diferenciação, organogênese e cicatrização. Mutações em

integrinas ou em importantes componentes da sua via de sinalização podem acarretar em problemas como desenvolvimento de órgãos defeituosos, imunodeficiência, câncer e doenças autoimunes (44).

Como apresentado anteriormente, as integrinas são fundamentais para a formação da sinapse imunológica e estabilização do contato da célula T com a célula apresentadora de antígeno facilitando os processos de ativação, proliferação e secreção de citocinas como, por exemplo, IL-2 e INF- γ (44). Já para a motilidade das células T após saírem do timo, as integrinas LFA-1 e VLA-4 são cruciais para o processo de adesão às células endoteliais e migração contra o fluxo sanguíneo até chegarem ao ponto apropriado para as células T fazerem diapedese (45,46).

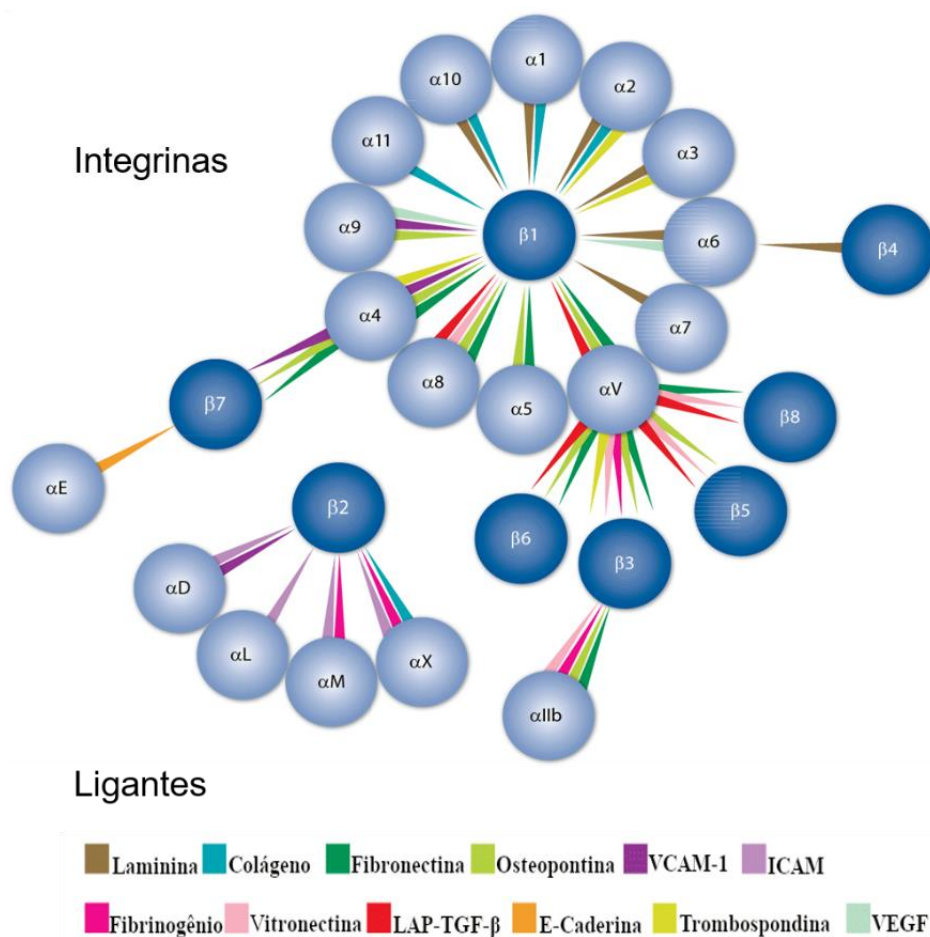


Figura 3) Famílias das α e β integrinas e suas possíveis interações proteína-proteína

Fonte: https://resources.rndsystems.com/images/site/bb_spring07_17wide_2360.png

1.6.2) Estrutura e sinalização das integrinas

A sinalização mediada por integrinas ocorre por intermédio de alterações alostéricas capazes de recrutar e ativar proteínas citoplasmáticas, além de aumentar a afinidade da integrina

pelo seu ligante. As fitas α e β possuem uma longa cadeia para fora da célula, que se dobra na direção da membrana plasmática quando a integrina está no estado inativo. A ponta desse ectodomínio, denominada de cabeça e responsável pela afinidade ao ligante, é mantida próxima à membrana celular quando a integrina está no estado inativo. Uma ponte salina entre os domínios intracelulares das fitas α e β ajuda na estabilização da conformação inativa (47).

Durante a ativação, o ectodomínio passa por um processo denominado de extensão, a cabeça é desprotegida e a afinidade pelo ligante aumenta (**Figura 4**) (44). Nesse momento, as curtas caldas intracelulares das fitas α e β se distanciam, a ponte salina é desfeita e uma molécula de talina se liga no domínio intracelular da fita β ajudando na estabilização da conformação ativada (47,48). Os domínios transmembranares funcionam como condutores das transformações conformacionais entre as regiões intracelulares e extracelulares de cada fita. Dessa forma, as modificações alostéricas iniciadas em qualquer uma das duas porções das fitas α e β são transmitidas através da membrana possibilitando a condução de sinais (48).

À medida que as moléculas de integrinas vão se ativando, ocorre um processo chamado de clusterização com formação de complexos de adesão de integrinas. Nestes complexos, alguns milhares de moléculas de integrinas se aglomeram em uma pequena região da membrana celular aumentando a sua capacidade adesiva e sinalizadora (49). O processo de ativação da integrina pode ocorrer de dentro da célula para fora (*inside-out*), por meio de uma cascata de sinalização que se inicia em um receptor celular de outra natureza, ou de fora para dentro (*outside-in*), através do estímulo do ligante direto sobre a integrina (44).

A ativação de dentro para fora em linfócitos T se inicia pela indução de receptores de quimiocinas ou por estímulo direto sobre o TCR. Esse processo foi extensamente estudado com a ativação de LFA-1 na fenda sináptica durante o cometimento da célula T com a ativação via TCR. Quando o linfócito é estimulado pelo complexo MHC-peptídeo presente na célula apresentadora de antígeno, LCK (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) é ativada por fosforilação e, por conseguinte, atua sobre ZAP70 (*ζ chain of T cell receptor associated protein kinase 70*) promovendo sua ativação também por fosforilação. ZAP70 pode fosforilar e ativar diversas proteínas envolvidas no processo de ativação da célula T, incluindo LAT (*linker for activation of T cells*) e SLP-76 (*src homology 2 domain-containing leucocyte protein of molecular weight 76.000*) (44). Em células Jurkat, a perda de função de LCK, ZAP70 ou LAT impossibilita a ativação *inside-out* demonstrando a importância destes genes para este processo (50,51).

SLP-76 é uma importante proteína adaptadora capaz de ligar-se a Vav, Nck, Itk, Ick, PLC γ 1, Gads, ADAP, HPK-1 e que foi isolada em 1995 por uma estratégia com o objetivo de

encontrar proteínas fosforiladas após a ativação via TCR (52) (**Figura 4**). Camundongos deficientes em SLP-76 apresentam problemas no desenvolvimento de células T e insuficiência na ativação de integrinas, tanto *inside-out* como *outside-in* (53). O estudo de camundongos com mutações em diferentes regiões de SLP-76 demonstrou a importância dessa proteína em eventos de sinalização durante a maturação dos tímócitos. Mutagêneses em diferentes pontos dessa proteína podem gerar aumento ou diminuição da expressão de TCR β e CD69 nos tímócitos transgênicos, em comparação com os WT (54). Estes estudos de mutagêneses pontuais também revelaram uma importante relação estrutural entre os domínios de SLP-76, pois o comprometimento da sequência em uma região conhecida por ligar-se a uma proteína específica pode interferir na estabilização de proteínas que se ligam a outras partes da molécula (44).

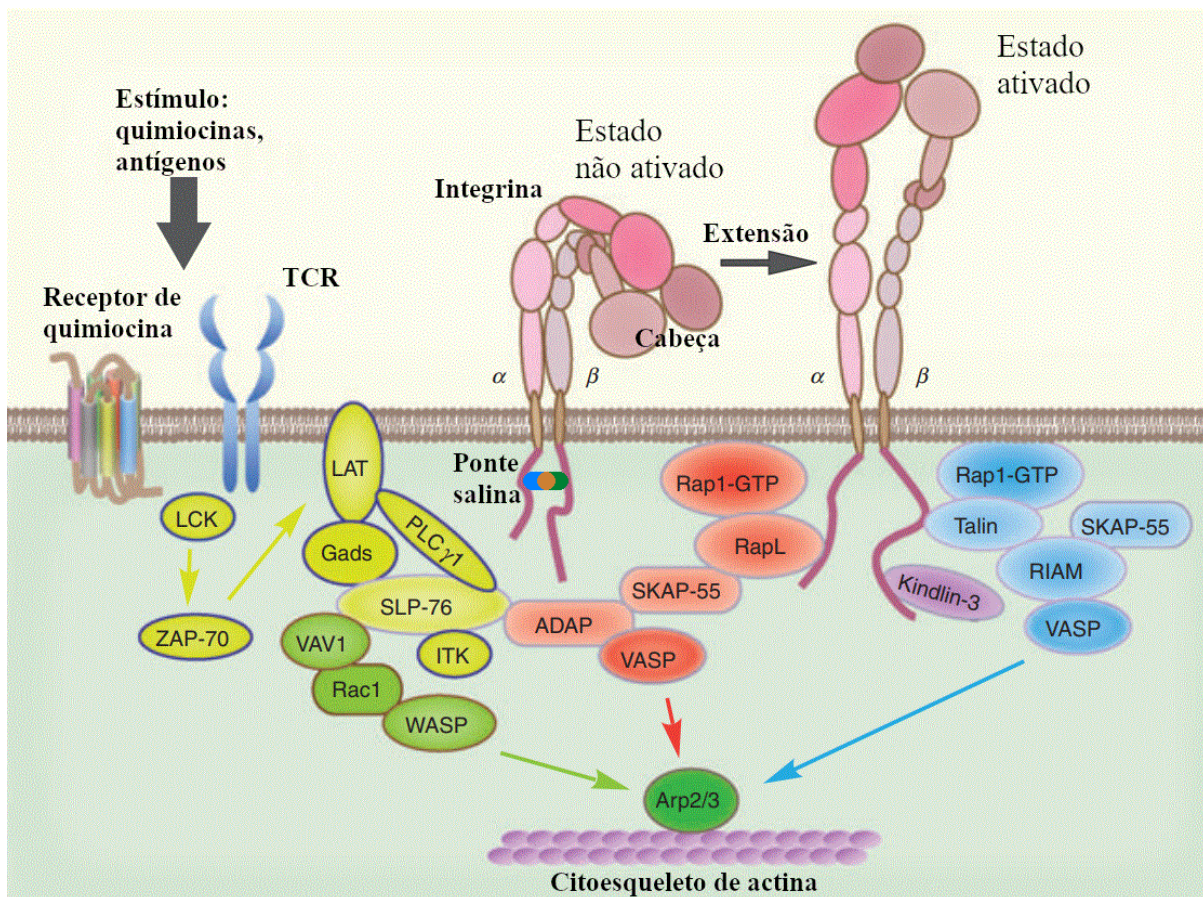


Figura 4) Esquema mostrando a estrutura das moléculas de integrina e a organização de outras proteínas importantes para sua ativação e sinalização.

Adaptado de Zhang *et al* 2012 (44).

A associação de SLP-76 a ADAP, após fosforilação de ambas, possibilita a formação de um complexo fundamental para a ativação de integrinas, ativação da célula T e motilidade

(44). Estudos com perda de função de ADAP em camundongos demonstraram que sem essa proteína as células T possuem problemas na produção de CD25, CD69 e IL-2 após a estimulação via TCR. A ativação *inside-out* de LFA-1 e VLA-4 via TCR é impedida na ausência de ADAP (52). Por outro lado, a coestimulação de LFA-1 para a produção de IL-2 após a indução do TCR com anti-CD3 é impedida na ausência da ligação de SLP-76 à ADAP, demonstrando a importância da formação desse complexo para a sinalização *outside-in*. A remoção de ADAP reduziu a motilidade de células T e reduziu a clusterização de F-actina frente à estimulação de LFA-1 com ICAM-1. A associação de SLP-76 a ADAP também se mostrou importante para a polarização de linfócitos T induzida por LFA-1 (55).

No sentido *outside-in*, o complexo SLP-76-ADAP pode sinalizar independentemente do complexo LAT–Gads. Para este sentido da sinalização, a ligação de ADAP a SKAP-55 (*src kinase-associated protein of molecular weight 55.000* ou SKAP1) é imprescindível. A deleção do domínio SH3 de SKAP-55, responsável pela interação com ADAP, impede a adesão mediada por LFA-1 e impossibilita a formação dos conjugados da célula T com a célula apresentadora de antígenos (44). ADAP e SKAP-55 interagem com a calda intracelular da fita α da integrina através do complexo Rap1–RapL, que se forma na presença de GTP após a estimulação do TCR (44,56) (**Figura 4**). A ligação SKAP-55 a RapL também é crucial para a sinalização *inside-out* e a perturbação desse complexo, por mutações na região N-terminal de SKAP-55, impede a ativação de LFA-1 mediada por estímulo sobre o TCR e gera redução temporal nas interações celulares dentro dos linfonodos (57).

Recentemente, verificou-se que SKAP55 pode ligar-se a LAT por intermédio de GRB2. Após a estimulação de LFA-1, FAK1 e FAK2 são recrutadas e fosforilam LAT exclusivamente na lisina 171, possibilitando a formação do complexo LAT–GRB2–SKAP-55. Esse processo é mais um elo de ligação na coestimulação da sinalização de LFA-1 sobre a via do TCR (58).

Outro importante complexo proteico para a função das integrinas é formado ao redor da molécula de talina quando esta está ligada à fita β através do sítio NXXY proximal a membrana. Talina também se liga aos filamentos de actina e atua como um componente-chave na interação do citoesqueleto com a matriz extracelular. A ligação de talina à integrina é estabilizada pela presença de FERMT3 (*fermitin family homolog 3* ou *kindlin 3*) que se liga à fita β pelo sítio NXXY distal a membrana (44).

1.7) Importância das integrinas em processos biológicos envolvendo células T maduras

Após a saída do timo as células T precisam chegar até os órgãos linfóides secundários onde se ativam após o reconhecimento de um peptídeo apresentado na superfície de uma APC.

Durante essa jornada as integrinas LFA-1 e VLA-4 são de suma importância para os processos de diapedese (**Figura 5**) e interação do linfócito T com a APC (**Figura 6**).

Durante muitos anos foi controversa a importância das integrinas para o processo de migração de uma célula T após sua saída do vaso sanguíneo até a chegada nos linfonodos. Em 2008, foi demonstrado que leucócitos podem migrar por tecidos periféricos e vasos linfáticos sem a presença de integrinas através de protusões do citoesqueleto de actina (59). A partir desse momento, ficou mais claro que as células do sistema imune podem migrar por dentro dos tecidos de forma independente da ação das integrinas, porém estas proteínas são cruciais para a saída dos linfócitos de dentro dos vasos sanguíneos e para o reconhecimento de peptídeos exógenos na superfície de APC.

1.7.1) A importância de integrinas para o processo de diapedese

Por meio da ligação a selectinas, as células T fazem uma adesão leve à superfície dos vasos sanguíneos e iniciam um processo de rolamento que permite a detecção de citocinas apresentadas pelas células endoteliais (60) (**Figura 5**). A sinalização dessas citocinas é capaz de iniciar a ativação *inside-out* das integrinas LFA-1 e VLA-4, que se ligam respectivamente a ICAM-1 e VCAM-1 nas células do endotélio ativado. Essa interação mediada por integrinas é mais forte e permite que a células T se fixem à parede do vaso sanguíneo e migrem para o tecido alvo. Ao estabelecerem uma firme adesão, os linfócitos podem entrar em contato com citocinas presentes em regiões basolaterais e intracelulares das células endoteliais, o que induz o processo de diapedese no tecido inflamado (61).

Uma vez tendo atingido uma firme adesão ao endotélio, as células T tendem a migrar contra o fluxo sanguíneo até encontrarem os sinais adequados que a induzem a atravessar o vaso do sítio de resposta efetora. Essa migração contra fluxo é estimulada pela interação de LFA-1 com ICAM-1 via mecanismos intracelulares que diferem da cascata de sinalização induzida por VLA-4 (62). Os linfócitos nocautes para o gene *Crk* (*CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein*) perdem a capacidade de engajamento na motilidade contra fluxo com perda da ativação da via PI3K e da ativação da proteína ubiquitina ligase cCbl. Já os linfócitos WT estimulados apenas com VCAM-1 apresentam menor fosforilação de AKT e cCbl, possuem o mesmo formato dos linfócitos nocautes para o gene *Crk* e não são capazes de realizar migração contra fluxo (62).

Atualmente, apesar de o LFA-1 ser apontado como o principal responsável pela adesão firme e migração contra fluxo, VLA-4 é visto como um coparticipante da adesão firme e rolamento através da sua interação com VCAM-1. Somado a isso, VLA-4 também interage

com JAM-B (*Junctional adhesion molecule B*) na superfície das células endoteliais contribuindo para os processos de rolamento, adesão e diapedese (63). Somado a esse complexo sistema de interações de integrinas com moléculas expostas por células endoteliais, podemos citar JAM-A, que é realocada para a superfície do vaso sanguíneo durante o processo inflamatório e contribui para o recrutamento de leucócitos por interação com LFA-1 (64).

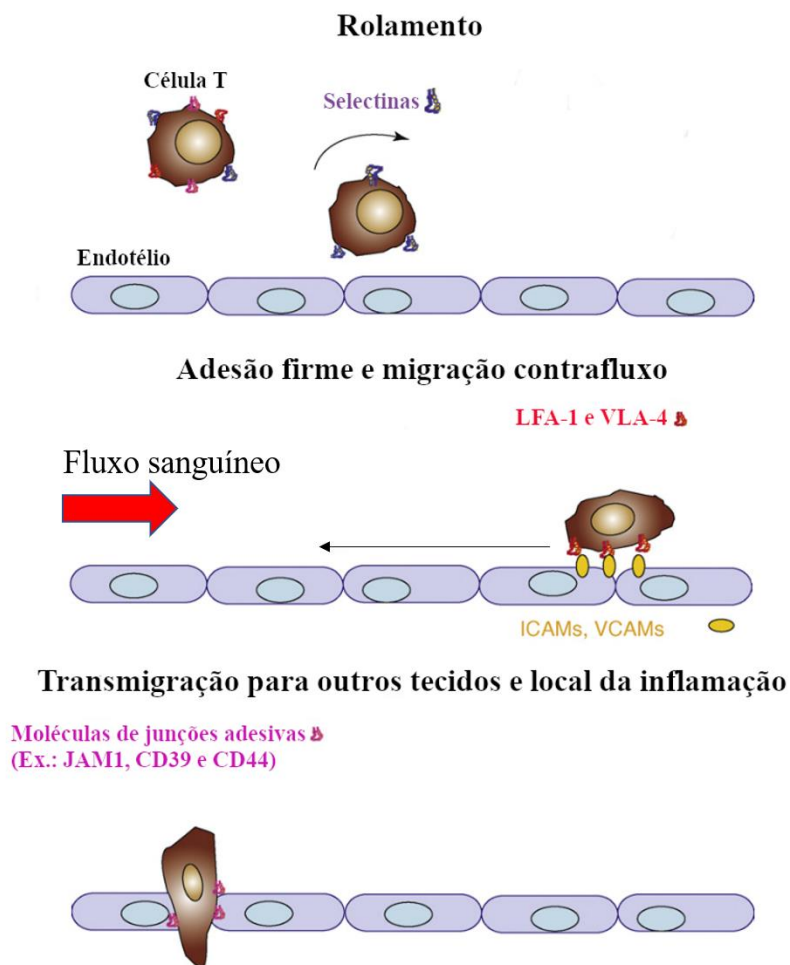


Figura 5) Principais etapas do processo de migração de um linfócito circulante para o tecido inflamado

Imagem adaptada do trabalho de Wang e Rudd, 2008 (65).

1.7.2) A importância de integrinas na formação da sinapse imunológica

O processo de análise realizado por uma célula T no peptídeo apresentado através de uma molécula de MHC ocorre dentro de uma zona específica da superfície celular chamada de sinapse imunológica. Este local de contato é dinâmico e controlado por contínuos eventos de remodelamento do citoesqueleto associados a sinalização por LFA-1 (66). Já em meados dos anos 80, foi observado que a interação entre a célula T e uma APC ocorria por uma região específica da membrana onde havia acúmulo do TCR e moléculas acessórias. Entretanto, somente no final dos anos 90, a sinapse imunológica foi definida como uma estrutura celular especializada na apresentação de antígenos e com características específicas de adesão, sinalização, composição e cinética, todas guiadas e mantidas pelo processo de ativação da célula T (67).

Dentro da sinapse imunológica há subdivisões espaciais que delimitam regiões especializadas com diferenças de composição e função (**Figura 6**). Essa disposição já foi comparada à aparência de um “olho de boi” com estruturas concêntricas chamadas de SMAC (*supramolecular activation clusters*). A apresentação do antígeno propriamente dita ocorre na região central ou cSMAC (*central SMAC*) que é especializada no processo de sinalização e onde concentram-se as moléculas do TCR e seus correceptores. Esta zona é cercada por uma região especializada na ligação célula-célula, chamada pSMAC (*peripheral SMAC*), onde concentram-se moléculas de adesão e LFA-1. Na região mais periférica existe um denso anel de filamento de actina que constitui a região denominada de dSMAC (*distal SMAC*) (66).

Embora os dados sobre a participação do VLA-4 na formação da sinapse imunológica não estar bem elucidada como a função da $\beta 2$ integrina LFA-1, aquela molécula parece modular o processo interativo de células T com APCs. O uso *in vitro* de anticorpos dirigidos contra diferentes epítopos da cadeia $\alpha 4$ em ensaios de conjugação de células T com APCs levaram à alteração do posicionamento de VLA-4, que deixa a colocalização com LFA-1 no pSMAC e passa a estar associado à cadeia CD3- ζ no cluster central da sinapse imunológica (cSMAC). Além disso, essa conjugação *in vitro* em presença de anti- $\alpha 4$, associado à ativação com anti-CD3 e anti-CD28, resultou em polarização Th1 (68).

1.8) A integrina VLA-4

A integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ ou CD49d/CD29) apresenta uma extensa distribuição tecidual, sendo expressa em leucócitos e em diversos outros tipos celulares, tais como células do músculo liso (37), mioblastos e miotubos do músculo esquelético (38) e células epiteliais tímicas (39). Contudo, células T e monócitos parecem ser as células com expressão funcional relevante de VLA-4 para a adesão/migração endotelial em eventos inflamatórios (69).

Os principais ligantes dessa integrina na promoção de processos adesivos /migratórios são as moléculas de adesão VCAM-1 e JAM-B (Junctional Adhesion Molecule-B), em nível da interação com células endoteliais, e a molécula de ECM fibronectina, em nível intratecidual (63). Mas, diversos outros ligantes têm sido relatados, tais como ICAM-4 (Intercellular Adhesion Molecule 4), MAd-CAM-1 (Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule 1), ADAM-28 (A Disintegrin And Metalloproteinase-28), trombospondina e osteopontina (69,70).

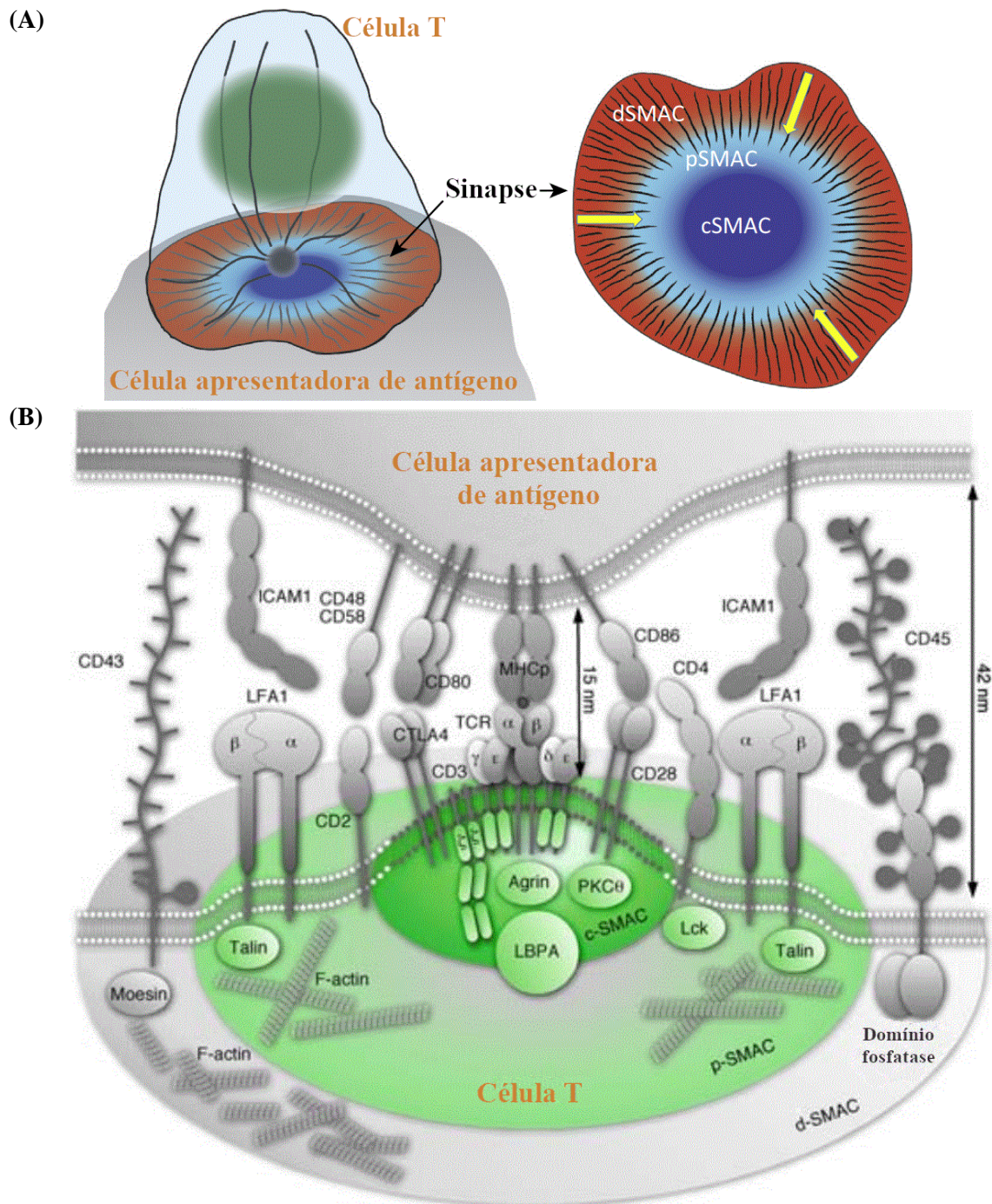


Figura 6) Sinapse imunológica

(A) esquema mostrando as regiões c-SMAC, p-SMAC e d-SMAC¹ (B) esquema mostrando os principais componentes proteicos² envolvidos na sinalização realizada através da sinapse imunológica.

1 – Adaptado do trabalho de Basu e Huse publicado em 2017 (66)

2 – Adaptado do trabalho de Yokosuka e Saito publicado em 2010 (67)

Conforme discutido previamente, a integrina VLA-4 tem papel funcional em processos relevantes na biologia da célula T. Na maturação intratímica, as interações celulares entre os timócitos e componentes microambientais, como as TEC e a ECM, têm a participação respectiva das interações moleculares VLA-4 com VCAM-1 e VLA-4 com fibronectina (71,72). Já na periferia, as células T maduras também empregam interações mediadas por VLA-4 nos processos de ativação pelas APC e na adesão endotelial e transmigração para os sítios de resposta imune efetora (69).

Tendo em vista o grande número de estudos sobre os mecanismos de regulação da expressão e da função de VLA-4 em células T no contexto de eventos inflamatórios no sistema nervoso central, discutiremos as implicações desses mecanismos e a utilização dessa integrina como alvo terapêutico nessa condição patológica.

1.8.1) O papel de VLA-4 e seu bloqueio terapêutico na neuroinflamação

Apesar da chegada de células inflamatórias no sistema nervoso central ser regulada pela barreira hemato-encefálica (73), a neuroinflamação, associada a infecções e doenças autoimunes, é um importante processo patológico. Esse tem sido objeto de estudos experimentais e clínicos relacionados à desordem autoimune denominada esclerose múltipla (EM). Essa é uma desordem neuroinflamatória que ocasiona um quadro desmielinizante progressivo, com participação central de células Th1 e Th17 que invadem o sistema nervoso central, juntamente com células dendríticas e células B, em processo de migração trans-endotelial mediado por VLA-4 (74–76).

Esses dados revelam que a intervenção terapêutica sobre o VLA-4 pode claramente modular a migração de leucócitos durante a progressão da EM. Esse postulado foi demonstrado com o uso de anti-VLA-4 em estudos pré-clínicos com a inibição da neuroinflamação e sinais patológicos de desmielinização no modelo de encefalomielite alérgica experimental (EAE) (77). Posteriormente, o bloqueio de lesões neurológicas e da forma remitente-recidivante da EM foi bem-sucedida também em ensaios clínicos com a utilização de natalizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, no tratamento dessa doença (78,79).

O sucesso da imunoterapia anti-VLA-4 foi também testado em outras doenças inflamatórias relevantes, como doença de Crohn e artrite reumatoide, com relativo sucesso. Entretanto, seu uso não é preconizado nessas doenças pela presença de terapias mais eficazes e pelo achado de efeito colateral de desenvolvimento de neuroinfecção oportunista por vírus John-Cunningham, que resulta em quadro de leucoencefalopatia multifocal progressiva. Não

obstante, o tratamento com natalizumabe poderia ser também estendido para doenças onde o custo-benefício fosse relevante. Esse parece ser o caso da distrofia muscular de Duchenne (DMD), uma doença sem tratamento curativo e onde o VLA-4 parece ter papel patológico relevante, com altos níveis da integrina em células T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes correlacionando com a progressão mais rápida da doença (80).

1.8.2) A integrina VLA-4 na modulação funcional de células T

Além do papel central na transmigração endotelial, a integrina VLA-4 parece ser relevante para a organização da sinapse imunológica na interação com APC durante o processo de ativação no órgão linfóide secundário (68). A modulação da imunossinapse pela ativação concomitante do TCR e do VLA-4 (com anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD49d) pode estar associada à indução da polarização *in vitro* para Th1. Mais interessante, essa diferenciação foi também observada com o tratamento *in vivo* com anti- α 4, o que resultou em melhora da glomerulonefrite autoimune experimental de perfil Th2 (68). Já em estudo de inativação condicional da cadeia α 4 de integrinas em células T (Itga4-KO condicional), aplicada ao modelo de EAE, revelou atraso no desenvolvimento da neuroinflamação, e que essa compreendia uma maior frequência de células Th17 em relação a células Th1 (81). Outra abordagem genética similar demonstrou que células T deficientes em α 4 tiveram expressão aumentada de Foxp3 e expressão diminuída dos fatores de transcrição T-bet, Gata3 e ROR γ t, após ativação alorreativa *in vitro*, e com a melhora significativa de doença do enxerto versus hospedeiro experimental (82). Em conjunto, esses dados sugerem que atividades funcionais da integrina VLA-4 podem estar seletivamente associadas a distintos subgrupos de células T, por exemplo, com ação mais relevante para a transmigração de células Th1 e à modulação da estabilidade de determinados programas transcricionais da célula T em diferenciação.

Esse postulado, ao associar o papel da integrina VLA-4 nos eventos de adesão/migração com a modulação de funções efetoras e reguladoras da célula T, pode ter implicações relevantes para o uso terapêutico de bloqueadores de VLA-4 em determinadas condições patológicas.

2) JUSTIFICATIVA

Em linfócitos T, as integrinas participam dos processos de coestimulação da via do TCR na sinapse imunológica e na migração sobre o endotélio e diapedese, com importante atividade de remodelamento do citoesqueleto. Constituem, portanto, um grupo de proteínas centrais para o sistema imune, onde desregulações na atividade dessas podem resultar em desordens inflamatórias clinicamente relevantes.

Nesse contexto, embora a participação específica da integrina VLA-4 nos eventos de migração transendotelial seja objeto de diversos estudos, incluso como alvo terapêutico importante em doenças inflamatórias, seu envolvimento em outros processos, como ativação e diferenciação da célula T, foi menos explorado do ponto de vista molecular. Dessa forma, a partir de abordagem genética de inativação do gene *ITGA4* na linhagem de células Jurkat, uma linhagem linfoblástica de células T bastante utilizada como modelo para estudos moleculares e celulares, buscamos investigar o potencial impacto da ausência da integrina VLA-4 sobre a funcionalidade de células T. Esperamos que estes estudos possam contribuir para um melhor entendimento sobre o papel funcional dessa molécula em eventos imunológicos, tanto em condições fisiológicas como patológicas.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

O objetivo geral desta tese é investigar o papel da integrina VLA-4 na ativação, adesão e migração de linfócitos T.

3.2) Objetivos específicos

1. Caracterizar os fenótipos celulares associados a inativação de *ITGA4*.
2. Estudar os fenótipos moleculares gerados pela inativação de *ITGA4*.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Células Jurkat, genotipagem e nomenclatura das células selvagens e mutantes

A linhagem de células Jurkat foi estabelecida na segunda metade da década da década de 70 a partir do sangue periférico de um paciente do sexo masculino, com 14 anos de idade, e diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda (83). Inicialmente, esta linhagem celular foi denominada de JM, e atualmente é conhecida como Jurkat clone E6.1. Estas células são produtoras de IL-2, mas precisam de estimulação com ésteres de forbol e lectinas (84) ou estimulação pelo TCR para produzirem grandes quantidades dessa citocina (85). Em maio de 2017, a linhagem de células Jurkat mantida pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT) foi testada pelo serviço de autenticação celular do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Através da metodologia de amplificação por PCR de STR (*Short Tandem Repeat*) foi feita a genotipagem de 22 *loci* presentes nesta linhagem. A comparação do padrão obtido por esta genotipagem com outros três padrões de referência é mostrada no ANEXO 1 (**TABELA 3**) evidenciando a autenticidade das células Jurkat utilizadas neste trabalho. Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizadas as células Jurkat originais e uma linhagem de células Jurkat mutantes para o gene *ITGA4* geradas no LPT (vide seção 5.2). As células Jurkat originais foram denominadas de células não mutantes WT (*wild-type*). As células Jurkat modificadas geneticamente foram referidas como células mutantes *ITGA4-KO* (*knockout*).

4.1.1) Rotina de cultivo celular

As células Jurkat foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, cat# R8758) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Econolab, cat# F063), penicilina a 100 mg/L e estreptomicina a 50 mg/L. A incubação das células foi feita à temperatura de 37°C, em atmosfera controlada com 5% de CO₂ e em uma contração de 10⁵ a 2x10⁶ células/mL. Os cultivos foram descartados após a passagem 25 a contar do momento em que foi feito a diluição clonal para isolar o mutante nulo. Todos os experimentos foram realizados com cultivos de células mutantes e selvagens em quantidades próximas de passagens.

4.1.2) Congelamento

As células Jurkat foram congeladas em solução de SFB com 10% de DMSO. Lotes de 10⁷ células suspensas em 1 mL de solução de congelamento foram transferidas para tubos de

criopreservação e congeladas em caixas com isopropanol em um freezer a -70°C . Após 24 h, os tubos foram transferidos e armazenados em nitrogênio líquido.

4.1.3) Descongelamento

Os tubos de criopreservação contendo as células congeladas foram transferidos dos contêineres de nitrogênio líquido para um recipiente com gelo seco e, em seguida, banhados em água a 37°C para um processo de descongelamento rápido. Em seguida, as células foram transferidas tubo contendo 5 mL de meio de cultivo e centrifugadas a 400 g por 5 min. O precipitado celular foi então ressuscitado em meio de cultivo e as células foram cultivadas de acordo com o protocolo descrito para a rotina de cultivo celular.

4.2) Construção de célula mutante *ITGA4*^{-/-}

4.2.1) Mutagênese sítio dirigida por CRISPR/Cas9

O gene *ITGA4* foi editado de acordo com o protocolo proposto por Ran *et al.* (86) para a geração de mutantes nulos para a integrina $\alpha 4$. Mais especificamente, optou-se pela técnica de edição por indução da via de união terminal não homóloga (*nonhomologous end joining* - NHEJ), na qual são isolados mutantes por erros aleatórios de inserção ou deleção (*indel*) durante o reparo da ruptura cromossomal gerada por Cas9. Este tipo de mutagênese, dirigida para o começo do gene, visou gerar mutantes nulos para nosso modelo de estudo pela perda de função do gene alvo e da proteína por ele codificada. A ferramenta *on-line* CRISPR Design (<http://tools.genome-engineering.org/>) e a versão GRCh38 do genoma humano foram empregadas para desenhar o RNA guia (gRNA) utilizado para editar o *locus* do *ITGA4*. O gRNA de sequência 5'-GACCGGCCGCCCTACACG-3' foi escolhido por clivar dentro do primeiro éxon do gene alvo e possuir baixa probabilidade de editar erroneamente outras regiões do genoma. Os oligonucleotídeos pX330-Igta4_For#1 e pX330-Igta4_Rev#1 (**TABELA 1**) foram encomendados para, quando hibridizados, reconstituírem a sequência do gRNA escolhido e permitirem a sua clonagem dentro do sítio BbsI no plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene, cat# 48138) (). A clonagem foi feita em *E. coli* DH5 α e o DNA plasmidial foi preparado com o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, cat# 27104). A confirmação de inserção do gRNA no vetor de expressão de Cas9 foi feita por sequenciamento através da plataforma de sequenciamento capilar (SANGER) do Instituto Oswaldo Cruz (P01-001) utilizando os oligonucleotídeos U6_seq (**TABELA 1**). Em seguida, foi feita uma preparação de DNA em larga escala com o Nucleo Bond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel, cat# 740410), conforme recomendações do fabricante, e 4 μg de DNA plasmidial foram eletroporados em células Jurkat

IV) MATERIAL E MÉTODOS

utilizando o sistema Nucleofector 2b (Lonza, cat# AAB-1001). Foram utilizadas 2×10^5 células suspensas em 100 μ L do tampão 3P e a eletroporação foi feita de acordo com o protocolo proposto por Chicaybam *et al* (87). Após a eletroporação, as células foram incubadas por 24 horas em garrafa de cultivo com 5 mL de meio, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. No dia seguinte, as células que expressavam GFP foram isoladas no citômetro de fluxo e *cell sorter* FACSARIA II da plataforma de citometria da Fiocruz (RPT08A).

As células recuperadas foram incubadas novamente em garrafa com 5 mL de meio de cultivo e, após breve expansão, uma amostra de 2,5 mL de células purificadas foi testada pela técnica da nuclease Surveyor (88) com o Kit Surveyor Mutation Detection (IDT, cat# 706025), enquanto os outros 2,5 mL foram deixados em cultivo para continuar o processo de expansão. O DNA genômico da amostra coletada foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, cat# A1620), conforme especificações do fabricante. Para amplificar a região mutada por reação em cadeia da polimerase (PCR), aproximadamente 50 ng de DNA genômico foram utilizados juntos com os oligonucleotídeos *tgt-hItga4 For* e *gt-hItga4_Rev* (TABELA 1) e a enzima Platinum Taq HiFi (Invitrogen 11304011). Esta PCR foi realizada em 35 ciclos com incubação para desnaturação da dupla-fita de DNA a 94°C por 15 segundos, incubação para anelamento dos oligonucleotídeos a 60° C por 30 segundos e incubação para extensão das novas fitas de DNA a 68°C por 1 min. O produto da PCR foi digerido com a enzima T7 endonuclease e analisado em gel de agarose para confirmação da existência de mutações que promoviam a perda de paridade na dupla hélice de DNA.

TABELA 1) Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese e confirmação

| Nome | Sequência (5'-3') |
|--------------------------|-------------------------------|
| pX330-Igta4_For#1 | caccGACCGGCCGCCCTACAACG |
| pX330-Igta4_Rev#1 | aaacCGTTGTAGGGCGCGCCGGTC |
| U6_seq | ACTATCATATGCTTACCGTAAC |
| gt-hItga4_For | ATgaattcCCGTGCAACTTTGGGGTAGTG |
| gt-hItga4_Rev | ATggatccCACGACCGAGTAGCCGAACAG |

Clones da população celular que ficou em expansão foram isolados por diluição limitante em uma placa de 96 poços. As células foram diluídas para a concentração de 2×10^4 células/mL e uma alíquota de 200 μ L foi adicionada ao poço A1 de uma placa de 96 poços.

Em seguida, foi feita uma primeira diluição serial na proporção 1:2 por toda a 1ª coluna da placa, do poço B1 até o poço H1. Com uma pipeta de 8 canais, 100 µL da primeira coluna de poços foram diluídos serialmente, também na proporção de 1:2, até a 12ª coluna de poços. Os clones que cresceram nas últimas colunas foram analisados por sequenciamento e citometria de fluxo.

4.2.2) Confirmação de mutante nulo para *ITGA4*

Para confirmar a mutação no genoma dos clones isolados por diluição limitante, a região alvo da mutação dirigida foi amplificada por PCR da mesma forma que na técnica de Surveyor. O fragmento amplificado foi sequenciado pelo método Sanger, empregando os mesmos oligonucleotídeos usados na PCR, na plataforma de sequenciamento capilar do Instituto Oswaldo Cruz (P01-001). A confirmação de que a mutação eliminava a expressão da proteína na população clonal foi feita por citometria de fluxo com o anticorpo anti- $\alpha 4$ (*Mouse Anti-Human* CD49d-PE, clone 9F10, BD Biosciences, cat# 555503, diluído 1:10). As marcações foram feitas em placas de 96 poços de fundo em “U” (Corning, cat# 3798) com 1×10^6 células por poço. As células foram centrifugadas a 400g, por 5 min, a 4°C e lavadas com 100 µL de PBS. Para marcação de membrana, as células foram incubadas por 30 minutos a 4-8°C com 10 µL de solução contendo o anticorpo em PBS, lavadas duas vezes com 100 µL de PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 min a 4-8°C. Para marcação intracelular, as células foram tratadas com os reagentes do kit FIX & PER Cell Permeabilization (ThermoFisher, cat# GAS003), e o anticorpo foi diluído na solução de permeabilização. Ao término dos processos de marcação as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de tampão de permeabilização, uma vez com 100 µL de PBS e ressuspensas em PBS para serem analisadas em um citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). As análises dos resultados de citometria foram feitas com o programa FlowJo (versão 10).

4.3) Caracterização funcional de células Jurkat mutantes para *ITGA4*

4.3.1) Mobilização de cálcio intracelular

A mobilização intracelular de cálcio foi testada nas células mutantes e WT por citometria de fluxo, usando o marcador eFluor 514 (Invitrogen, cat# 65-0859), e em leitor de microplaca FlexStation III, utilizando o marcador Fluo-3AM (Sigma-Aldrich, cat# 73881). Estes dois marcadores fluorescentes de cálcio possuem propriedades apolares e atravessam a membrana celular, e sob ação de esterases citoplasmáticas e não podem mais atravessar passivamente a bicamada lipídica.

IV) MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises com citometria de fluxo, 10^6 células por tubo foram lavadas 1 vez com DPBS^{-/-} (*Dulbecco's phosphate-buffered saline* sem cálcio e magnésio, Gibco, cat# 14190144) e ressuspensas em solução de eFluor 514 a $2,5 \mu\text{M}$ em DPBS^{-/-}. Em seguida, as células foram incubadas por 30 min a 37°C e lavadas mais uma vez com DPBS^{-/-}. Por último, as amostras foram ressuspensas em $300 \mu\text{L}$ de DPBS^{-/-} e levadas ao citômetro FACSCanto II para serem lidas com o laser de 488 nm. Após alguns segundos do início da leitura, o citômetro foi pausado, adicionou-se $1 \mu\text{L}$ de ionomicina 5 mM e, imediatamente, deu-se continuidade à aquisição das amostras.

Os experimentos feitos em placas de 96 poços (Corning, cat# CLS3603-48EA) e analisados no leitor de microplaca FlexStation foram realizados com uma quantidade inicial de 2×10^5 células por poço. De acordo com o desenho experimental, o número apropriado de células WT ou mutantes foi transferido para tubos de $1,5 \text{ mL}$ e lavados 1 vez com PBS. As células foram ressuspensas em uma solução de Fluo-3AM a $2 \mu\text{M}$ em DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Merck/Sigma-Aldrich, cat# D8662) e incubadas a 37°C por 60 min. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com DPBS, aliqüotadas nos poços da placa de 96 poços e analisadas no leitor FlexStation frente a diferentes estímulos. As leituras foram feitas em 90 segundos/poço com um λ de excitação de 485 nm, um λ de emissão de 525 nm e um limite de 515 nm. Antes da aplicação do estímulo, foi realizada uma leitura da fluorescência de base das células por 20 segundos e, após a aplicação do estímulo, foi feita a leitura da fluorescência durante a resposta por 70 segundos. Os valores da variação de unidade de fluorescência (ΔFU) foram calculados pelo maior valor medido após a adição do estímulo menos a média dos valores de base medidos para o mesmo poço. As células foram submetidas a estímulos com solução salina, ionomicina e ATP em diferentes concentrações. Os dados de ΔFU foram analisados no programa GraphPad Prism (versão 6.01).

Nos dois protocolos descritos acima, foram utilizados dois tipos DBPS que diferem em sua composição. O DPBS^{-/-} possui os seguintes sais inorgânicos: $2,66 \text{ mM}$ de cloreto de potássio (KCl), $1,47 \text{ mM}$ de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), $137,93 \text{ mM}$ de cloreto de sódio (NaCl) e $8,06 \text{ mM}$ de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); em uma solução com faixa de pH entre 7,0 e 7,3. Já o DBPS usado possui uma composição salina com 136 mM de cloreto de sódio (NaCl), $2,68 \text{ mM}$ de cloreto de potássio (KCl), 8 mM de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), $1,46 \text{ mM}$ de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), $0,5 \text{ mM}$ de cloreto de magnésio (MgCl_2), $0,9 \text{ mM}$ de cloreto de cálcio (CaCl_2) e foi adicionado $2,5 \text{ mM}$ de probenecida. A faixa de pH desta solução é de 7,0 a 7,4. A probenecida inibe transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que podem expulsar

os marcadores de cálcio de dentro da célula durante a execução do experimento. Foi feita uma solução fresca de probenecida a 10x em DPBS e diluída para a concentração de uso a cada experimento. A solução estoque de probenecida foi mantida no laboratório por um período de no máximo uma semana.

Nos experimentos feitos em placa de 96 poços, foi utilizada a linhagem de macrófagos J774.G8 como controle positivo da indução da liberação de cálcio. No dia anterior a cada experimento, 2×10^5 células foram plaqueadas por poço e incubadas a 37°C por um período de uma noite para aderirem a placa. O processo de marcação dos macrófagos com sensor de cálcio foi semelhante ao processo das células Jurkat, entretanto foi feito individualmente para cada replicata experimental direto na placa de 96 poços. As lavagens foram feitas com 200 µL de DPBS e o tratamento com Fluo-3AM foi feito com 150 µL da solução de marcação.

4.3.2) Ensaios de transmigração em câmaras Transwell

Os ensaios de transmigração foram realizados em câmaras Transwell com poros de 8 µM (Corning Costar) e em meio sem SFB. As células foram incubadas previamente por 2 horas, em meio RPMI sem SFB, a 37° C e em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, 2×10^6 células foram transferidas para 100 µL de meio RPMI contendo 0,01% (p/v) de BSA e colocadas na parte superior da câmara Transwell repousada em poço contendo 600 µL do mesmo meio de cultivo (**Figura 7**). As membranas das câmaras Transwell foram previamente tratadas por 45 minutos a 37° C com uma solução de 0,1% (p/v) de fibronectina humana (FNh) (Sigma-Aldrich, cat# F2518) ou albumina sérica bovina (BSA). Em algumas condições experimentais foi adicionada, ao meio de cultivo da câmara inferior, a quimiocina CXCL12 em diferentes concentrações. As células que atravessaram a membrana foram contadas em câmara de Neubauer após um período de 4 horas de migração a 37° C e em atmosfera com 5% de CO₂.

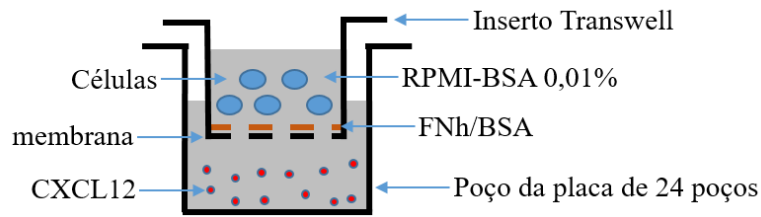


Figura 7) Representação esquemática do sistema de transmigração em câmara Transwell

As estruturas azuis representam células Jurkat WT ou mutantes; a linha tracejada preta representa a membrana porosa que foi recoberta com FNh ou BSA; as circunferências vermelhas representam as moléculas da quimiocina CXCL12 adicionadas à parte inferior da câmara.

4.3.3) Ensaios de motilidade em superfície plana

Os ensaios de motilidade foram realizados sobre lamínulas de vidro tratadas com FNh (Sigma, F2518). A superfície de vidro da placa de Petri de 35 mm com lamínula própria para microscopia (Thermo Fisher, cat# 150680) foi tratada com 200 μ L de solução 0,1% de FNh em PBS por uma hora à temperatura ambiente. Após o tratamento, 2 mL de meio RPMI com 10% de SFB contendo 3×10^5 células foram vertidos uniformemente sobre toda a área da placa. As células já plaqueadas foram incubadas por 30 minutos, a 37° C e em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, os movimentos celulares foram filmados por contraste de fase em um microscópio Leica TCS SP8, por 1 hora, utilizando uma objetiva de 20X (HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY, cat# 15506517), e foram realizados um total de 595 frames. Posteriormente, as imagens foram analisadas com o *plugin* TrackMate do software Fiji (versão Life-Line, Java 8) (89).

4.3.4) Medição e análise de crescimento celular

4.3.4.1) Medição e análise de crescimento celular em meio novo

Para verificar se havia diferença na taxa de crescimento entre as células Jurkat WT e KO para o gene *ITGA4*, as duas linhagens celulares foram incubadas em 2 mL de meio de cultivo, em placa de 6 poços e com concentrações iniciais de 1×10^5 células/mL e 5×10^5 células/mL. A cada 24 horas, cada cultivo foi cuidadosamente misturado com uma pipeta de 1.000 μ L e uma alíquota de 10 μ L era separada para contagem em câmara de Neubauer. Somente células com morfologia e refringência compatíveis com células viáveis foram contabilizadas e o experimento foi interrompido quando o cultivo começou a entrar em colapso com um aumento abrupto do número de células mortas. Cada condição ensaiada foi testada em triplicata experimental e duplicata biológica. Os dados de cada duplicata biológica foram analisados no programa GraphPad Prism (versão 6.01) pelo método estatístico *two-way anova*

para verificar se as médias das concentrações celulares eram significativamente diferentes entre os dois tipos celulares e ao longo dos dias para uma mesma linhagem celular.

Para melhor evidenciar as métricas da curva de crescimento, cada replicata experimental foi analisada com o pacote do ambiente de programação R chamado Growthcurver (versão 0.3.0) (90). As medidas de crescimento celular em número de células por mL foram ajustadas ao modelo da equação logística dado pelo número de células “ N_t ” no tempo “ t ” e representado na **Equação 1**. O número máximo de células (ou concentração máxima em células por mL) em um dado meio é expresso pelo valor de “ K ”, que representa a capacidade de carga. A taxa de crescimento intrínseco da população, ou seja, a taxa de crescimento caso não houvesse restrições impostas ao tamanho total da população, é dada pelo valor de “ r ”. O número inicial de células ajustado (ou concentração inicial em células por mL) é dado pelo valor de “ N_0 ”. O algoritmo do Growthcurver ajusta os valores de K , r e N_0 utilizando uma implementação em R do algoritmo de mínimos quadrados não lineares de Levenberg-Marquardt (91).

Equação 1) Equação logística que representa o número de células N_t no tempo t (90)

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K-N_0}{N_0}\right) e^{-rt}}$$

4.3.4.2) Medição e análise de crescimento celular em meio condicionado

Para checar se algum fator secretado no meio de cultivo poderia influenciar na proliferação de células WT ou mutantes, ambos os tipos celulares foram postos para crescer em meio de cultivo novo ou em uma mistura 1:1 (v/v) de meio novo com meio condicionado. Dois tipos de meio condicionado foram preparados deixando os dois tipos celulares crescerem por 48h em meio de cultivo tradicional. Ao término desse período de incubação, as células foram removidas por dois processos de centrifugação a 400g por 10 min, com o sobrenadante transferido para um novo tudo e utilizado como meio condicionado. O ensaio foi feito em placa de 24 poços com 500 μ L de meio e em triplicata experimental. Foram ensaiadas todas as possibilidades de combinação de meio condicionado e tipo celular: 1) WT x meio condicionado pela WT; 2) WT x meio condicionado pela KO; 3) KO x meio condicionado pela WT; 4) KO x meio condicionado pela KO. Em paralelo, foi feito um controle de ambos os tipos celulares com 500 μ L de meio novo sem meio condicionado. A significância das diferenças entre as médias de cada triplicata experimental foi testada no GraphPad Prism (versão 6.01), pelo

método *two-way anova*, fazendo comparações entre os dois tipos celulares e, ao longo dos dias, para uma mesma linhagem celular.

4.3.5 Medição e análise de tamanho celular

As células WT e ITGA4-KO foram fotografadas em suspensão em meio de cultura com o emprego de um microscópio Axio Imager A.2 (Zeiss, Alemanha). Foram coladas 4 gotas de esmalte de unha em uma lâmina de microscopia para servirem de apoio para uma lamínula, como mostrado na figura 4.2. Um volume de aproximadamente 10 μL de cultivo foi adicionado à lateral da lamínula e deixado que se espalhasse entre a lâmina e a lamínula por capilaridade (**Figura 8**). Essas preparações foram fotografadas e a circunferência das células foi medida de forma semi-automatizada com o programa AxioVision 4.8. Foram fotografados cultivos de ambas as células em duas concentrações denominadas de alta e baixa. As células em baixa concentração provavelmente estavam no final da fase de crescimento exponencial e entrando em desaceleração com uma concentração inferior a $1,8 \times 10^6$ células/mL e as células em alta concentração já deveriam se encontrar na fase de platô com concentração de $2,2 \times 10^6$ células/mL. Uma câmara de Neubauer foi fotografada e suas medidas internas foram utilizadas para confirmar que o sistema de medição de tamanho a partir das imagens tiradas estava acurado.

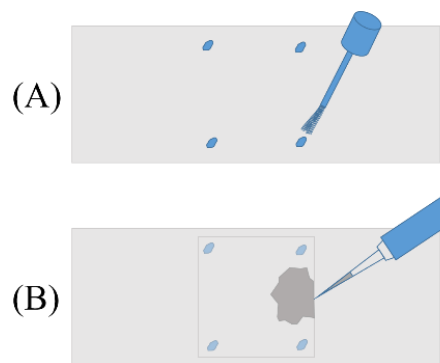


Figura 8) Representação esquemática mostrando a forma de preparo do material para fotografar as células com o propósito de medir o tamanho celular

(A) Foram depositadas 4 gotas de esmalte de unha na superfície da lâmina de microscopia para servirem de apoio para a lamínula após polimerizado. (B) O cultivo celular foi adicionado na lateral da lamínula para que se espalhasse por capilaridade entre a lâmina e a lamínula.

4.4 Caracterização do perfil de expressão de células Jurkat ITGA4-KO

4.4.1) Caracterização do perfil de expressão por citometria de fluxo

A caracterização do perfil de expressão membranar de subunidades α de integrinas $\beta 1$ foi realizada por citometria com os anticorpos anti- $\alpha 5$ (*Mouse Anti-Human CD49e-PE*, Clone

IIA1, BD Biosciences, cat# 555617, diluído 1:10) e anti- $\alpha 6$ (*Rat Anti-Human* CD49f-FITC, Clone GoH3, BD Biosciences, cat# 555735, diluído 1:10). O protocolo de marcação dessas proteínas está descrito na seção 4.2.2.

4.5) Ativação de células Jurkat

A mimetização da ativação via TCR foi induzida com os anticorpos anti-CD3 (clone OKT3, Invitrogen, cat# 16-0037-85) e anti-CD28 (clone CD28.2, eBioscience, cat# 16-0289-81), simulando respectivamente as interações TCR-MHC-peptídeo e CD28-B7. Uma solução com anti-CD3 a 1 $\mu\text{g/mL}$ em PBS foi incubada em placa de 96 poços (20 μL /poço) por 16 h a 4°C para adsorção das imunoglobulinas à superfície da placa. Após esse período, cada poço foi lavado uma vez com meio de cultivo e 10^5 células foram colocadas por poço suspensas em meio com anti-CD28 a 1 $\mu\text{g/mL}$. A ativação das células foi realizada por um período de 4 h nas condições descritas para o cultivo de rotina.

4.6) Sequenciamento de RNA em larga escala

Foi realizado um sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq) para comparar o perfil de expressão de células mutantes e não mutantes nas condições de ativação e não ativação com anticorpos. As etapas de preparo das bibliotecas e sequenciamento foram feitas no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). Todos esses procedimentos foram realizados seguindo as recomendações dos fabricantes.

Ao término do protocolo de ativação, as células foram transferidas para tubos de 1,5 mL, centrifugadas por 5 min a 400 g e ressuspensas em TRIzol (Thermo Fisher, cat# 15596-018) para extração do RNA total segundo recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (TURBO DNA-free Kit; Invitrogen, cat# AM1907) para remoção de possível contaminação por DNA genômico. A qualidade do RNA foi analisada utilizando um equipamento Agilent 2100 Bionalyzer junto com o reagente RNA 6000 Pico Kit (cat# 5067-1513). Após a confirmação da alta qualidade das amostras, o RNA total foi dividido em duas alíquotas para sequenciamento dos RNAs longos (ou RNA total). Para o preparo das bibliotecas de RNA total, foram empregados 0.2 μg de RNA e os reagentes do TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit with Ribo-Zero Gold Set A (48 *samples*, 12 *indexes*) (cat# RS-122-2301). Este kit de preparo de biblioteca faz inicialmente uma depleção do RNA ribossomal utilizando oligonucleotídeos biotinilados específicos para esse tipo de RNA e que são carregados por microesferas e centrifugação. Em seguida, é realizada uma fragmentação do RNA com o emprego de cátions divalentes sob altas temperaturas e a transcrição reversa dos fragmentos de

RNA em cDNA é feita com o emprego de iniciadores aleatórios (*random primers*). Posteriormente, a fita remanescente de RNA é removida com RNase H e a segunda fita de cDNA é sintetizada usando-se uma DNA polimerase I que deixa uma adenina extra não pareada na terminação 3' da nova fita. Esse nucleotídeo extra não pareado é utilizado para fazer uma ligação das moléculas de cDNA de forma orientada no adaptador. Esse protocolo de preparo de biblioteca permite o sequenciamento com informação sobre a orientação da fita do RNA original e processa tanto RNAs codificantes como não-codificantes. A informação da orientação da fita é de extrema importância para aumento da acurácia na quantificação da expressão gênica durante o processo de análise de um transcriptoma (92).

A qualidade das bibliotecas foi analisada no mesmo Bionalyzer com o emprego dos reagentes do *High Sensitivity DNA Kit* (cat# 5067-4627). O sequenciamento pareado dos RNAs longos foi feito em um equipamento Illumina NextSeq 500 com o emprego dos reagentes NextSeq 500/550 High Output v2 kit (150 *cycles*) (FC-404-2002). Este sequenciamento foi realizado em duas etapas de 75 ciclos de leitura para cada extremidade da molécula sequenciada (**Figura 9**).

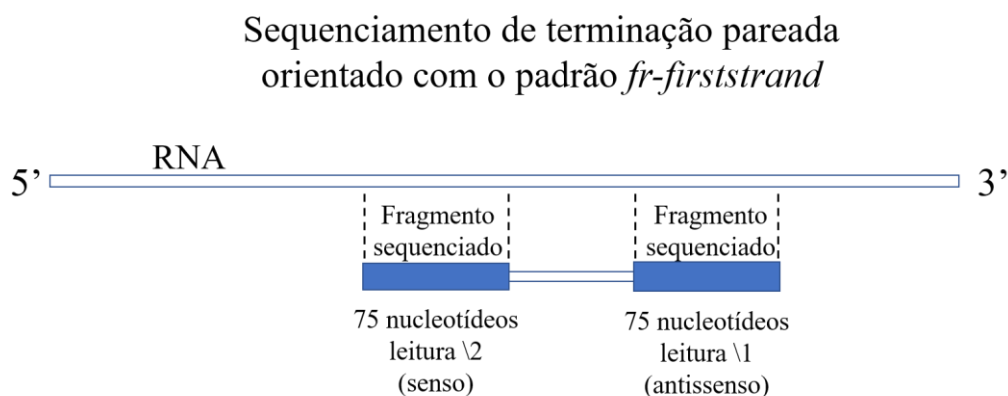


Figura 9) Representação esquemática mostrando o sequenciamento pareado e orientado das extremidades de um fragmento de RNA

No sequenciamento dos RNAs longos, foram feitos 75 ciclos de sequenciamento para revelar os 75 nucleotídeos das extremidades de cada molécula sequenciada. O kit de preparo das bibliotecas gerou fragmentos a serem sequenciados com orientação no padrão *fr-firststrand*. Desta forma, a leitura 1 corresponde a sequência antissenso e leitura 2 corresponde a sequência senso do RNA sequenciado.

4.7) Análise do sequenciamento do RNA total

As análises do sequenciamento de RNAs longos foram realizadas por duas metodologias distintas para aumentar a sensibilidade e confiabilidade na detecção de genes diferencialmente expressos (DE) (**Figura 10**). As leituras de alta qualidade foram processadas por dois *pipelines* cuja análise de expressão diferencial foi feita com o pacote Cufflinks ou com o pacote DESeq2

fluxo de processamento e programas utilizados. As setas pretas marcadas com o número 0 pertencem as etapas comuns as análises feitas com ambos os *pipelines*, as setas verdes marcadas com o número 1 representam o fluxo de informação das análises com o Cufflinks, as setas azuis marcadas com o número 2 representam o fluxo de informação das análises com o DESeq2 e as setas laranjas marcadas com o número 3 indicam o fluxo da informação utilizada para construir os gráficos de expressão gênica. Os retângulos representam etapas de processamento, os cilindros simbolizam conjuntos de dados e os quadriláteros com uma borda curva indicam arquivos de entrada ou saída.

6 possibilidade de comparação pareada

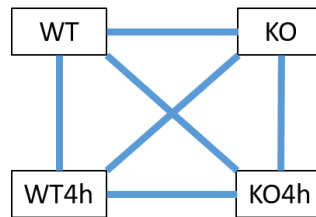


Figura 11) Esquema mostrando as 6 possibilidades de comparação pareada para identificação de genes diferencialmente expressos

As linhas azuis representam as comparações: 1) KO vs WT; 2) WT4h vs WT; 3) KO4h vs KO; 4) KO4h vs WT4h; 5) KO4h x vs WT; 6) WT4h vs KO. WT representa as amostras de células Jurkat selvagens, KO indica as amostras com células ITGA4-KO e 4h assinala as células que passaram por tratamento com anticorpos ativadores por um período de 4 horas.

4.7.1) Análises de expressão diferencial feitas com o pacote de programas **Cufflinks**

As análises de expressão com o *pipeline* Cufflinks foram feitas nos servidores do serviço de bioinformática do Max Planck Institute for Biology of Ageing (Colônia, Alemanha). Foi utilizada a versão 3 do *pipeline* intitulado de tuxedo e disponível na página: <https://github.com/mpg-age-bioinformatics/htseq-tools>. Pelo *pipeline* tuxedo, a remoção de adaptadores e leituras de baixa qualidade foi realizada com o programa FLEXBAR (versão 3.0.3) com a parametrização padrão (94). A qualidade das leituras foi inspecionada antes e depois do tratamento com o FLEXBAR através do programa FastQC (versão 0.11.7) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) As leituras pareadas e não pareadas de boa qualidade foram alinhadas ao genoma humano com o programa HISAT2 (versão 2.1.0) (95), ajustado para fazer um alinhamento com orientação de fita no padrão *fr-firststrand*. Um banco de dados de referência para este alinhador foi criado com a montagem GRCh38 (versão 83) do genoma humano disponibilizada pelo projeto Ensembl.

Os arquivos de alinhamento no formato bam foram processados com a ferramenta samtools (versão 1.8) (96) para remover as leituras não alinhadas ao genoma, ordenar as leituras por posição do alinhamento e criar um arquivo de index que otimiza o acesso da informação no arquivo bam ordenado. Cada arquivo de alinhamento foi então processado com o programa StringTie (versão 1.3.3) (97) para reconstrução dos transcritos que foram anotados

em arquivos GTF (*General Feature Format*) separados (**Figura 12**). O programa Cuffmerge (versão 2.2.1) (98) foi utilizado para unir os arquivos GTF criados para cada alinhamento e associar os transcritos identificados pelo StringTie com a anotação gênica presente no arquivo de anotação do genoma GTF versão 83 (Homo_sapiens.GRCh38.83.gtf) disponibilizado pelo projeto Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). Esse procedimento gerou um único arquivo GTF que foi utilizado pelo programa Cuffquant (versão 2.2.1) (98) para contar, nos arquivos bam, quantas leituras foram alinhadas dentro da região correspondente a cada transcrito. O arquivo de saída do Cuffquant foi analisado com o Cuffdiff (versão 2.2.1) (99) para identificação de genes diferencialmente expressos nas 6 possibilidades de comparação possíveis. Após a etapa de análise de expressão diferencial, o resultado obtido com a análise do Cufflinks foi acessado, visualizado e exportado com o auxílio do pacote para R chamado CummeRbund (versão 2.30.0) (100).

Os *loci* gênicos anotados pelo StringTie são indexados por identificadores internos da análise do Cufflinks (ex.: XLOC_045533) que não possuem relação com outros bancos de dados associados ao genoma humano. O programa cuffmerge utiliza as posições anotadas pelo StringTie para relacionar os transcritos identificados com os *loci* gênicos descritos no arquivo oficial de anotação do genoma GTF e faz a relação dos identificadores gênicos internos do Cufflinks com o nome do gene (ex.: XLOC_045533 – HLA-DRB1). Utilizando a ferramenta biomaRt (versão 2.44.1) (101), os nomes gênicos foram convertidos a identificadores do Ensembl (ex.: XLOC_045533 – HLA-DRB1 – ENSG00000196126/ ENSG00000229074/ ENSG00000228080/ ENSG00000206240/ ENSG00000236884/ ENSG00000206306). Um único gene pode possuir mais de um identificador no Ensembl e nesses casos todos os identificadores foram mantidos para evitar perda de correspondência nas análises funcionais subsequentes.

O StringTie pode não conseguir resolver *loci* gênicos próximos e que possuem leituras erroneamente mapeadas entre eles. Quando isso ocorre, mais de um *locus* é associado a um único identificador do Cufflinks e consequentemente o cuffmerge associa mais de um nome de gene a um *locus* anotado pelo StringTie. Para filtrar os erros de anotação do Cufflinks, os *loci* com anotação divergente da anotação presente no GTF83 foram removidos do resultado. O resultado final do Cufflinks foi indexado pelo identificador do gene no Ensembl e pelo código das condições biológicas que foi feita a comparação pareada. Estas 3 características passaram a constituir elemento de análise (ou *feature*) que foi utilizado para relacionar o resultado do Cufflinks como o resultado do DESeq2.

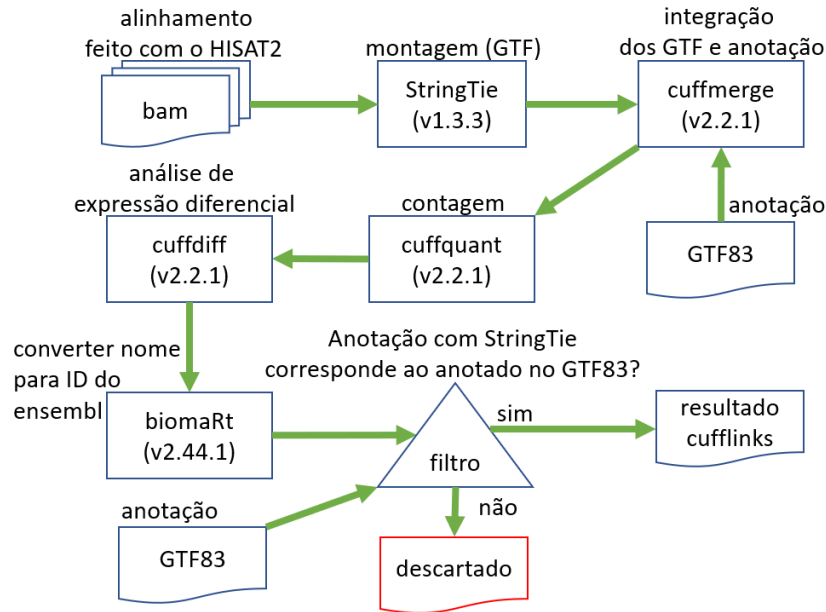


Figura 12) Fluxograma detalhado do processamento de dados utilizando o protocolo adaptado do Cufflinks

Os retângulos representam etapas de processamento, os quadriláteros com uma borda curva indicam arquivos de entrada ou saída e o triângulo indica a etapa de decisão.

4.7.2) Análises de expressão diferencial feitas com o DESeq2

Em paralelo às análises feitas com o Cufflinks, as leituras pareadas e de alta qualidade foram analisadas com outro *pipeline* cuja análise de expressão diferencial foi feita com o pacote para o R denominado DESeq2 (versão 1.24.0) (**Figura 10**). Estas análises foram realizadas nos servidores do Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional do Instituto Nacional do Câncer.

Sequências de baixa qualidade ou correspondentes a adaptadores Illumina foram retiradas com o programa Trimmomatic (versão 0.36) (102). Para remover pedaços de sequências correspondentes a adaptadores, foi utilizado o padrão TruSeqAdapters, com uma tolerância para perda de pareamento de até 2 nucleotídeos (*seed mismatches*), um limite de até 30 nucleotídeos para um pareamento palíndromo e um pareamento mínimo de 10 nucleotídeo. A qualidade das leituras foi analisada com uma janela de 4 nucleotídeos e o descarte foi feito quando a média da qualidade desses nucleotídeos era menor que 20 na escala Phred (99% de chance de a base estar correta). As leituras remanescentes com menos de 36 nucleotídeos e as leituras sem o respectivo par também foram descartadas. A qualidade das sequências foi analisada e visualizada com o programa FastQC, antes e depois do tratamento com o Trimmomatic.

Um banco de dados de referência para o alinhador STAR (versão 2.7.3) (103) foi criado com as mesmas versões do genoma e arquivo de anotação GTF empregados nas análises com

o Cufflinks. O programa STAR possui alta precisão e exatidão para mapear leituras dentro de um *locus* gênico, entretanto, possui menor exatidão para mapear as leituras entre os transcritos de um mesmo gene. Para contornar essa limitação, os alinhamentos oriundos do processamento com o STAR foram analisados com o RSEM (versão 1.3.0) (104), de forma a corrigir possíveis erros mapeamento entre transcritos de um mesmo gene.

Os arquivos bam, após serem processados com o STAR/RSEM, foram ordenados com o programa samtools, indexados em um arquivo a parte com extensão “.bai” e inspecionados manualmente com o programa *Integrative Genomics Viewer* (versão 2.6.3) (105). Os arquivos de indexação do alinhamento do formato bam permitem o acesso de uma informação de maneira rápida pela posição das leituras no genoma de referência. Após a visualização, os alinhamentos foram submetidos à contagem de leituras mapeadas por gene e transcrito utilizando a ferramenta htseq-count (versão 0.11.2) (106). Este programa foi ajustado para somente considerar os alinhamentos que estivessem na posição reversa (padrão *fr-firststrand*) com mostrado na **Figura 9**.

Neste trabalho, foi dada prioridade às análises de expressão diferencial por gene, em detrimento da análise por transcritos. As contagens de leituras mapeadas por gene foram importadas para o ambiente de programação R versão 4.0.0 e analisadas com o protocolo padrão do DESeq2 para identificação de genes diferencialmente expressos (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html#differential-expression-analysis>). Nessas análises, foram adicionados apenas os genes em que o somatório das contagens para todas as amostras era superior a 10. As 4 condições biológicas foram contrastadas, par a par nas 6 comparações possíveis, utilizando o método de ponderação independente da hipótese (*independent hypothesis weighting* - IHW) (107). Este é uma derivação do método *Benjamini and Hochberg* (BH) (108), que utiliza uma abordagem baseada no dado para o cálculo do peso empregado na correção do p-valor e cálculo do p-valor ajustado. Em análises de expressão diferencial com dados de RNA-Seq é recomendável ajustar o p-valor para cada gene, pois aqueles com menor número de leituras mapeadas possuem maior probabilidade de erro de quantificação quando comparados a genes com um alto número de leituras mapeadas. Com esse intuito, o método IHW utiliza as contagens normalizadas com o DE-seq2 como covariante para ajustar o peso empregado na correção do p-valor. Dessa forma, este método utiliza o mesmo valor de peso para ajustar o p-valor de genes com índices de expressão parecidos. Empiricamente, esse método possui maior sensibilidade e poder estatístico que o método BH clássico, no qual o mesmo valor de peso é utilizado para corrigir o p-valor de todos os genes detectados (107).

4.7.3) Construção de um conjunto de dados com os resultados do Cufflinks e DESeq2

Os resultados das análises de expressão diferencial com os *pipelines* do Cufflinks e DESeq2 foram agrupados e indexados pelo identificador do gene no Ensembl e pelos códigos das duas amostras contrastadas, o que passou a ser o elemento de análise (ou *feature*). Os elementos que possuíam validação estatística pelo método do Cufflinks e do DESeq2 foram tratados de forma especial, pois possuíam dois valores de *fold change* (FC) e p-valor (um proveniente de cada método). Aqueles elementos em que a discrepância dos valores de log na base 2 do FC (LFC) era superior a 2 vezes foram descartados. Para os elementos remanescentes, passou-se a considerar a média aritmética dos dois valores de LFC como valor representativo dessa variável. Para esses elementos, também se passou a considerar o maior p-valor ajustado como o representante do p-valor.

O nome do gene para cada elemento foi composto pelo símbolo do gene, presente no arquivo oficial de anotação do genoma GTF83, e um código indicando o método que detectou a expressão diferencial daquele gene em uma dada comparação. Os códigos indicativos do método foram “cuff”, “des” e “both”/“ambos” para indicar elementos validados pelo Cufflinks, DESeq2 e ambos os *pipelines*, respectivamente.

Por último, através da ferramenta biomaRt (versão 2.44.1), o identificador do Ensembl de cada gene diferencialmente expresso foi utilizado para coletar as informações dos códigos do Gene Ontology (GO) (ex: GO:0005096) e classificar o biotipo de transcrito (*transcript biotype*) (ex: *protein_coding*). Os códigos do GO foram ainda convertidos nos seus respectivos termos (ex: GO:0005096 - "*GTPase activator activity*") com o emprego da biblioteca GO.db (versão 3.11.4) (109).

4.7.4) Análise da distância entre amostras

Para identificar a proximidade entre as amostras, inicialmente, foi calculado a correlação de Pearson entre elas utilizando os valores de contagem de leituras normalizados pelo método do DESeq2. Esse cálculo foi feito com a função *cor* do pacote *stats* (versão 3.6.2) da linguagem de programação R. Em seguida, foi feita um agrupamento (“clusterização”) utilizando a função *clusterboot* do pacote *fpc* (versão 2.2.7) e com base nas distâncias calculadas por 1 menos a correlação. Os *clusters* foram formados com base no índice de Jaccard e a confiabilidade foi calculada com um teste de *bootstrap* de 10.000 repetições (110).

4.7.5) Gráficos para visualização de expressão gênica

Os índices de expressão de todos os genes DE, de acordo com o método do Cufflinks e/ou DESeq2, foram plotados utilizando o pacote do R ggplot2 (versão 3.3.2). Os valores utilizados na plotagem foram as médias aritméticas dos índices em TPM (*transcripts per kilobase million*), calculados com o RSEM logo após o alinhamento com o STAR/RSEM. As barras de desvio ao redor da média correspondem ao erro padrão e os pontos são a representação dos valores medidos em TPM. As diferenças entre as médias suportadas por um p-valor menor ou igual a 0.05 estão destacadas pelas barras de erro com anotação do método associado ao teste estatístico que indicou a diferença entre as médias. No caso das diferenças com suporte estatístico por ambos os métodos, o maior p-valor foi escolhido para exibição.

Para visualizar o nível de expressão dos genes DE, detectados com as análises do Cufflinks e/ou DESeq2, para as comparações WT4h vs WT e KO4h vs KO, os valores de TPM foram plotados em um mapa de calor (*heatmap*) após clusterização. Inicialmente, as distâncias entre as amostras foram calculadas com o inverso da correlação de Spearman com os valores de TPM e as funções cor e dist do pacote do R stats (versão 3.6.2). De forma análoga, as distâncias entre os genes foram calculadas com base no inverso da correlação de Pearson. Com base no cálculo das distâncias, foi feita uma clusterização para as amostras e outra para os genes diferencialmente expressos utilizando a função hclust do pacote do R fastcluster (versão 1.1.25). A altura de corte para separar os *clusters* gênicos e construir uma barra de anotação foi calculada como o valor correspondente a 2/3 da maior altura encontrada com o hclust. O dendrograma foi cortado com a função cutree do fastcluster e uma linha azul foi adicionada ao gráfico para marcar a posição aproximada da altura utilizada para o corte.

4.7.6) Análises de enriquecimento de função

As análises de enriquecimento e gráficos foram feitos com o pacote do R clusterprofiler (versão 3.16.1), com o catálogo de anotação do consórcio GO (111) e do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; KEGG) (112). As análises realizadas contra as anotações do KEGG permitem identificar o enriquecimento de função dentro de vias biológicas com a possibilidade de estabelecer uma hierarquia entre os genes pertencentes a um mesmo processo biológico. Já as análises de enriquecimento de função realizadas contra o GO só permitem a hierarquização entre genes classificados em diferentes categorias, mas não possibilita a identificação da relação funcional de genes classificados dentro de um mesmo termo.

Para identificar os termos do GO enriquecidos, a lista com identificadores do Ensembl correspondentes a genes diferencialmente expressos nas comparações KO vs WT foi contrastada contra o total de genes detectados com pelo menos um dos dois métodos utilizados (Cufflinks e/ou DESeq2). As análises foram feitas sempre duas vezes para considerar somente os genes validados por ambos os métodos ou todos os genes diferencialmente expressos. Foram considerados como genes com expressão detectada com o Cufflinks aqueles que apresentaram a média do FPKM entre as triplicatas superior a zero em pelo menos uma condição biológica. Por outro lado, foram considerados como genes com expressão detectada pelo DESeq2 aqueles que continham uma média de 10 leituras alinhadas entre todas as replicatas, independente da condição biológica. As análises de enriquecimento de termos tiveram o p-valor ajustado pelo método BH e os cortes de p-valor e p-valor ajustado foram feitos em 0,01 e 0,05, respectivamente.

Para avaliar funções ativadas ou suprimidas, realizamos uma análise de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA) considerando todos os genes do genoma como grupo de fundo. Essas análises foram feitas com as funções gseKEGG e gseGO com um número de permutações igual a 10.000, um tamanho mínimo do grupo gênico igual a 3, um tamanho máximo de grupo gênico igual a 800 e um valor de corte para o p-valor igual a 0,05. As análises com o gseKEGG foram feitas sem ajuste do p-valor e o com os identificadores gênicos do NCBI (ncbi-geneid). As análises com o gseGO foram feitas com os identificadores do Ensembl e o p-valor ajustado foi calculado com o método BH.

A visualização dos termos enriquecidos, o grau de enriquecimento, número de genes enriquecidos e p-valor associado à análise foram realizadas com a função dotplot. A visualização de grupos gênicos associados com funções enriquecidas foi feita com redes construídas com a função cnetplot. A biblioteca pathview (versão 1.28.1) foi utilizada para integrar e visualizar os resultados de expressão gênica com base nos mapas de vias disponibilizados na coleção do KEGG.

4.7.7) Busca por elementos-chaves na regulação de transcrição gênica

Os genes diferencialmente expressos nas comparações KO vs WT, WT4h vs WT e KO4h vs KO foram analisados na plataforma RegulatorTrail (versão 1.1) (113) para identificarmos possíveis mecanismos de regulação de transcrição. Uma matriz contendo os índices de expressão medidos em TPM para os genes DE foi empregada em uma análise com o método *Regulator-gene associated enrichment analysis* (REGGAE) (114). Esta análise foi feita utilizando a relação presente no banco de dados de RTIs (*regulator-target interactions*)

(versão 2 - 2017) para calcular a correlação de Spearman entre reguladores de transcrição (RT) e seus genes-alvo. Inicialmente, a importância do aumento de expressão de cada gene foi avaliada com o teste estatístico *Willcoxon Rank Sum* e, em seguida, o filtro das entidades que deveriam ser selecionadas foi feito por *treshold* com a opção *smaller* selecionada. As análises de enriquecimento de pares regulador-alvo com correlação foram avaliadas com o teste Kolmorov-Smirnov e o p-valor ajustado foi calculado pelo método *Benjamini and Yekutieli*. A consistência das análises foi avaliada em um teste de *bootstrap* com 10.000 repetições.

A lista de genes classificados como reguladores de transcrição foi submetida a uma análise com a plataforma STRING (versão 11.0) (115) para identificação de *clusters* formados por interações proteína-proteína. As redes formadas foram importadas no Cytoscape (versão 3.8.2) (116) e seus nós foram coloridos de acordo com a variação de expressão medida em LFC para gene representado. Em paralelo, as listas de entrada no STRING foram submetidas a uma análise de enriquecimento de função e os nós das redes formadas foram coloridos de acordo com a associação da proteína representada a um termo enriquecido. Por último, as redes construídas com o STRING tiveram seus nós coloridos de acordo com a média aritmética dos valores de TPM obtidos com o RSEM para cada replicata.

4.7.8) Análise de lncRNA

Os genes codificantes para RNA que não são traduzidos em proteína foram identificados pela anotação de biotipo no Ensembl versão 100. Possíveis RNAs antissense foram testados contra seus alvos através da versão online da ferramenta LncTar (117).

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1: A CONSTRUÇÃO DE UM MUTANTE NULO PARA *ITGA4* E OBSERVAÇÃO DE FENÓTIPOS *IN VITRO*

A primeira parte dos resultados e discussão foi dedicada aos dados que descrevem e confirmam a mutagênese no gene *ITGA4*. Também são abordadas as observações de alterações fenotípicas no cultivo das células mutantes, o que indicou que não houve ação compensatória de outro gene na ausência de *ITGA4*.

5.1) Mutagênese dirigida por CRISPR/Cas9 e isolamento de um mutante *ITGA4*^{-/-}

O sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para clivar o primeiro éxon do gene *ITGA4* na linhagem de células Jurkat. O emprego da técnica de Surveyor permitiu a confirmação de que a população de células tratadas possuía mutações na região alvo do RNA guia (gRNA). Após o isolamento clonal por duas rodadas de diluição limitante, cinco linhas mutantes para o gene *ITGA4* foram congeladas. Um dos clones, intitulado de E8H4E5, foi isolado por mais uma rodada de diluição limitante. A região adjacente ao sítio reconhecido pelo gRNA foi amplificada por PCR a partir deste clone e sequenciada. Foi identificada uma inserção de 7 nucleotídeos (**Figura 13**) por erro espontâneo durante o reparo da clivagem cromossômica induzida por Cas9. Assim, o clone E8H4E5 passou a ser definido como célula mutante *ITGA4*-KO, e as células Jurkat parentais utilizadas para fazer a transgênese, e que foram mantidas em número de passagens similares às passagens das células mutantes, são referidas como células não mutantes WT.

A inserção nas células mutantes (NG_050623.1:g.5866_5867insGGGTCTT) promove uma quebra na fase de leitura aberta (*open reading frame*; ORF) com consequente terminação prematura da tradução da proteína. Na **Figura 13 A**, é apresentada a tradução dos códons dessa sequência e podemos ver que o 41º códon sinaliza para o término da tradução da proteína codificada pelo gene mutante. De acordo com o registro do gene *ITGA4* no InterPro (que pode ser acessado através do seu código no UniProt pelo endereço <https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/P13612>), os 33 primeiros aminoácidos da proteína correspondem à sequência do peptídeo sinal. O produto do gene mutante, formado pelos 40 primeiros aminoácidos deste gene, não pode exercer o papel da subunidade $\alpha 4$ por não conter os domínios necessários para a sua função.

(A)

```

atggcttgggaagcagaggcggaacccggccccgaagggccgctccgggagacggtg
M A W E A R R E P G P R R A A V R E T V
atgctggttgcctgtgcctgggggtcccgaccggccgcccctacagggctcttacgtggacac
M L L L C L G V P T G R P Y R V L R G H
tga*gagcgcgctgctttaccagggcccccaaacacgctgttcggctactcggctcgtgct
*
gcacagccacggggcgaaccgat
    
```

(B)

Homo sapiens integrin subunit alpha 4 (ITGA4), RefSeqGene on chromosome 2
 Sequence ID: [NG_050623.1](#) Length: 89037 Number of Matches: 1

Range 1: 5764 to 5959 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 329 bits(178) | 1e-86 | 196/203(97%) | 7/203(3%) | Plus/Plus |
| Query 1 | ATGGCTTGGGAAGCGAGGCGCGAACCCGGCCCCGAAGGGCCGCGTCCGGGAGACGGTG | 60 | | |
| Sbjct 5764 | ATGGCTTGGGAAGCGAGGCGCGAACCCGGCCCCGAAGGGCCGCGTCCGGGAGACGGTG | 5823 | | |
| Query 61 | ATGCTGTTGCTGTGCCTGGGGGTCCCGACCGGCCGCCCTACAGGGTCTTACGTGGACAC | 120 | | |
| Sbjct 5824 | ATGCTGTTGCTGTGCCTGGGGGTCCCGACCGGCCGCCCTACA-----ACGTGGACAC | 5876 | | |
| Query 121 | TGAGAGCGCGCTGCTTTACCAGGGCCCCACAACACGCTGTTTCGGCTACTCGGTCGTGCT | 180 | | |
| Sbjct 5877 | TGAGAGCGCGCTGCTTTACCAGGGCCCCACAACACGCTGTTTCGGCTACTCGGTCGTGCT | 5936 | | |
| Query 181 | GCACAGCCACGGGGCGAACCGAT | 203 | | |
| Sbjct 5937 | GCACAGCCACGGGGCGAACCGAT | 5959 | | |

Figura 13) Sequência obtida a partir da PCR para amplificar o éxon 1 da linhagem mutante para o gene *ITGA4*

(A) Tradução da sequência correspondente ao fragmento amplificado. A inserção de 7 nucleotídeos (letras sublinhadas) acarretou uma quebra na fase de leitura aberta e o aparecimento do códon de parada marcado em vermelho. (B) Alinhamento da sequência amplificada por PCR à sequência do gene *ITGA4*. A sequência obtida foi alinhada por BLASTn à sequência do gene *ITGA4* no cromossoma 2 do genoma humano, evidenciando uma inserção de 7 nucleotídeos na linhagem mutante.

A ausência da cadeia $\alpha 4$ de integrina (ou CD49d; codificada pelo gene *ITGA4*) nas células mutantes foi verificada por citometria de fluxo e a população de células do clone E8H4E5 mostrou-se incapaz de expressar a proteína, o que é indicador de um mutante nulo *ITGA4*^{-/-}. Na **Figura 14**, é exposto o resultado da citometria de fluxo para verificar a presença de CD49d na superfície celular. Um resultado semelhante foi encontrado na citometria de fluxo com as células permeabilizadas antes da adição do anticorpo anti-CD49d, demonstrando que a proteína não está presente nem mesmo no interior da célula. Como a integrina VLA-4 está acumulada majoritariamente na membrana da célula, a análise com e sem permeabilização de membrana deram resultados muito parecidos e optamos por mostrar apenas o resultado da análise de expressão membranar.

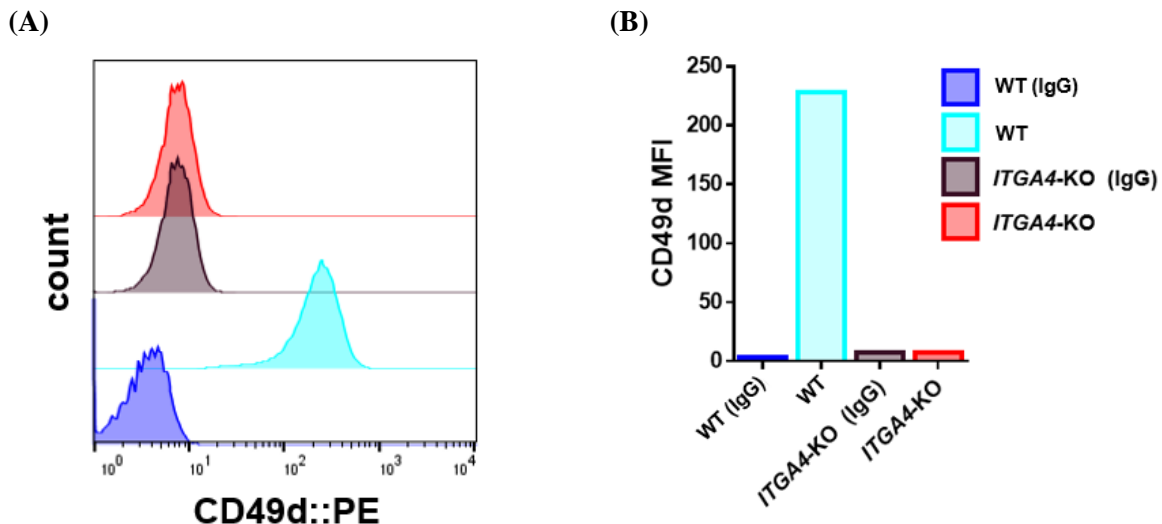


Figura 14) Análise por citometria da expressão membranar da integrina $\alpha 4$ (CD49d) em células mutantes (clone E8H4E5) e não mutantes para o gene *ITGA4*

(A) histograma mostrando a ausência da marcação do anticorpo anti- $\alpha 4$ em células mutantes. (B) média da intensidade de fluorescência (MFI) mostrando a abundância de $\alpha 4$ na superfície das células

5.2) Alterações no cultivo

No manuseio do cultivo das células mutantes foi possível observar alterações de velocidade de crescimento e tamanho celular. Estas diferenças foram mensuradas como descrito a seguir.

5.2.1) Curva de crescimento das células mutantes e não mutantes

As células Jurkat WT e ITGA4-KO possuem a mesma taxa de crescimento quando as condições do meio de cultivo são ideais. Entretanto, em experimentos de contagem celular, as células mutantes atingiram a fase de desaceleração com pelo menos 24 horas de atraso e com uma concentração superior ao observado para as células não mutantes (**Figura 15**).

Para quantificar os parâmetros da curva de crescimento, os dados de concentração celular obtidos foram ajustados com o modelo de crescimento celular exposto na **Equação 1**. As curvas de crescimento com os dados ajustados estão dispostas na **Figura 56** do ANEXO 2. Para a curva de crescimento de cada triplicata experimental, foram calculadas as métricas: sigma, concentração inicial ajustada (n_0), tempo para a população atingir a metade da densidade máxima populacional (t_{mid}), área sob a curva calculada pela integral da equação logística (auc_l), área empírica sob a curva (auc_e), capacidade de carga (k), taxa de crescimento intrínseca da população (r) e tempo de duplicação (t_{gen}). Sigma é a soma dos quadrados dos resíduos para o ajuste da curva e, quanto maior o seu valor, pior os dados se encaixam no modelo de equação logística. Das 18 amostras analisadas, entre WT e KO, apenas duas triplicatas foram consideradas pontos isolados e com pior ajuste ao modelo (**Figura 16**).

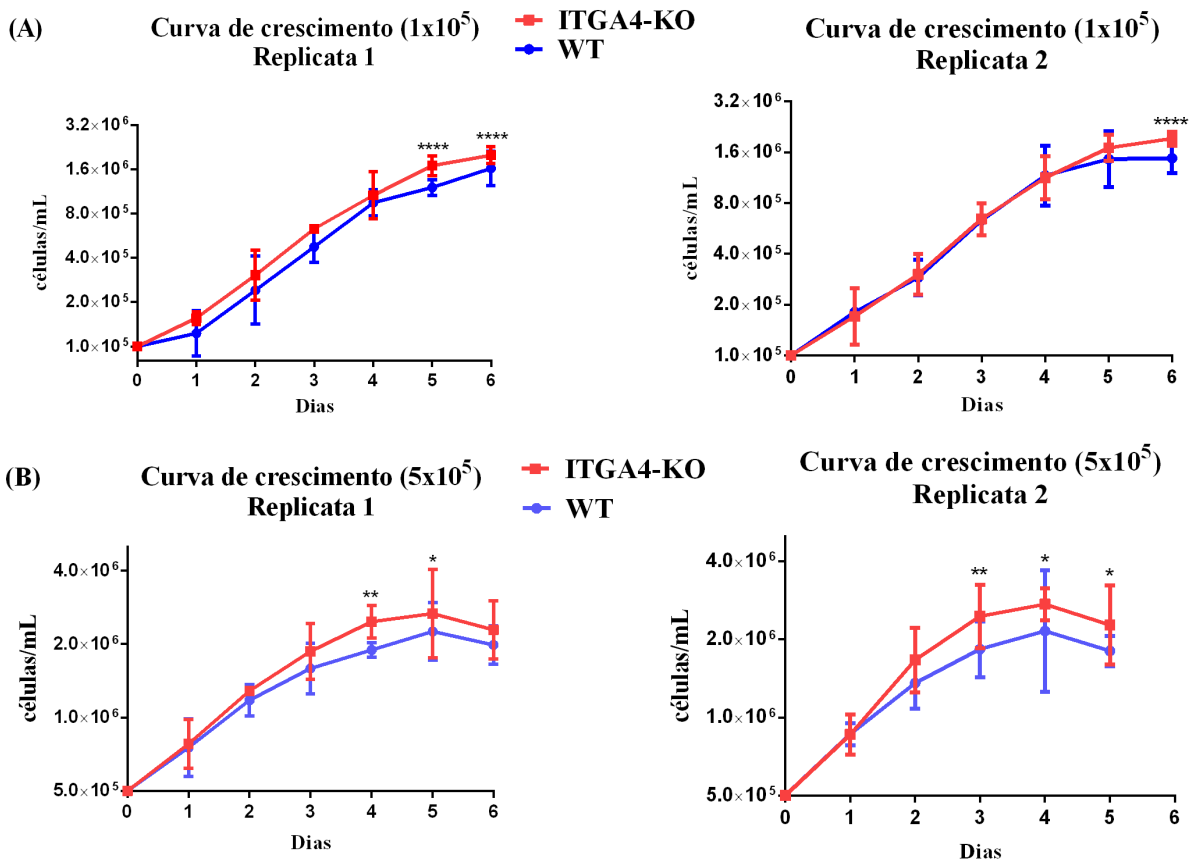


Figura 15) Comparação do crescimento das células ITGA4-KO e WT

(A) Curva de crescimento celular iniciada com a concentração de 10^5 células/mL. (B) Curva de crescimento celular iniciada com a concentração de 5×10^5 células/mL. Os experimentos foram feitos em duplicata biológica com triplicata experimental e analisados pelo método estatístico *two-way* ANOVA. **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$ e * indica $p \leq 0,05$ para a comparação das médias dos dois cultivos em um mesmo dia. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de um mesmo cultivo do dia 0 ao penúltimo dia. As diferenças entre as médias entre o penúltimo e último dia para um mesmo cultivo não foram significativas.

As únicas métricas que apresentaram significância estatística na diferença entre as médias encontradas para as células WT e KO foram k , auc_l e auc_e . A capacidade de carga, ou a população máxima suportada em um dado meio, é maior para as células ITGA4-KO. Apesar de não termos quantificado a ocorrência de morte celular durante a realização destes ensaios, foi possível observar um elevado número de células mortas para os experimentos inicializados com $5,0 \times 10^5$ células/mL. Nestes casos, os cultivos com células mutantes apresentaram um número elevado de células mortas um dia antes do término do experimento, isto é, dia 5 para a replicata 1 e dia 4 para a replicata 2. Já as células WT desaceleraram o crescimento antes das células ITGA4-KO e só apresentaram alta mortalidade no dia em que o experimento foi interrompido. Levando em consideração que a capacidade de carga calculada para as células ITGA4-KO é maior e que estas células começam a morrer antes das WT, nós

postulamos que as células mutantes apresentam uma desregulação do ajuste da sua taxa de crescimento às modificações ocorridas no meio de cultivo, como acúmulo de metabólitos e escassez de nutrientes.

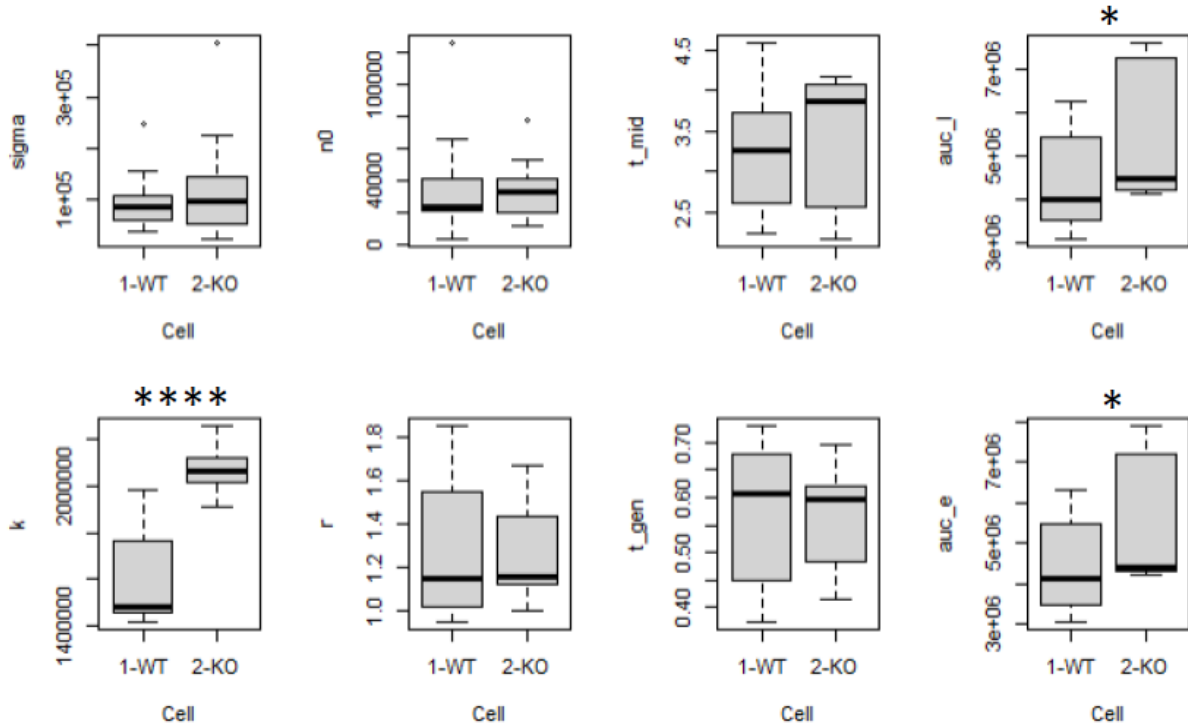


Figura 16) Métricas calculadas a partir das curvas de crescimento ajustadas

As curvas de crescimento foram ajustadas com o emprego do modelo matemático exposto na **Equação 1**. A diferença entre as médias foi testada pelo método de Wilcoxon e os asteriscos representam a confiabilidade de acordo com o p-valor: **** indica um p-valor $\leq 0,0001$; * indica um p-valor $\leq 0,05$. São representadas as métricas: soma dos quadrados dos resíduos para o ajuste da curva (sigma), concentração inicial ajustada (n0), tempo para a população atingir a metade da densidade máxima populacional (t_mid), área sob a curva calculada pela integral da equação logística (auc_l), área empírica sob a curva (auc_e), capacidade de carga (k), taxa de crescimento intrínseca da população (r) e tempo de duplicação (t_gen)

Considerando essa possível desregulação na sensibilidade às alterações do meio pelas células ITGA4-KO, decidimos testar se estas linhagens secretam alguma molécula que pudesse interferir no crescimento da cultura utilizando o meio condicionado pelo cultivo de células mutantes e não mutantes. As células ITGA4-KO continuaram a crescer mais que as células WT, independentemente do tipo de meio condicionado, e não observamos nenhuma variação entre as médias com significância estatística para o mesmo tipo celular nos diferentes tipos de meio (**Figura 17**). Esse resultado indica que as diferenças observadas entre o crescimento das duas linhagens não são devido a um fator específico secretado no meio de cultura.

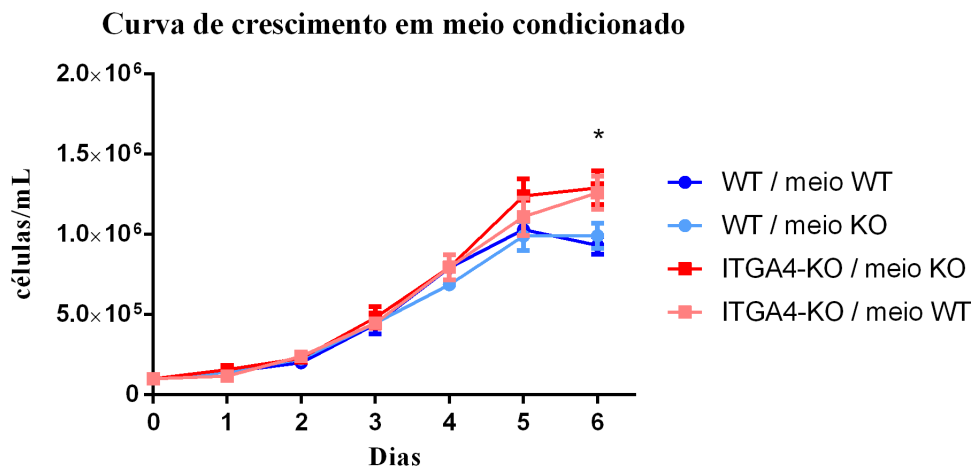


Figura 17) Curva de crescimento com meio condicionado

Os meios 1 e 2 são compostos por 50% de meio novo e 50% de meio de um cultivo anterior de células mutantes e não mutantes, respectivamente. O asterisco indica que a hipótese nula de diferenças entre as médias foi refutada com suporte de um p-valor menor ou igual a 0.05 (ANOVA).

5.2.3) Análise de tamanho de células mutantes e não mutantes

A área das células ITGA4-KO e WT foi medida em duas concentrações denominadas de alta e baixa. A concentração baixa é inferior a $1,8 \times 10^6$ células/mL e a concentração alta foi de $2,2 \times 10^6$ células/mL. As células não mutantes apresentam uma média de tamanho superior à média obtida para as células mutantes em ambas as concentrações. As células WT cultivadas em concentrações mais baixas apresentam um tamanho maior do que todas as outras condições avaliadas. De forma interessante, nós observamos que, a partir de uma densidade de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/mL, a cultura não mutante muda o seu tamanho médio, enquanto as células ITGA4-KO não apresentaram variação de tamanho entre as populações de baixa e alta concentração (**Figura 18**).

Nas interações intercelulares e com a ECM, as integrinas têm papel central como pontos de ancoragem dos filamentos de actina na membrana plasmática, além de influenciarem na dinâmica de polimerização do citoesqueleto. Por causa dessas características, essa classe de proteínas estaria intimamente relacionada ao controle do tamanho celular. Embora não haja evidências claras sobre o papel da ativação de integrinas e a mudança de volume celular, essas moléculas têm sido implicadas como sensores de volume celular regulado por canais iônicos (118,119). Assim, podemos postular que a perda de função do gene *ITGA4* poderia gerar fenótipos com alteração do formato e volume celular. Nesse sentido, foi reportado que a deleção da cadeia $\beta 1$ de integrinas em hepatócitos de camundongos promove um fenótipo de hipertrofia celular *in vivo* (120). Em 2003, foi reportada uma comparação dos níveis de expressão da integrina $\beta 1$ em duas populações de adipócitos com tamanhos diferentes e

extraídas de uma mesma região tecidual. O grupo de adipócitos com maior volume expressava maiores níveis de integrina $\beta 1$, assim como maiores níveis de ativação de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (121).

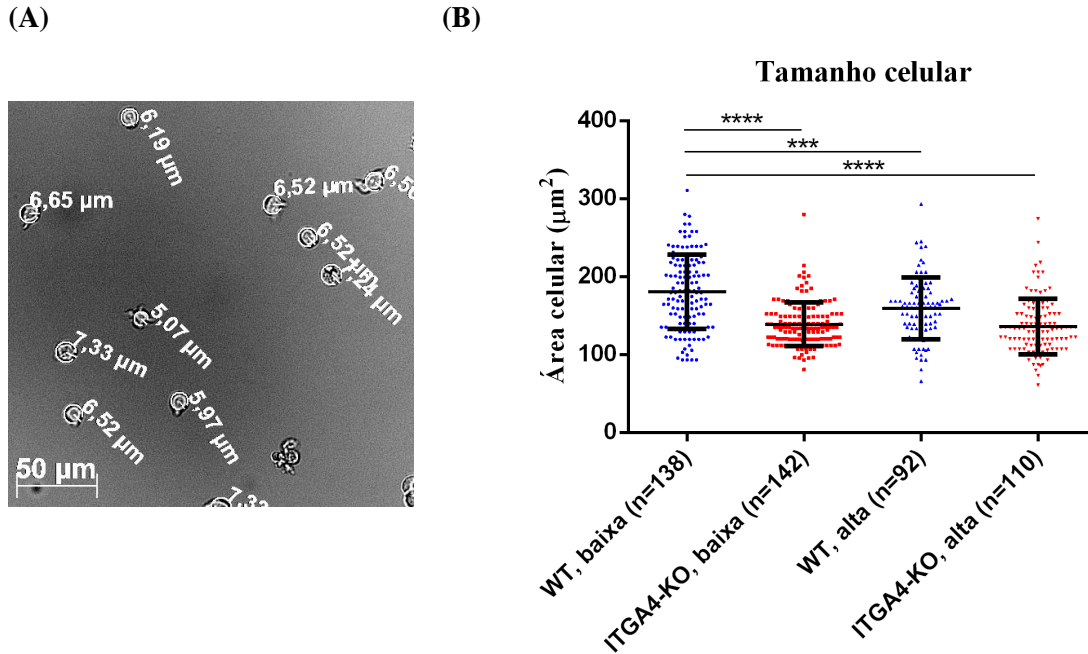


Figura 18) Medida de tamanho celular de células mutantes e não mutantes em condições de alta e baixa concentração celular

(A) Fotografia mostrando o tamanho do raio medido para células ITGA4-KO em baixa concentração. **(B)** Gráfico mostrando a média e o desvio padrão medido para as células ITGA4-KO e WT em alta e baixa concentração. A denominação concentração baixa indica $\leq 1,8 \times 10^5$ células/mL e a denominação concentração alta equivale a $2,2 \times 10^6$ células/mL). Três asteriscos indicam que a diferença entre as médias possui significância estatística com $p \leq 0,001$, enquanto que quatro asteriscos sinalizam para uma significância estatística suportada por $p \leq 0,0001$. A hipótese nula de diferença entre as médias foi refutada pelo método ANOVA.

5.3) Conclusão parcial da primeira parte dos resultados e discussão

A mutagênese dirigida por CRISPR/Cas9 possibilitou a criação de uma linhagem de células Jurkat que não são capazes de produzir a cadeia $\alpha 4$ de integrina. De imediato, através da observação de alterações fenotípicas no cultivo de célula ITGA4-KO, foi possível determinar que não houve compensação funcional do *ITGA4* pela atividade de outro gene.

A alteração de tamanho para uma célula que perdeu uma proteína com capacidade de controlar e remodelar o citoesqueleto de actina é um fenótipo esperado. Entretanto, a aparente perda de capacidade de ajuste do crescimento às condições do meio, observada nos cultivos de células ITGA4-KO, não era esperada.

6) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2: RNA-SEQ COMO FERRAMENTA DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A segunda parte dos resultados e discussão apresenta os dados obtidos durante a realização do RNA-Seq, quantificação da expressão gênica e identificação dos genes DE. Como optamos pela utilização de dois protocolos distintos para a análise dos dados transcriptoma, foi possível observar diferenças nos resultados obtidos com cada um dos métodos. Este capítulo aborda estas diferenças e aponta como trabalhamos para indexar todos os resultados de expressão diferencial em um único conjunto de dados para as análises subsequentes.

6.1) Produção de RNA de alta qualidade e sequenciamento

Para melhor entender as modificações geradas nas células Jurkat pela deleção da integrina $\alpha 4$ e suas possíveis interferências no processo de ativação das células T, foi realizado um sequenciamento massivo de RNA total.

Foram gerados aproximadamente 30 μ g de RNA total para 12 amostras em triplicata de células mutantes e não mutantes nas condições de ativação e não ativação: as amostras 1, 2 e 3 são provenientes de células não mutantes e não ativadas; as amostras 4, 5 e 6 foram geradas a partir de células mutantes e não ativadas; as amostras 7, 8 e 9 são de células não mutantes e com 4 horas de ativação; as amostras 10, 11 e 12 foram extraídas de células mutantes ativadas por 4 horas. O resultado do teste feito com o *bioanalyzer* indicou que o material estava em boas condições para sequenciar como mostrado na **Figura 19**. O RIN (*RNA integrity number*) foi superior a 8,5 para todas as amostras exceto a de número 9 (células não mutantes com 4 horas de ativação) que ficou igual a 7,5. A amostra número 12 (células mutantes com 4 horas de ativação) não foi medida em *Bioanalyzer* por falta de espaço no chip de corrida.

Todas as amostras apresentaram picos bem definidos e proeminentes (acima ou arredor de 100 FU) e com peso molecular compatível com moléculas de aproximadamente 200, 2000 e 4000 nt. O primeiro deles corresponde a moléculas de tRNA 5S e 5.8S abundantes em amostras de RNA obtidas por extração com Trizol. Os dois picos subsequentes correspondem a moléculas de tRNA 18S e 28S respectivamente. A amostra 9 (WT4h#2) apresentou uma pequena elevação da linha de base ao redor dos picos referentes aos tRNA 18S e 28S, o que refletiu na redução do seu valor de RIN, mas que não comprometeu a qualidade do seu sequenciamento.

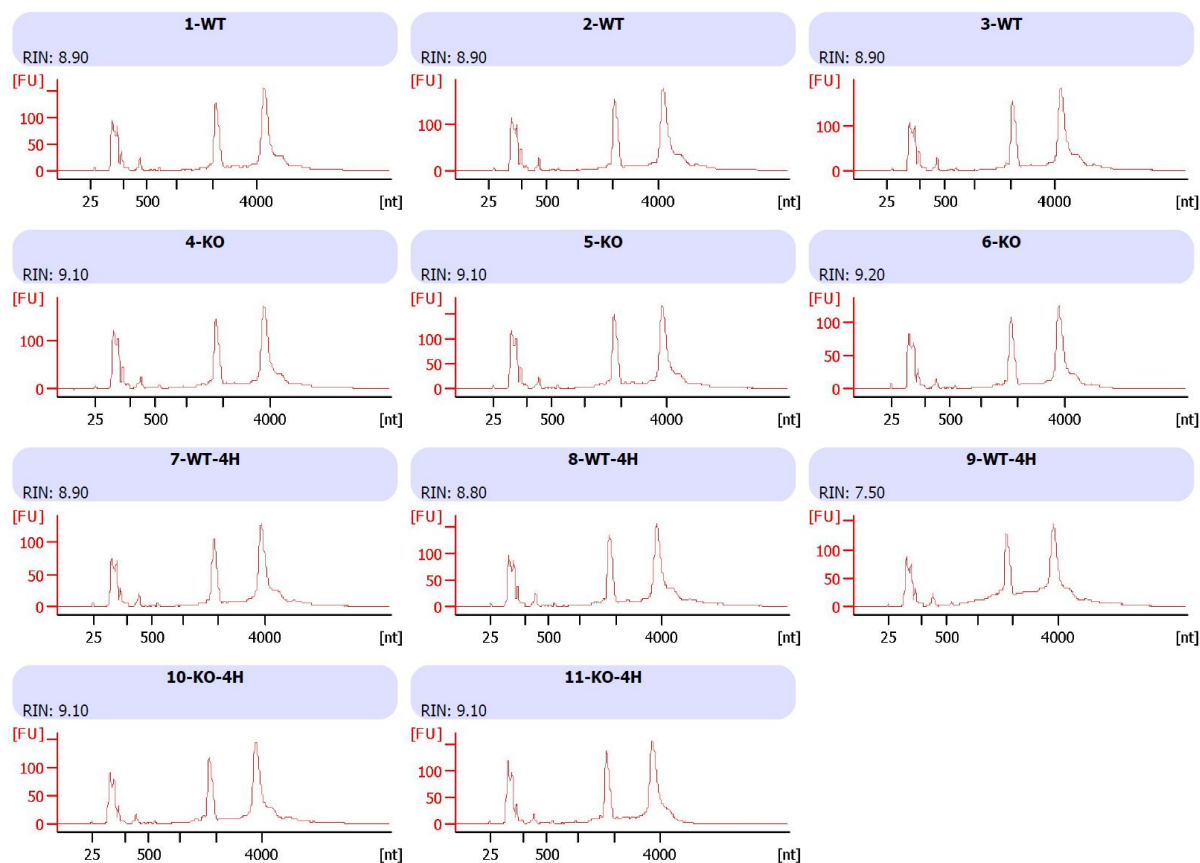


Figura 19) Resultado Gráfico do bioanalyzer

O símbolo 4H indica o tempo de 4 horas que as células foram tratadas com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. No eixo Y é apresentada a massa relativa medida através da intensidade de fluorescência FU (*fluorescent units*) e no eixo X é apresentado o tamanho molecular medido em nucleotídeos (nt).

As preparações de RNA total foram sequenciadas gerando leituras pareadas com 75 nucleotídeos de cada lado do fragmento de RNA. O número de leituras pareadas obtidas por amostra ficou entre 22,7 a 28,3 milhões. No ANEXO 3 (**Figura 57** e **Figura 58**), são mostrados exemplos de relatórios obtidos com o programa FastQC para a qualidade média por base e o percentual de contaminação de adaptador por base. Todos os relatórios obtidos indicaram uma excelente qualidade do dado gerado. Os números do total e percentual de leituras pareadas remanescentes ao tratamento com os filtros de qualidade do programa Trimmomatic são expostos na **TABELA 2**.

Apenas a amostra WT#0 apresentou uma contaminação por rRNA (*ribosomal RNA*) superior ao limite de 10%, entretanto não foi possível detectar comprometimento das análises subsequentes com essa amostra. Os números referentes a esses resultados estão apresentados na **TABELA 2**. Cada uma das triplicatas para essas amostras biológicas foi nomeada com números de 0 a 2.

TABELA 2) resultado do sequenciamento de RNA

| Amostra | Nº de leituras inicial | Nº de leituras pareadas após tratamento | % de leituras pareadas após tratamento | % rRNA |
|---------|------------------------|---|--|--------|
| WT#0 | 26.799.337 | 24.995.971 | 93,27 | 23,69 |
| WT#1 | 24.274.505 | 22.708.435 | 93,55 | 5,87 |
| WT#2 | 23.579.715 | 22.124.141 | 93,83 | 3,12 |
| WT4h#0 | 27.275.956 | 25.743.380 | 94,38 | 0,67 |
| WT4h#1 | 27.185.826 | 25.715.832 | 94,59 | 0,58 |
| WT4h#2 | 27.103.945 | 25.297.606 | 93,34 | 0,66 |
| KO#0 | 23.520.708 | 22.211.021 | 94,43 | 2,73 |
| KO#1 | 26.830.604 | 25.389.862 | 94,63 | 4,19 |
| KO#2 | 24.774.868 | 22.996.685 | 92,82 | 2,82 |
| KO4h#0 | 28.278.224 | 26.237.413 | 92,78 | 0,42 |
| KO4h#1 | 22.667.755 | 21.290.319 | 93,92 | 0,21 |
| KO4h#2 | 23.149.359 | 21.608.050 | 93,34 | 0,31 |

6.2) Quantificação de expressão gênica

As leituras pareadas de boa qualidade foram processadas por dois protocolos distintos para aumentar a confiabilidade e sensibilidade das análises. Neste trabalho, estes dois protocolos são referenciados como Cufflinks e DESeq2, salientando que todos os programas empregados, desde o alinhamento ao genoma até a identificação dos genes diferencialmente expressos, foram distintos (**Figura 10** e **Figura 12**).

Os resultados da quantificação das amostras foram visualizados através de gráficos MDS (*multi-dimensional scaling*) ou PCA (*principal component analysis*) para confirmarmos que as diferenças entre as amostras decorrentes dos tratamentos/intervenções é maior do que as diferenças refletindo variações experimentais (intra-grupo). A redução dimensional obtida para os dados analisados com o Cufflinks e DESeq2 ficaram bastante semelhantes e o gráfico obtido com os dados processados pelo primeiro está exposto na **Figura 20**. Quatro grupos contendo as triplicatas de cada condição biológica foram facilmente identificados em ambos os gráficos.

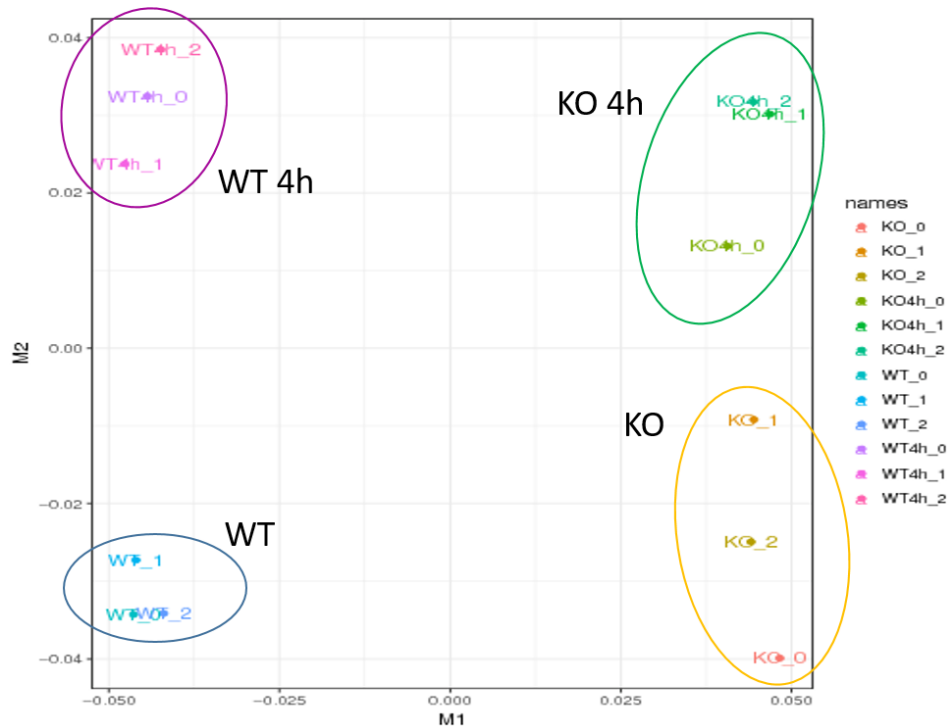


Figura 20) MDS (*multi-dimensional scaling*) plote com resultado do Cufflinks
 Grupos formados por triplicatas de uma mesma condição biológica estão marcados por elipses.

6.3) Análise de expressão diferencial

6.3.1) Resultados obtidos com o pipeline do Cufflinks e DESeq2

Foram identificados um total de 3.411 e 3.765 genes diferencialmente expressos (DE) pelas análises com os pipelines do Cufflinks e do DESeq2, respectivamente. Na **Figura 21**, são apresentados os números de genes DE com FDR (*False Discovery Ratio*) menor ou igual a 5% para as 6 possíveis comparações (**Figura 11**) entre as 4 amostras sequenciadas. Os genes DE entre as amostras WT e KO ultrapassam o número de genes DE entre as amostras WT e WT4h em mais de 5 vezes. Esse resultado indica que a deleção do gene *ITGA4* afetou mais profundamente o estado funcional das células Jurkat do que o processo de mimetização da ativação via TCR.

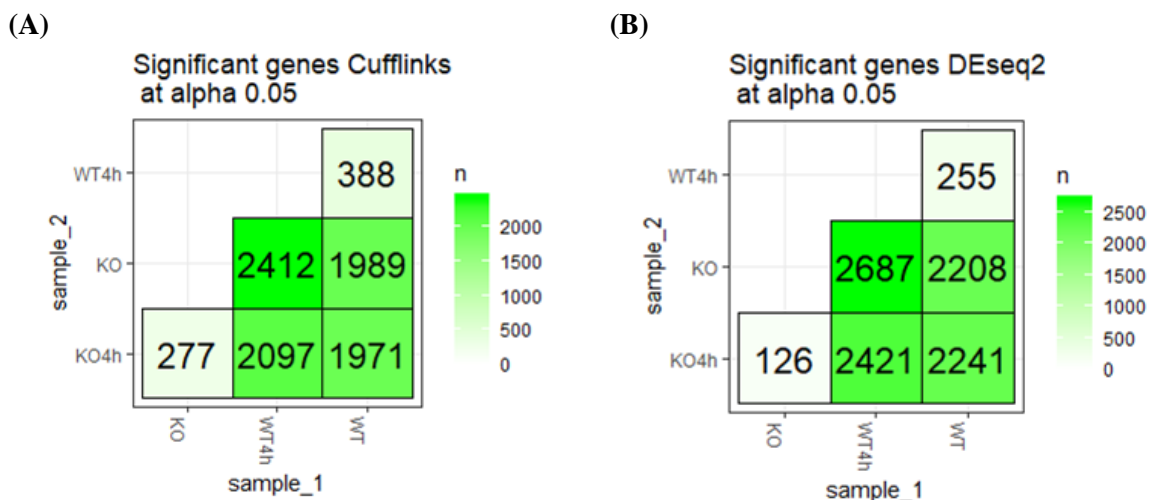


Figura 21) Número de genes diferencialmente expressos por cada comparação entre amostras (A) resultados obtidos com o Cufflinks (B) resultados obtidos com o DESeq2. A contagem de genes DE foi feita pela ID do cufflinks para a imagem A e pela ID do ensembl para a imagem B.

Em concordância com essa observação, a análise de dispersão comparando os valores de FPKM, obtidos com o protocolo do Cufflinks, indica que a amplitude das variações observadas nas comparações entre as células ITGA4-KO e WT são maiores que as amplitudes observadas nas comparações com o mesmo tipo celular antes e após o processo de ativação (**Figura 22**). Em um gráfico de dispersão comparando valores de expressão entre duas condições experimentais, genes que possuem exatamente o mesmo índice de expressão nas duas condições são representados em uma diagonal perfeita, cuja representação na **Figura 22** é feita por uma linha tracejada. Quanto mais para a esquerda um ponto está, mais expresso ele é na condição controle, e quanto mais divergentes forem os valores de expressão entre duas condições para um mesmo gene, mais o ponto se distancia da linha diagonal. Este resultado corrobora a observação de que a deleção gênica do *ITGA4* impactou de forma mais significativa o perfil de expressão das células Jurkat em comparação com o processo de ativação com antiCD3/CD28.

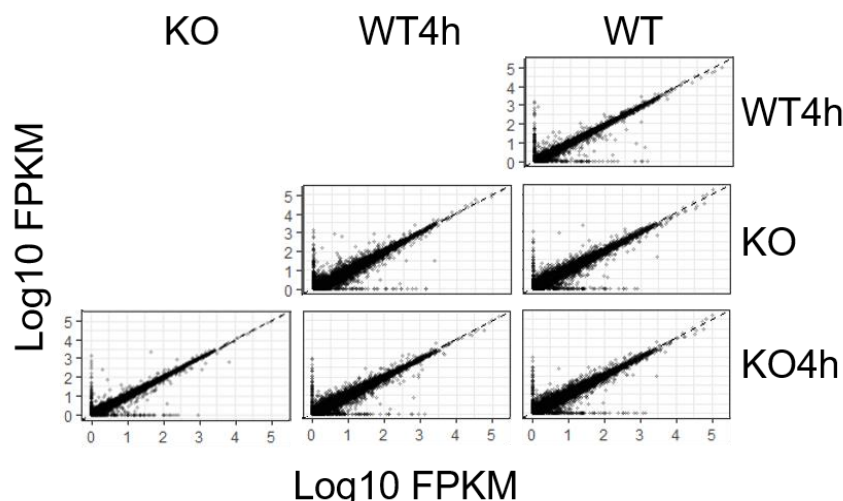


Figura 22) Gráfico de dispersão evidenciando a diferença de expressão entre amostras

O cálculo do FPKM foi feito com o protocolo do Cufflinks. A linha tracejada diagonal é a posição onde os genes que não possuem diferença de expressão estariam posicionados. Quanto mais um gene se diferencia dessa linha, maior é a amplitude da diferença de expressão entre as duas amostras.

As análises com o Cufflinks foram baseadas em uma anotação *de novo* feita com programa StringTie que as vezes erra ao resolver *loci* gênicos muito próximos. Através da comparação da anotação *de novo* com a anotação do Ensembl versão 83, foi possível remover todos os *loci* com problemas de resolução na análise com o StringTie. Após a remoção dos genes com anotação divergente, as análises com o Cufflinks ficaram com 3166 genes diferencialmente expressos nas 6 possíveis comparações.

Por entendermos que os dois métodos de análise adotados possuem suas vantagens e desvantagens, optamos por juntar todos os resultados de expressão diferencial em um único conjunto de dados e classificar os genes como: i) diferencialmente expressos para ambos (a interseção entre os dois resultados); ii) apenas para o método do Cufflinks; iii) apenas para o método do DESeq2. Dessa forma, foi possível trabalhar com um conjunto de resultados com maior confiabilidade, por serem genes detectados por ambos os métodos, sem excluir os genes detectados por apenas um deles. A junção dos resultados das análises de expressão diferencial foi feita por gene em uma dada comparação, o que foi denominado de atributo. Os genes DE detectados por ambos os métodos que divergiam demasiadamente nos valores de LFC foram descartados. Além destes, outros quatorze atributos foram removidos por possuírem resultados antagônicos entre o DESeq2 e o Cufflinks, ou seja, enquanto um dos métodos indicava um aumento de expressão, o outro sinalizava para uma redução. Na **Figura 23 A**, é representado um histograma com o número de atributos agrupados pela diferença de LFC obtida entre os dois métodos. Os atributos com valores de LFC com discrepância superior a 2 vezes foram

descartados. O Cufflinks considera o valor de LFC para os genes com ausência de expressão em umas das duas condições como o limite tendendo ao infinito positivo ou negativo. Os atributos da interseção em que o resultado do Cufflinks tendia ao infinito também foram descartados e não estão representados na **Figura 23 A**. O número de genes DE na interseção dos dois métodos é apresentado na **Figura 23 B**.

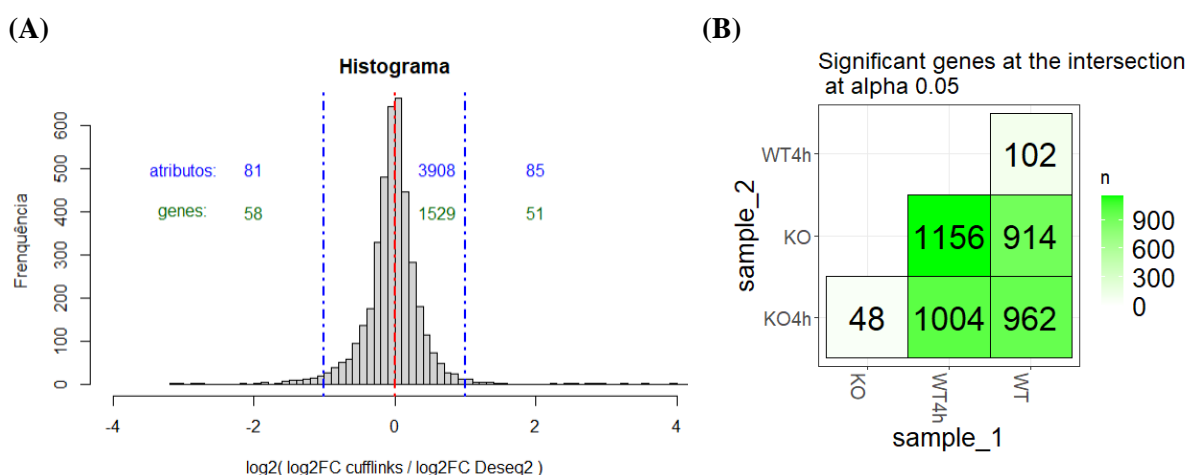


Figura 23) Atributos compostos por genes diferencialmente expressos de acordo com as análises feitas com o Cufflinks e DESeq2

(A) Histograma de atributos agrupados pelo valor do log na base 2 da razão entre o LFC do Cufflinks sobre o LFC do DESeq2. As linhas azuis descontinuas representam o ponto de corte para a diferença entre estes valores para um mesmo atributo (-1 e 1). Um atributo corresponde a um gene DE em uma das 6 comparações possíveis (**Figura 11**). (B) Número de genes diferencialmente expressos detectados por ambos os métodos e que constituem o conjunto de dados de maior confiabilidade. A contagem de genes DE foi feita pelas IDs do ensembl.

Após juntar os resultados de expressão diferencial e filtrar todos os atributos divergentes acima de duas vezes e os genes com problemas na anotação feita pelo StringTie, sobraram 3.166 genes DE validados pelo Cufflinks, 3697 validados pelo DESeq2 e total de 5246 genes DE. Como pode ser observado na **Figura 24**, menos da metade do total de genes diferencialmente expressos possuíam validação estatística por ambos os protocolos adotados. O método do DESeq2 identificou um maior número de genes DE nas comparações entre células ITGA4-KO e células WT, enquanto que o método do Cufflinks detectou um maior número de genes DE nas comparações entre um mesmo tipo celular antes e depois do processo de ativação com anticorpos.

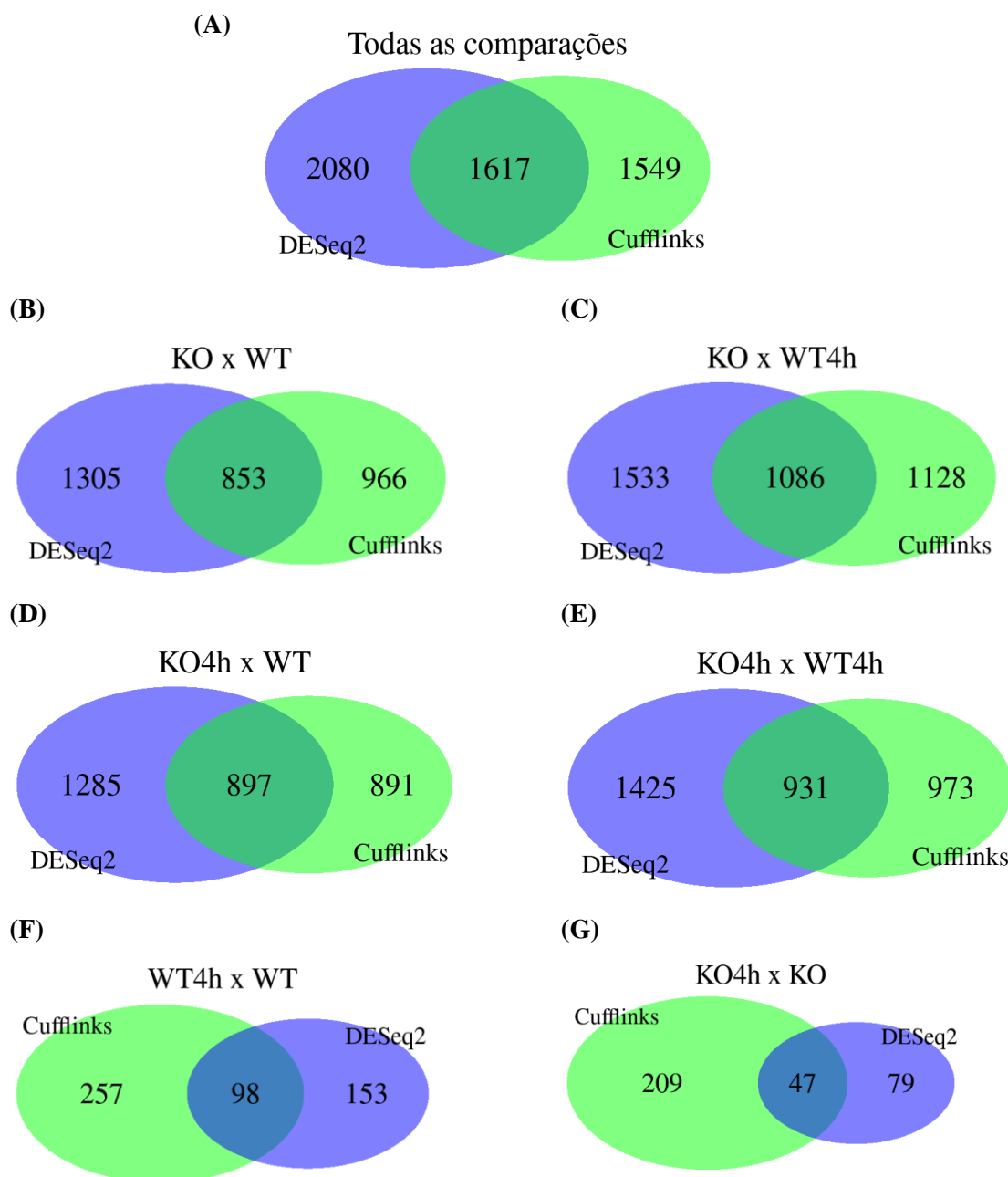


Figura 24) Diagramas de venn comparando nomes de genes diferencialmente expressos detectados com os protocolos do Cufflinks e DESeq2

(A) todas as 6 comparações possíveis (B) KO vs WT; (C) KO vs WT4h; (D) KO4h x WT; (E) WT4h vs WT; (F) KO4h vs WT; (G) KO4h vs KO.

Na **Figura 25**, são apresentadas as 10 maiores variações de expressão negativas e positivas para ambos os métodos. É possível observar que o DESeq2 detectou uma menor amplitude de variação durante o processo de ativação celular, principalmente para os genes regulados negativamente. Foi justamente nestas comparações que o número de genes DE detectados pelo Cufflinks foi maior que o número de genes DE detectados pelo DESeq2 (**Figura 24**).

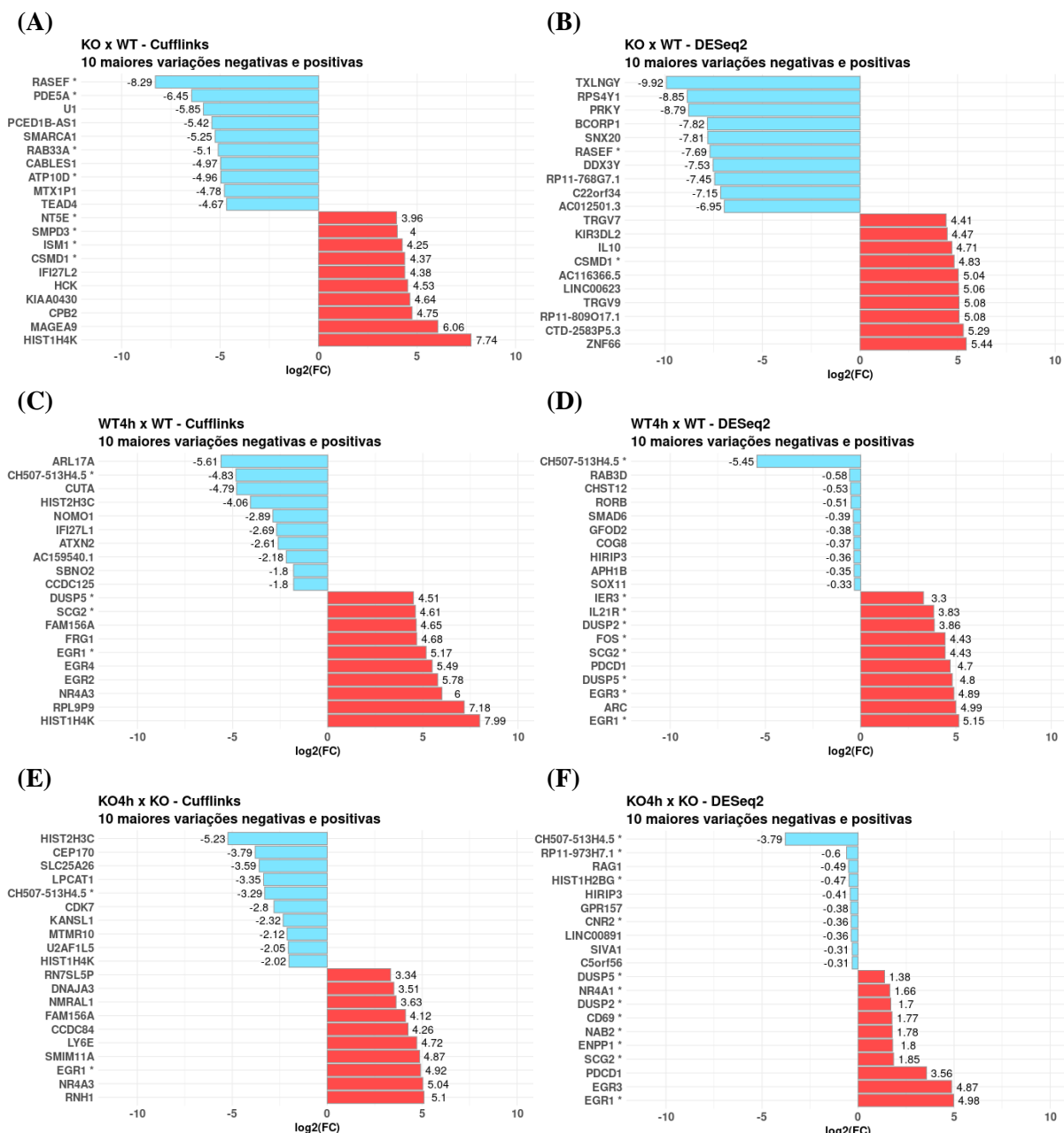


Figura 25) Gráfico de barra mostrando o LFC obtido para as 10 maiores variações de expressão negativas e positivas para cada um dos métodos utilizados

(A) (B) comparação KO vs WT; (C) (D) comparação WT vs WT4h. (E) (F) comparação KO vs KO4h. As imagens A, C e E correspondem as análises feitas com o Cufflinks e as imagens B, D e F correspondem as análises feitas com o DESeq2. Os genes marcados com asteriscos foram classificados como diferencialmente expressos por ambos os métodos. As variações do método do Cufflinks que tendem ao infinito não foram consideradas para a criação destes gráficos.

6.3.2) Genes DE não codificantes para proteína

Dentre as 6 comparações possíveis, foram identificados 449 genes diferencialmente expressos que são codificantes de RNA não traduzidos em proteína. Na **Figura 59** do ANEXO

4, é exposta uma quantificação destes genes de acordo com o biotipo do RNA. A categoria de genes que dão origem a RNA longos não codificantes (lncRNA) contém 416 destes genes DE.

Os lncRNA constituem o maior grupo de RNA não codificantes produzidos pelo genoma e são definidos como os transcritos com mais de 200 nucleotídeos que não são traduzidos em proteína. Esse tipo de RNA atua por interação com proteínas, RNA, DNA ou uma combinação dessas classes moleculares. Suas funções podem ser determinadas por sua localização, sequência e/ou estrutura secundária e apenas aproximadamente 3% dos lncRNA anotados possuem função atribuída. Apesar dos avanços no conhecimento sobre essa classe de RNA na última década, este ainda permanece um campo pouco explorado na imunologia (122). Nesta tese é abordada a possível função do lncRNA CACNA1C-AS1 nas células ITGA4-KO como será visto mais adiante, na quinta parte dos resultados e discussão, na seção sobre a mobilização intracelular de cálcio.

6.4) Conclusão parcial da segunda parte dos resultados e discussão

Foi produzido um RNA de alta qualidade para células Jurkat ITGA4-KO e WT, tratadas e não tratadas com anticorpos ativadores (anti-CD3 e anti-CD28). Este material foi sequenciado com excelente performance atingindo alta profundidade e reprodutibilidades entre as replicatas, otimizando a caracterização molecular dos efeitos gerados pela inativação do *ITGA4*. Este dado foi analisado em paralelo com dois pipelines distintos (Cufflinks e DESeq2) que apresentaram divergências esperadas na quantificação de expressão e detecção de genes DE. Não nos aprofundamos nas diferenças entre os métodos porque o objetivo deste trabalho é a interpretação biológica das variações fenotípicas encontradas nas células mutantes. Ambos os métodos são amplamente aceitos pela comunidade científica e os genes DE detectados por apenas um deles foram considerados. Além disso, possuímos um conjunto de genes DE com maior confiabilidade por terem expressão diferencial validada por ambos os métodos.

Os dois métodos indicaram com bastante nitidez que o número de genes DE entre as comparações que avaliam o efeito da mimetização da ativação via TCR é muito menor que o número de genes DE nas comparações entre as células ITGA4-KO e WT. Isto significa que a inativação de *ITGA4* teve um impacto muito maior sobre a atividade do genoma das células Jurkat do que aquela atividade observada após o tratamento com anticorpos ativadores.

7) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 3: A ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE FUNÇÃO INDICOU UM AUMENTO DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ATIVAÇÃO E À REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO NAS CÉLULAS ITGA4-KO

A terceira parte dos resultados e discussão é dedicada às análises funcionais do RNA-Seq que indicaram um perfil transcricional compatível com o processo de ativação de uma célula T. As análises funcionais também apontaram para a variação de moléculas de adesão que são abordadas mais adiante na quinta parte dos resultados e discussão, onde são descritas as alterações de expressão de moléculas de membrana e os fenótipos celulares associados.

7.1) Enriquecimento de função na comparação ITGA4-KO vs WT

7.1.1) Análise funcional frente às anotações do GO

Com o intuito de identificarmos as funções biológicas que estavam alteradas nas células mutantes, analisamos o enriquecimento de funções, com base nas anotações do GO e do KEGG, para a comparação KO vs WT. Ao analisarmos todos os genes diferencialmente expressos na comparação KO vs WT frente a todos os genes detectados por ambos os métodos, obtivemos apenas o enriquecimento de 10 termos do GO com um p-valor ajustado menor ou igual a 0,05 (**Figura 26 A**). A mesma análise foi repetida utilizando apenas os genes detectados como diferencialmente expressos por ambos os métodos e contrastados novamente contra todos os genes detectados. Com um menor número de genes de entrada, o p-valor ajustado foi menos penalizado e um número maior de termos foram classificados como enriquecidos (**Figura 26 B**). É relevante notar que ambas as análises mostram enriquecimento de termos associados à ativação celular, incluindo regulação da ativação celular. Assim, esses estudos iniciais revelam que a inativação do gene *ITGA4* parece alterar o estado de ativação das células T, achados esses que serão abordados de forma particular mais adiante.

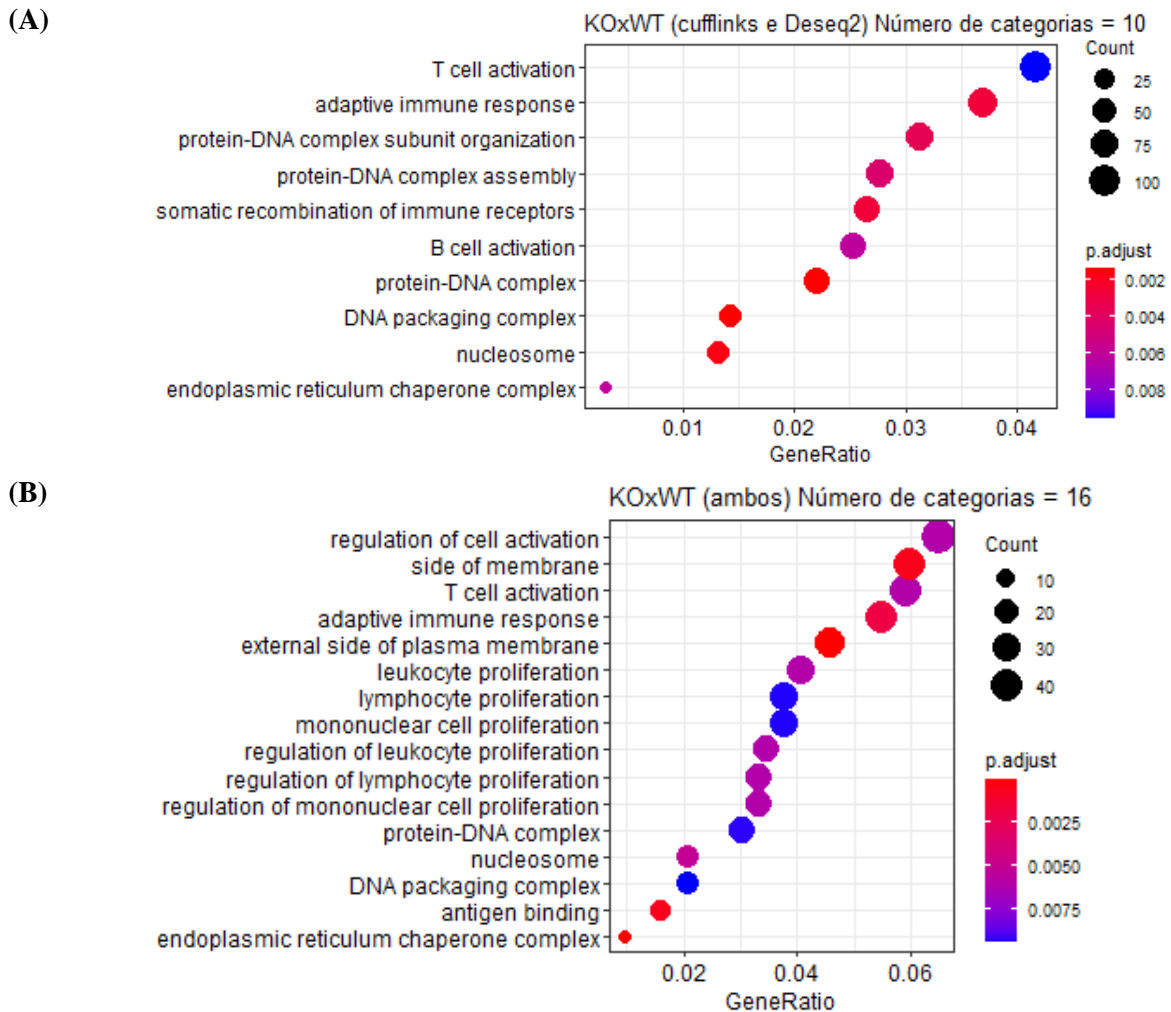


Figura 26) Análise de enriquecimento de termos com base na anotação de GO para comparação KO vs WT

O corte de p-valor e p-valor ajustado foi feito em 0,05 e as análises consideraram todos os termos do GO que incluem as categorias função molecular, componente celular e processo biológico. (A) Análise realizada com todos os genes DE pelos métodos do Cufflinks e/ou DESeq2 (Cufflinks U DESeq2). A descrição completa do termo mencionado como “*somatic recombination of immune receptors*” é “*adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains*”. (B) Análise realizada com genes diferencialmente expressos de acordo com as análises feitas com ambos os métodos (Cufflinks \cap DESeq2).

Para melhor compreendermos como estava a modulação de expressão dentro dos termos de GO enriquecidos, fizemos uma análise de enriquecimento de conjuntos gênicos (GSEA). Essa análise considera a diferença de expressão representada pelo valor de LFC para calcular se o enriquecimento de uma determinada via é associada à sua ativação ou supressão. De 27 termos enriquecidos na comparação KO vs WT ($p\text{-valor} \leq 0,05$), 26 estão ativados nas células mutantes (**Figura 27**). De forma interessante, observamos que além de termos ligados à ativação celular, essa análise destaca as categorias associadas aos processos de adesão celular e regulação da resposta imune.

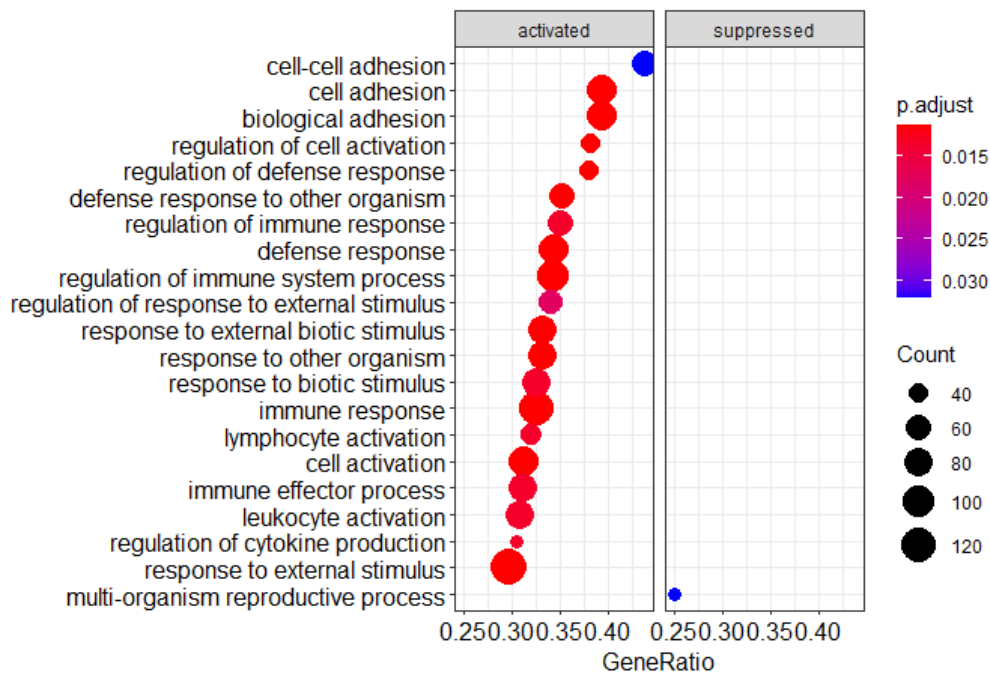


Figura 27) Gráfico de pontos mostrando termos ativados ou suprimidos de acordo com a análise GSEA para anotação do GO dos genes DE na comparação KO vs WT

O tamanho dos pontos é proporcional ao número de genes associados ao termo, a cor representa o valor do p-valor ajustado e a posição no eixo x demonstra a intensidade do enriquecimento. O p-valor foi ajustado pelo método BH e só foram considerados o enriquecimento de termos suportados por um p-valor ajustado maior ou igual 0,05.

Além disso, utilizamos a ferramenta cnetplot para construir uma rede de associação funcional que possibilita a identificação dos genes regulados positivamente e unidos pelos 5 termos com enriquecimento suportado pelos menores p-valores (**Figura 28**). Nós observamos que os 20 termos com associação funcional suportada por um p-valor $\leq 0,05$ (**Figura 28 A**) estão diretamente relacionados à ativação linfocitária, regulação do sistema imune e adesão celular. Ao exibirmos a amplitude da modulação dos genes associados aos 5 termos do GO com maior confiabilidade de enriquecimento na comparação KO vs WT (**Figura 28 B**), foi possível observar que os genes *TBX21* (*T-bet*), *IL10*, *HCK* e *IGLL1* destacam-se por apresentar uma tonalidade de vermelho mais distante do roxo (em uma escala de cor correspondente ao LFC) e possuir conexão com pelo menos 3 dos 5 termos selecionados. Particularmente, o destaque desses genes aponta para um efeito da inativação de *ITGA4* na regulação de genes associados a relevantes sinais mediados por citocinas durante o desenvolvimento da resposta imune.

Nesse sentido, observamos que as células *ITGA4*-KO apresentam maior expressão de T-bet (codificado por *TBX21*), que é o fator de transcrição determinante para a diferenciação e

ativação das células T no subtipo Th1. A hipótese de que as células mutantes possuem um perfil de ativação é corroborada pelo aumento de expressão do receptor $\beta 1$ de IL-12 (*IL12RB1*) e do elemento responsivo a interferon *IRF1* (*Interferon Regulatory Factor 1*). Observamos também a modulação positiva de IL-10, um supressor pleiotrópico da resposta imunitária, expresso por leucócitos, incluindo linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos, após ativação (74). Assim, a expressão aumentada desta citocina imunorreguladora nas células mutantes pode ser um efeito reflexo ao padrão de ativação observado. Já o gene *HCK* (*hematopoietic cell kinase*) não está comumente ativo em células T, e é principalmente expresso em células mieloides, linhagens de células B, além de células tumorais, onde ativações aberrantes estão associadas a leucemias e cânceres sólidos (123). É importante ressaltar que, após ativação, *HCK* se associa a diversas vias de sinalização que medeiam vários processos relevantes da resposta imune, como adesão, migração e diferenciação. Além disso, tumores com alta expressão de *HCK* apresentam modulação positiva de moléculas como o receptor de IL-7 (*IL7R α* ou *CD127*) (77), também superexpresso nas células ITGA4-KO (**Figura 28 B**). A sinalização via IL-7 está associada à regulação negativa de apoptose em linfócitos e à sobrevivência de células T maduras (77).

7.1.1) Análise funcional frente às anotações do KEGG

A análise GSEA com base na anotação do KEGG para os genes modulados na comparação KO vs WT, indicou o enriquecimento de 15 vias, das quais 12 estavam moduladas positivamente nas células ITGA4-KO (**Figura 29 A**). A via de sinalização por JAK-STAT (*hsa04630*) e de interação citocina-receptor de citocina (*hsa04060*) se destacam pelo número de genes modulados positivamente (maior ou igual a 13) e pelo p-valor associado (menor ou igual a 0,01). Para melhor visualizar quais genes estavam associados à ativação destas duas vias, a ferramenta cnetplot foi utilizada para construir uma rede com as 5 vias mais enriquecidas (**Figura 29 B**). Os genes codificantes para os receptores das citocinas IFN- γ (*IFNGR2*), IL-2 (*IL2RB*), IL-7 (*IL7R*), IL-9 (*IL9R*) e IL-12 (*IL12RB1*) e da própria citocina IL-10 estão modulados positivamente. IL-2, IL-7 e IL-9 fazem parte da classe I de citocinas, também conhecida como família γ -chain (γ_c) por compartilharem a cadeia γ comum de receptores (*CD132*; gene *IL2RG*) (124). IFN- γ e IL-10 são citocinas de classe II também conhecidas como citocinas da família da IL-10 que, apesar de terem baixa similaridade na sequência primária, derivaram de um mesmo ancestral comum (125). Os receptores de citocinas de classe II também podem compartilhar sequências comuns como o *IL10R2* e possuem uma cisteína conservada que é característica de inclusão na classe (126).

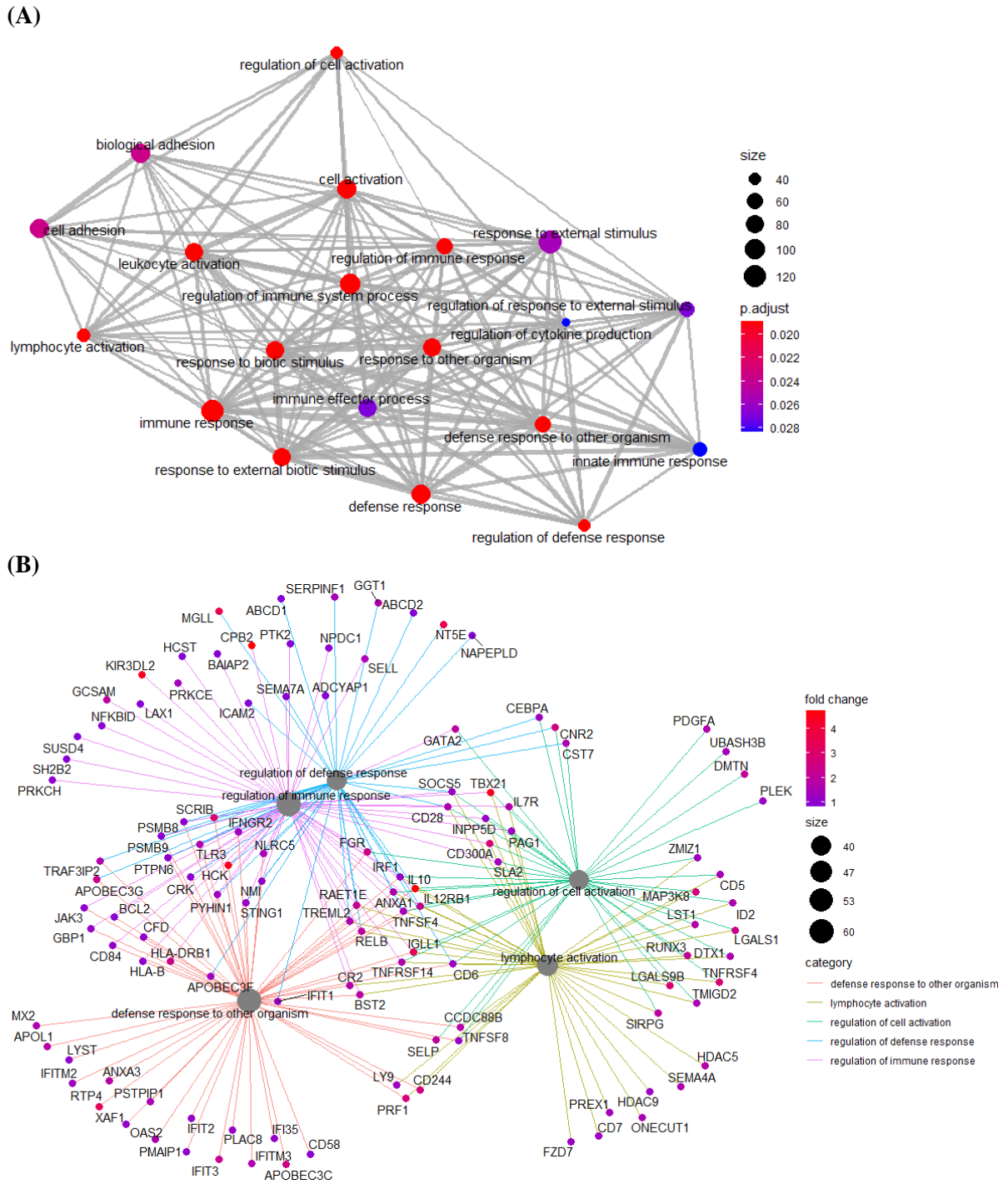


Figura 28) Visualização em rede do resultado da GSEA com genes DE na comparação KO vs WT
(A) Maior rede de termos do GO com associação funcional e enriquecimento na comparação KO vs WT ($p\text{-valor} \leq 0,05$). **(B)** Rede de termos do GO enriquecidos da comparação KO x WT mostrando genes associados a cada termo. A cor dos nós referentes a genes representa o LFC, o tamanho dos nós correspondentes a termos do GO é proporcional ao número de genes associados a ele e a cor das ligações indica o termo que ela faz associação. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos.

Essas análises iniciais demonstram que as células ITGA4-KO apresentaram modulação positiva dos genes codificantes para subunidades dos receptores de IFN- γ e IL-12, e do próprio T-BET (*TBX21*), mas não apresentaram aumento de transcrição de *IFNG* (**Figura 29**). A diferenciação no subtipo Th1 é principalmente definida pela IL-12, produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas, levando à fosforilação de STAT4 que, em associação com T-BET, induz a expressão de IFN- γ . Esses sinais em conjunto, além de estimularem a polarização em células Th1, inibe indiretamente a expressão de moléculas necessárias para o perfil Th2 (84). Dessa forma, esses dados ressaltam que a perda de *ITGA4* poderia interferir na modulação do braço de diferenciação Th1.

Os receptores das citocinas das classes I e II utilizam a via de JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) e constituem um dos principais mecanismos de transdução de sinal na comunicação entre células do sistema imune. Estes receptores podem desencadear um amplo espectro de resposta, apesar das semelhanças estruturais e de compartilharem subunidades comuns. Nesse sentido, citocinas como IFN- γ e IL-10 possuem efeitos totalmente opostos na resposta imune. IFN- γ é um dos principais ativadores do sistema imune atuando, por exemplo, sobre macrófagos, ativando efeitos microbicidas centrais para o controle de infecções, e sobre células T virgens, desencadeando a diferenciação no subtipo Th1 (127). Em contrapartida, IL-10 é liberada por diversos tipos celulares e atua de forma crítica na regulação da resposta imune, evitando uma reação exacerbada (128). De fato, polimorfismos no gene *IL10* estão associados a maior risco para retocolite ulcerativa e doença de Crohn e defeitos na sinalização via IL-10 impacta no desenvolvimento precoce de forma clínica grave de doença inflamatória intestinal (129). Um importante aspecto da ação anti-inflamatória da IL-10 está no controle do programa metabólico em macrófagos, com inibição da glicólise e indução da fosforilação oxidativa, além de supressão da atividade de mTOR com consequente ação mitofágica. Esse último efeito corrobora o achado central de mitocôndrias disfuncionais em doença inflamatória intestinal relacionada à ausência de sinalização de IL-10 (130).

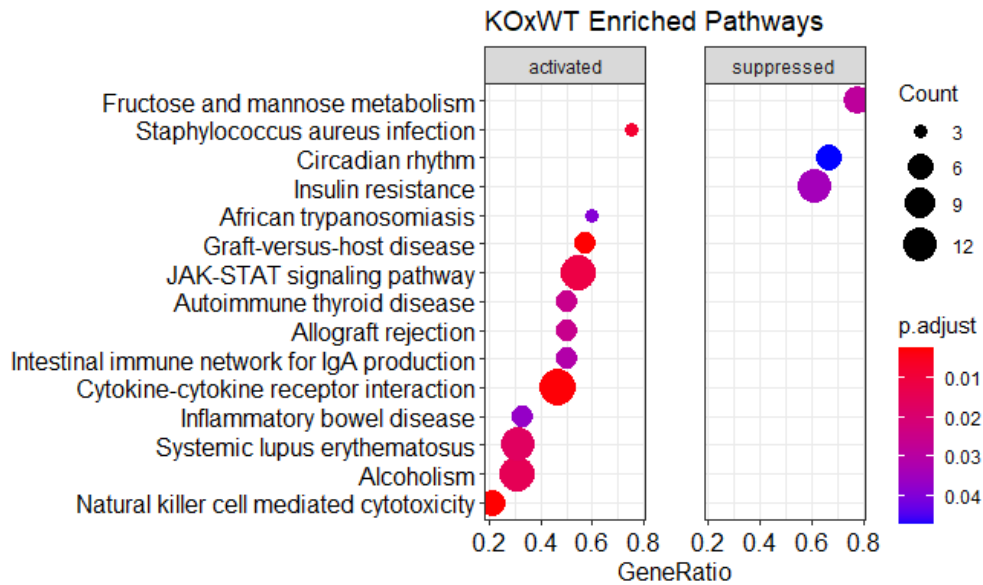
A via JAK-STAT é regulada por um conjunto de proteínas, incluindo os supressores de sinalização por citocinas (*Suppressors of Cytokine Signaling* - SOCS), as proteínas inibidoras de STAT ativada (*Protein Inhibitors of Activated STATs* - PIAS) e as proteína-tirosina fosfatases (*Protein Tyrosine Phosphatases* - PTPs) (131). Nas células ITGA4-KO, observamos uma modulação positiva de genes codificantes para proteínas reguladoras como SOCS5, PIAS4, PTPN2 (TC-PTP) e PTPN6 (SHP1), além de uma modulação negativa do gene codificante para STAT5A (**Figura 30**). É importante notar que STAT5, produto dos parálogos *STAT5A* e *STAT5B* (132), tem sua ativação associada à atividade de *JAK3* que é 2 vezes mais

expresso nas células ITGA4-KO (**Figura 30**). Por sua vez, JAK3 é a quinase central para a transdução do sinal dos receptores γ_c , e a sua ausência provoca imunodeficiência combinada e grave (124), além de ser crucial para a polarização para o subtipo Th1 devido à sua ação de remodelamento de cromatina junto ao *locus* de *IFNG* (133). Além disso, sabendo-se que o receptor de IL-7 depende da ação de JAK3 e STAT5 para suprimir a apoptose subsequente à ativação de células T (134), nossos resultados sugerem que o aumento de atividade de *IL7R* e *JAK3*, com a distinta redução de *STAT5*, resultam no controle do processo de morte celular nas células mutantes, indicado pelo aumento de quase 2 vezes na atividade *BCL2* (**Figura 30**), um dos principais elementos de sobrevivência de linfócitos T (135). Em conjunto, esses estudos sugerem que este processo de regulação da via JAK-STAT atua como um eixo modulador da ativação de células T. Nesse contexto, uma alça de retroalimentação negativa poderia ser a diminuição de transcrição de *IL10RB* como resposta ao aumento de atividade de IL-10. Um panorama geral da via de interação de citocinas e receptores de citocinas é apresentada na **Figura 31**.

Outro fator de sobrevivência importante para as células T é a coestimulação do receptor OX40 por OX40L e, como é possível ver nas **Figura 29 B** e **Figura 31**, as células mutantes possuem maior atividade para os genes *TNFSF4* (codificante para OX40L ou CD252) e *TNFRSF4* (codificante para OX40 ou CD134). OX40L é inicialmente expresso nas células apresentadoras de antígeno a age como molécula coestimuladora da ativação via TCR gerando um importante sinal de expansão e sobrevivência das células T ativadas por antígenos. Em seguida, as células T ativadas passam a expressar OX40L de forma transiente que, diferentemente de outras moléculas coestimuladora, não está presente em células de memória (136).

A observação do LFC de genes associados ao mapa das interações citocinas-receptores de citocinas revelou ainda que genes codificantes para importantes receptores e ligantes da família de TGF- β estão suprimidos nas células ITGA4-KO (**Figura 31**). Os elementos da via de TGF- β modulados na comparação KO vs WT podem ser vistos no ANEXO 5 (**Figura 60** e **Figura 61**).

(A)



(B)

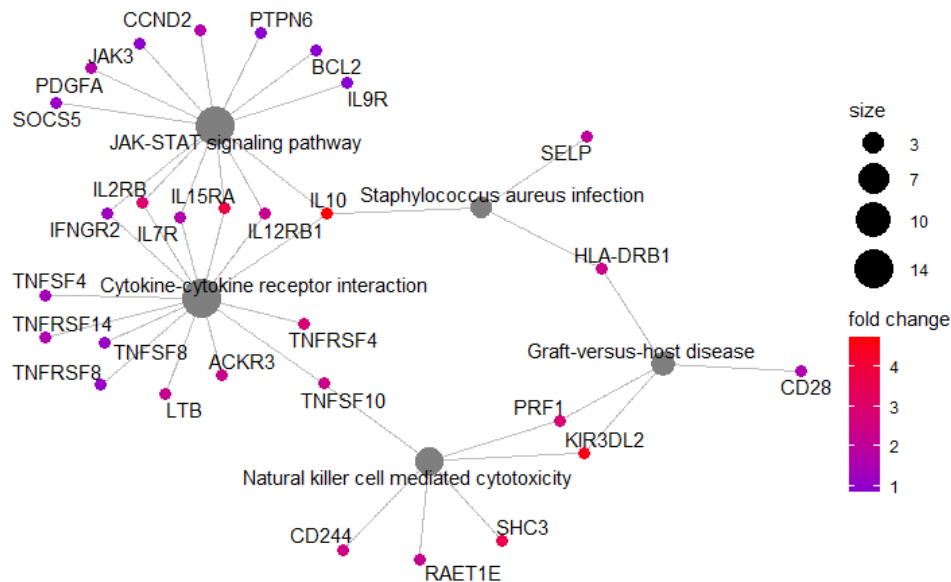
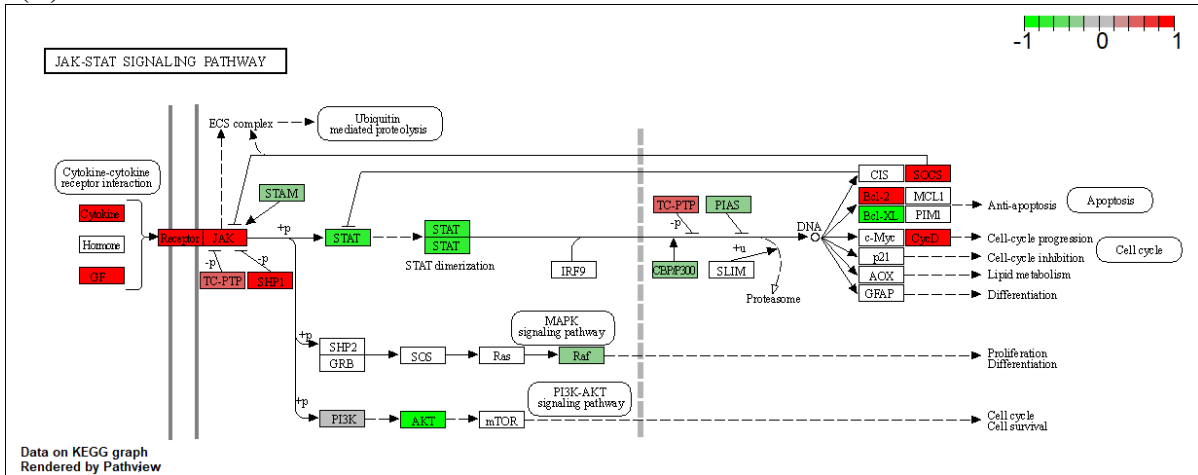


Figura 29) GSEA com base na anotação de KEGG para os genes DE na comparação KO vs WT
(A) Gráfico de pontos mostrando termos ativados ou suprimidos. **(B)** Rede de termos relacionados e enriquecidos mostrando genes associados a cada termo. A cor dos nós referentes a genes representa o LFC e o tamanho dos nós correspondentes a termos do KEGG é proporcional ao número de genes associados a ele. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. Para a análise de GSEA com base na anotação do KEGG, não foi aplicada nenhuma correção de múltiplas hipóteses e apenas os termos com enriquecimento suportado por um p-valor menor ou igual a 0,05 foram considerados.

(A)



(B)

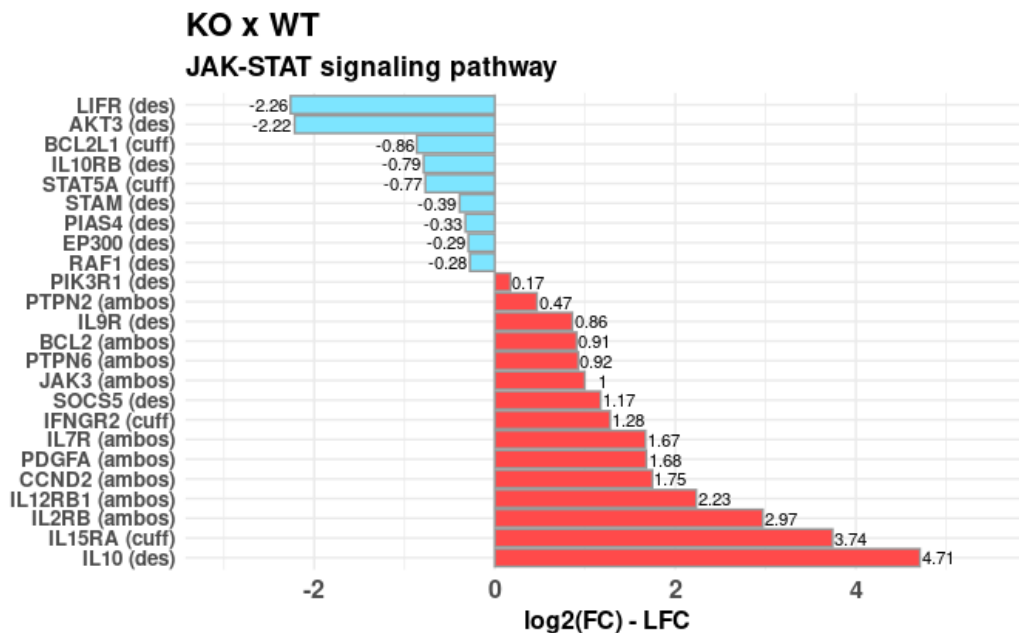


Figura 30) Via de sinalização de JAK-STAT

(A) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo " *JAK-STAT signaling pathway*" (hsa04630). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9. (B) Gráfico de barra mostrando os valores de LFC para genes da via de JAK-STAT diferencialmente expressos na comparação KO vs WT. As siglas "des", "cuff" e "ambos" indicam os genes cuja expressão diferencial foi detectada pelo protocolo do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos.

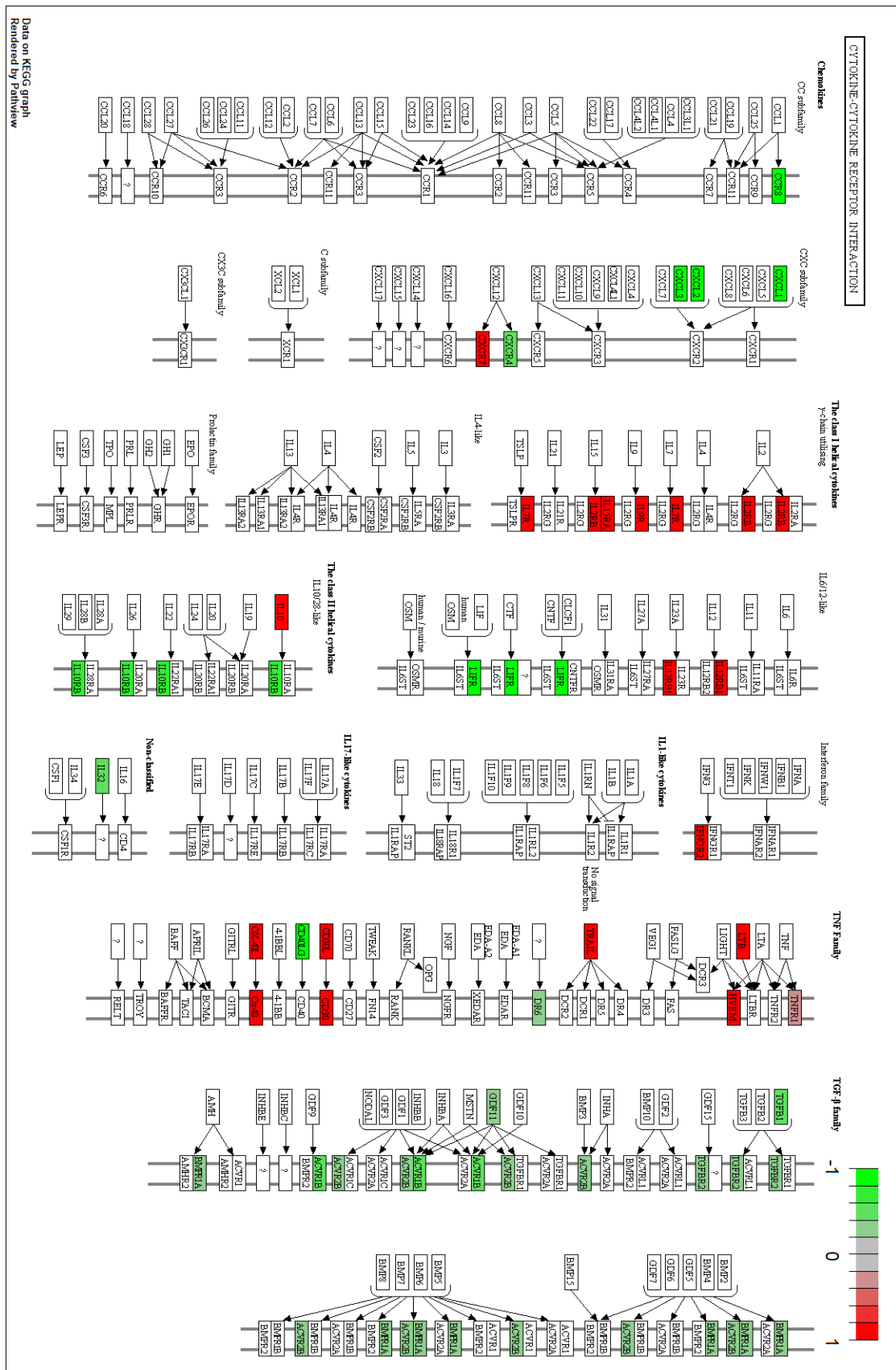


Figura 31) Via de interações de citocinas e receptores de citocinas
 Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo "Cytokine-cytokine receptor interaction"(hsa04060). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam

genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9.

7.2) Conclusão parcial da terceira parte dos resultados e discussão

O conjunto de resultados obtidos com as análises de enriquecimento de função entre as células Jurkat WT e mutantes indica que a remoção da cadeia $\alpha 4$ promoveu um fenótipo compatível com os processos de ativação e regulação da ativação de células T. Nesse sentido, sabe-se que a molécula VLA-4 é recrutada para a formação da sinapse imunológica, colocalizando-se com as cadeias ζ do TCR, e que o engajamento de anticorpos nessa integrina promove a diferenciação *in vitro* para o subtipo Th1 (68). De fato, VLA-4 já foi apontado como um coestimulador da sinalização via TCR por desencadear um padrão de fosforilação em resíduos de tirosina que contribui para a ativação linfocitária (70). Entretanto, não está descrito que a ausência desta integrina poderia resultar em um fenótipo de ativação celular, o que indica que VLA-4 também pode desempenhar um distinto papel de modulação negativa da ativação de células T.

As análises funcionais do RNA-Seq utilizando as anotações do GO e do KEGG indicaram um aumento de expressão de genes associados a termos relacionados à ativação, regulação da ativação e adesão celular. Olhando mais especificamente para estes genes, podemos observar que a célula mutante aumentou a transcrição de genes relacionados a interleucinas e receptores normalmente aumentados em células T durante o processo de ativação e diferenciação em células efetoras. Estas análises também indicaram o aumento de transcrição de *TBX21* que codifica para o importante regulador transcricional T-bet, que será abordado na quarta parte dos resultados.

8) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 4: ANÁLISE DE REGULADORES TRANSCRICIONAIS ENVOLVIDOS NA ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T

A quarta parte dos resultados e discussão é dedicada às análises de reguladores transcripcionais que poderiam participar das grandes variações de expressão observadas nas células ITGA4-KO. Genes codificantes para importantes reguladores transcripcionais associados a diferenciação de linfócitos T foram modulados positivamente nas células mutantes, como T-bet e componentes do complexo proteico associado a TRIM28.

8.1) Reguladores transcripcionais centrais nas células ITGA4-KO

Para desvendar possíveis mecanismos de regulação de transcrição, 3.124 genes diferencialmente expressos na comparação KO vs WT foram submetidos à análise com a plataforma RegulatorTrail. O total de 2.917 nomes gênicos foram identificados dentro do banco de dados utilizado como referência para estabelecer os pares de reguladores transcripcionais e genes-alvo. Foram identificados 200 reguladores e, utilizando a plataforma STRING, foram construídas 7 redes de interação proteína-proteína com um total de 104 nós e 163 conexões. As redes foram ajustadas no Cytoscape para que nenhum conector passasse em linha reta por baixo de um nó e os nós foram coloridos de acordo com os valores de LFC para a comparação KO vs WT (**Figura 32**). Para visualizar os níveis de transcrição nas células mutantes, os nós destas mesmas redes apresentadas na **Figura 32** foram coloridos de acordo com os valores de TPM encontrados para essas células (**Figura 62**, ANEXO 6).

A maior sub-rede com interação molecular proteína-proteína e modulação gênica positiva é composta por 15 nós representantes de proteínas dedo de zinco, TRIM28 (*Tripartite Motif Containing 28*), CBX3, TFDP1 e SMAD2 (**Figura 33**). *ZNF202* e *ZNF766* são regulados negativamente, mas foram incluídos por serem codificantes para ZNF que se ligam a TRIM28 (também conhecido como KAP1 ou TIF1 β). O gene que codifica a histona deacetilase HDAC1 também é modulado negativamente, mas foi incluído nesta sub-rede por conter domínios relacionados a função de TRIM28 (**Figura 63**, ANEXO 6) e por ser transcrito nas células mutantes em quantidades equiparáveis aos seus vizinhos (**Figura 33**). Os nós pertencentes a esta sub-rede estão marcados por hexágonos na **Figura 32**.

A sub-rede de coexpressão contendo TBX21 foi destacada com losangos devido ao seu importante papel na diferenciação de células T. Ambas as redes destacadas são abordadas em maiores detalhes nos subtópicos adiante.

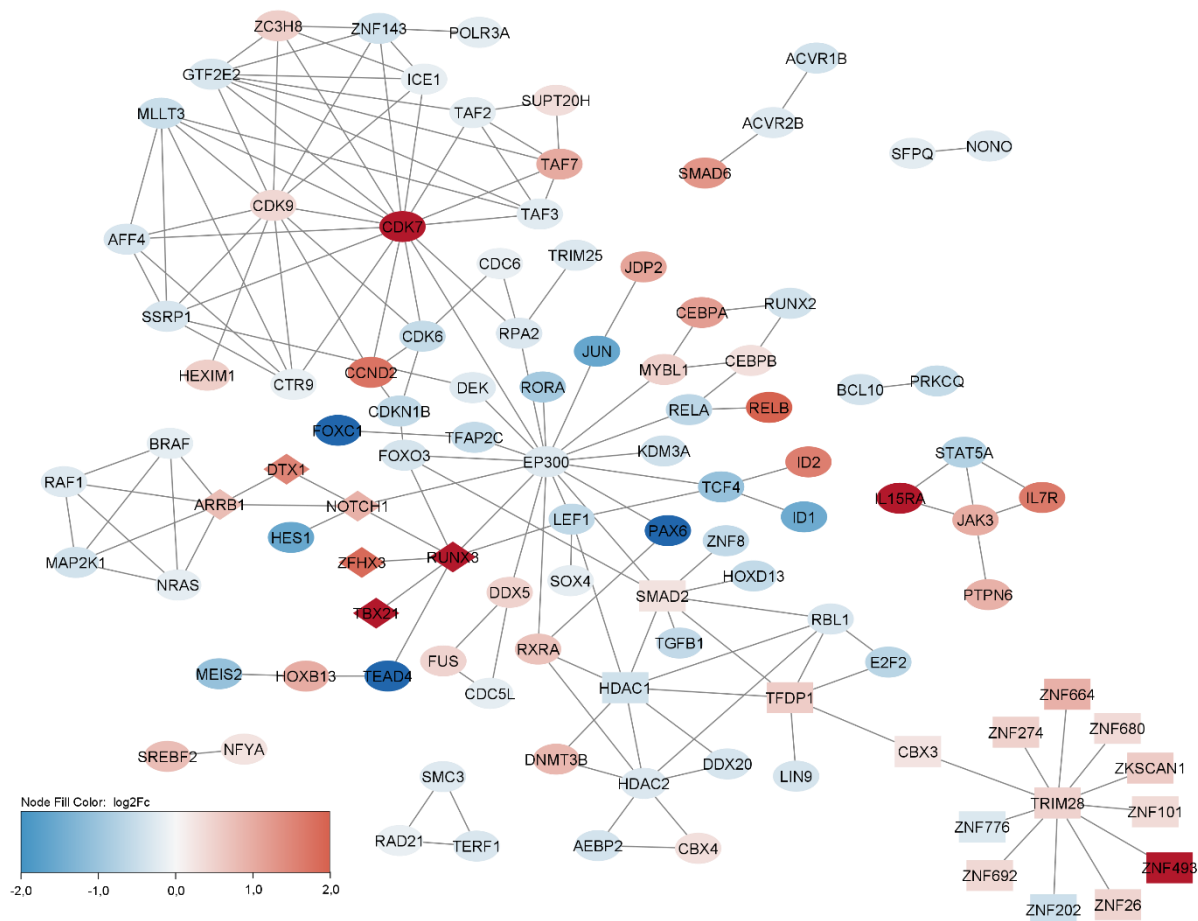


Figura 32) Redes de interação proteína-proteína entre reguladores transcricionais na comparação WT x KO

Uma escala que vai do azul ao vermelho foi montada com os valores de LFC para colorir os nós. Redes montadas por um só nó foram omitidas. A posição dos nós foi ajustada para que nenhum conector passasse por trás de um nó. O tipo de fonte da informação sobre as interações pode ser visto nos conectores da **Figura 63** no ANEXO 6. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. Os nós da sub-rede de proteínas associadas a TRIM28 estão representados com retângulos. Os nós da sub-rede de proteínas associadas a T-bet estão representados com losangos.

8.2) O regulador epigenético TRIM28

A expressão dos genes codificantes para as proteínas pertencentes a sub-rede contendo TRIM28 é abordada na **Figura 33**. TRIM28 pode ligar-se a diferentes proteínas de dedo de zinco (ZNF) contendo o domínio KRAB (*Krüppel associated box*) e isso lhe confere afinidade a diferentes regiões do genoma. As funções de TRIM28 incluem desenvolvimento, diferenciação, ativação e transformação neoplásica. TRIM28 também se liga a histona

metiltransferases e deacetilases funcionando como arcabouço para a maquinaria de transformações epigenéticas (141).

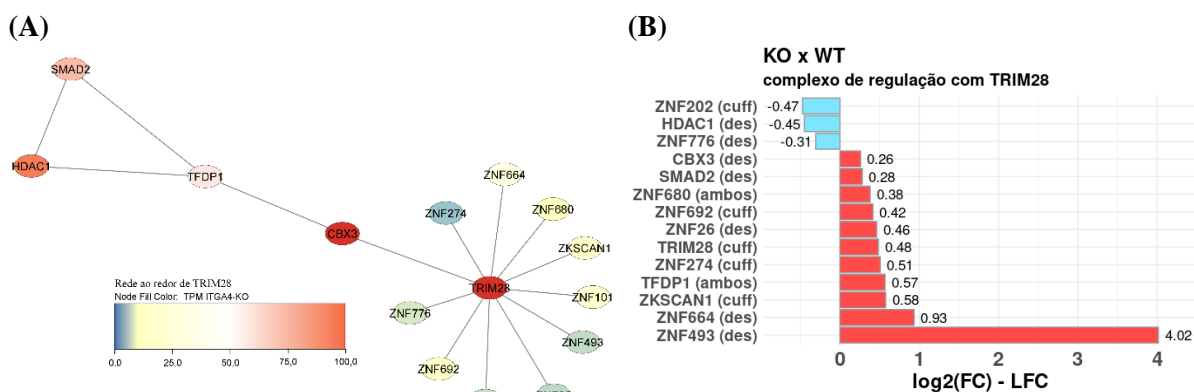


Figura 33) Sub-rede de reguladores de transcrição associados à proteína TRIM28

(A) Rede de interações proteína-proteína construída com a plataforma STRING e colorida com o Cytoscape utilizando a média dos valores de TPM das células KO para calcular a escala colorimétrica. (B) Gráfico de barra mostrando os valores de LFC obtidos na comparação KO vs WT: “des”, “cuff” e “ambos” indicam os genes cuja expressão diferencial foi indicada pelos protocolos do Cufflinks, DESeq2 ou ambos os métodos, respectivamente. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos.

Em células T, TRIM28 é um importante regulador capaz de silenciar genes associados a características de uma célula Treg e garantir o sucesso da expansão e diferenciação dos fenótipos de células T auxiliares e reguladoras (142). Após a ativação via TCR, TRIM28 é fosforilado e estudos com camundongos nocautes mostraram que as células T expressam maior quantidade de TGF- β na ausência desta proteína. Os camundongos deficientes em TRIM28 também desenvolveram preferencialmente os fenótipos Th17 e Foxp3⁺, além de apresentarem células T com baixa expressão e resposta a IL-2 (143). Os linfócitos T TRIM28^{-/-} possuíam capacidades limitadas em expressar as citocinas efetoras para os fenótipos Th1, Th2 e Th17 por problemas na diferenciação celular, e não porque a atividade de TRIM28 fosse diretamente relacionada à regulação de expressão dessas citocinas. As células do fenótipo Treg em camundongos nocautes não foram capazes de evitar autoimunidade *in vivo* devido a uma dificuldade proliferativa (142).

Os nocautes simultâneos para *CBX1* (*Chromobox 1* ou *Heterochromatin Protein 1 β* –HP1 β) e *CBX3* (HP1 γ) apresentaram fenótipos similares aos camundongos TRIM28^{-/-}, indicando que estes genes são fundamentais para a diferenciação e expansão clonal de células T (142). *CBX3* é mais expresso nas células ITGA4-KO e, apesar do pequeno aumento do seu LFC (**Figura 59 B**), os valores de TPM para este gene equiparam-se aos valores obtidos para

TRIM28 (**Figura 34**). Já os valores de TPM para os genes codificantes para as ZNF estão em outra ordem de grandeza, com apenas 2 genes ultrapassando a casa dos 20 TPM e com apenas *ZNF664* chegando a 32 TPM. As ZNF podem direcionar as modificações epigenéticas feitas pelo complexo de proteínas que se forma ao redor de *TRIM28* para diferentes regiões do genoma, determinando assim quais genes são ativados ou reprimidos. Adquirir mais conhecimentos sobre quais ZNF agem em conjunto com *TRIM28*, durante a conversão metabólica associada à ativação de linfócitos T, é de grande importância para a compreensão dos mecanismos que regem a especificidade de tal processo.

Para identificar reguladores transcricionais que pudessem estar relacionados à função de *TRIM28*, as redes montadas na plataforma STRING foram submetidas a uma análise de enriquecimento de função e os genes foram coloridos de acordo com sua associação aos termos: *histone H3 deacetylation* (GO:0070932), *DNA damage response* (GO:0006977), *regulation of H3-K9 methylation* (GO:0051570), *histone H4 deacetylation* (GO:0070933), *positive regulation of histone H3-K4 methylation* (GO:0051571), *KRAB box* (PF01352), *histone deacetylase domain* (PF00850) (**Figura 63** no ANEXO 6). HDAC1 é a proteína mais próxima de *TRIM28* relacionada com a função de inibição de transcrição gênica por modificação epigenética sobre a histona 3. Além disso, *HDAC1* possui níveis de transcrição nas células ITGA4-KO que se assemelham aos genes *TFDP1*, *CBX3* e *TRIM28*, podendo, portanto, fornecer proteína em abundância suficiente para formar um complexo com o produto destes genes. Para identificar outros genes expressos nas células ITGA4-KO que pudessem fornecer proteína para este complexo, utilizamos os nomes das proteínas expostas na sub-rede da **Figura 32** para construir uma nova rede com duas rodadas de amplificação na plataforma STRING; a nova rede foi formada com 24 nós e 57 conexões. As proteínas encontradas foram avaliadas de acordo com a sua associação a termos enriquecidos e à atividade do seu gene codificante (**Figura 63** no ANEXO 6). Essa abordagem chamou nossa atenção para os genes *MTA2*, *RBI*, *RBBP4* e *RBBP7*. O possível complexo envolvendo *TRIM28*, *CBX3* e *TFDP1* poderia ter outros componentes nas células mutantes além de HDAC1. Enquanto que novos conhecimentos sobre as ZNF associadas a *TRIM28* ajudarão na compreensão das interações deste complexo com o DNA, adquirir mais informações sobre as enzimas que se acoplam a ele nos revelará os mecanismos moleculares associados a modificações epigenéticas realizadas durante a conversão metabólica em linfócitos T.

Uma importante etapa do processo de ativação das célula T é a conversão metabólica que prioriza a glicólise, mantém ativa a fosforilação oxidativa e reduz a β -oxidação (144,145). Nesse sentido, os linfócitos deficientes em *TRIM28*^{-/-} possuem uma conversão metabólica

limitada (142). Por outro lado, as células Jurkat ITGA4-KO, apesar de terem uma expressão aumentada de TRIM28, parecem não apresentar fenótipo compatível com uma conversão metabólica padrão. As análises de expressão gênica relativas ao metabolismo energético estão descritas no ANEXO 7.

8.3) Sub-rede contendo TBX21

Com 6 componentes e em terceiro lugar em ordem de tamanho, temos uma sub-rede de interação proteína-proteína formada pelos reguladores transcricionais ARRB1, DTX1, NOTCH1, RUNX3, ZFHX3 e TBX21 (**Figura 35**). Todos os genes codificantes para essas proteínas são modulados positivamente nas células mutantes.

ZFHX3 (ou ATBF1) é uma proteína, do tipo dedo de zinco da família das homeobox, que interage fisicamente com RUNX3 formando um complexo que se desloca para o núcleo em modelo de tumor gástrico (147). Já em linhagem celular de hepatócito, foi visto que esta proteína pode regular a sinalização mediada por STAT3 atuando em sinergia com PIAS3 (148). Foi também reportado que pacientes com fibrilação atrial paroxística que carregam o SNP rs2106261 do gene *ZFHX3* possuem menor razão de neutrófilos/linfócitos e menores níveis de proteína C reativa e IL-6, associando esses menores níveis de marcadores de inflamação basal com menores taxas de recorrência da doença (149).

As proteínas da família RUNX são fatores de transcrição que atuam em complexas redes de regulação capazes de determinar o destino de linhagens de células T (150). *Runx3* é altamente expresso em células CD8⁺ e NK, e desempenha um importante papel na diferenciação de células T CD4⁺ para o subtipo Th1. A ausência de *Runx3* resulta em perda da inibição do *locus* de *Il-4* e consequente diferenciação para o subtipo Th2 (151). *Runx3* é quase inativo em células T CD4⁺ não ativadas, aumenta sua expressão de acordo com a ativação de *TBX21* e ambos atuam em sinergia para induzir a expressão de *Ifng* (152). O aumento de expressão de RUNX3 nas células ITGA4-KO ocorre em concordância com o aumento de atividade de genes importantes para a diferenciação em Th1, como *TBX21* e *IFNGR2* (**Figura 36**). Em contrapartida, importantes genes para a diferenciação em Th2 e Th17, como *GATA3*, *IL4R*, *RORC* e *IL17RD*, apresentam uma redução de atividade. Apesar da diferença entre as médias dos índices de expressão entre células WT e KO para o gene *IL4R* não ser estatisticamente significativa, este gene apresenta uma diminuição de atividade.

VIII) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE IV

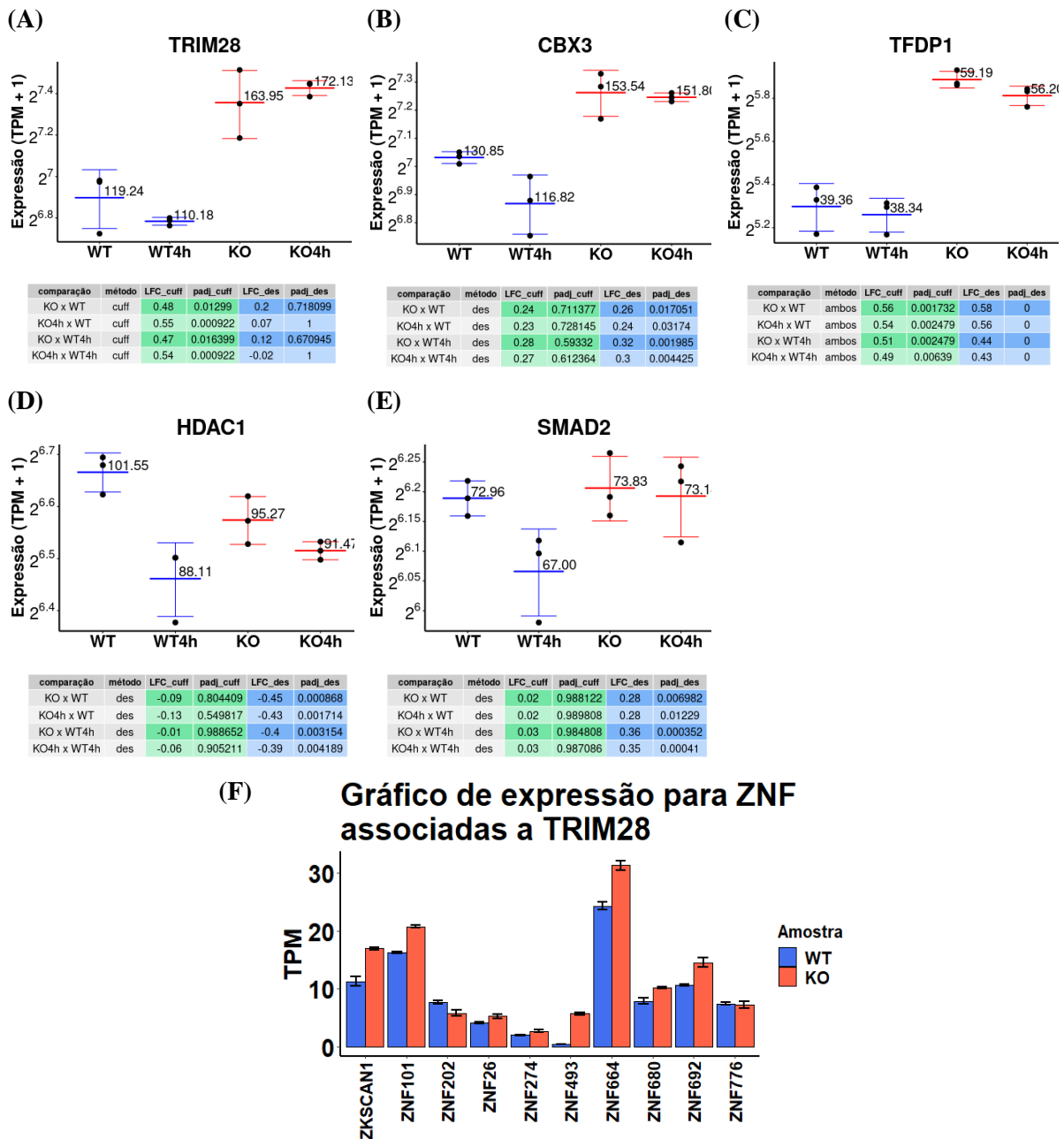


Figura 34) Níveis de expressão dos genes codificantes para proteínas que podem ligar-se a elementos do complexo regulador epigenéticos envolvendo TRIM28

(A) TRIM28; (B) CBX3; (C) TFDP1; (D) HDAC1; (E) SMAD2; (F) ZNF. Os gráficos de A a E exibem os níveis de expressão em TPM + 1 na escala log na base 2. As tabelas abaixo destes gráficos expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

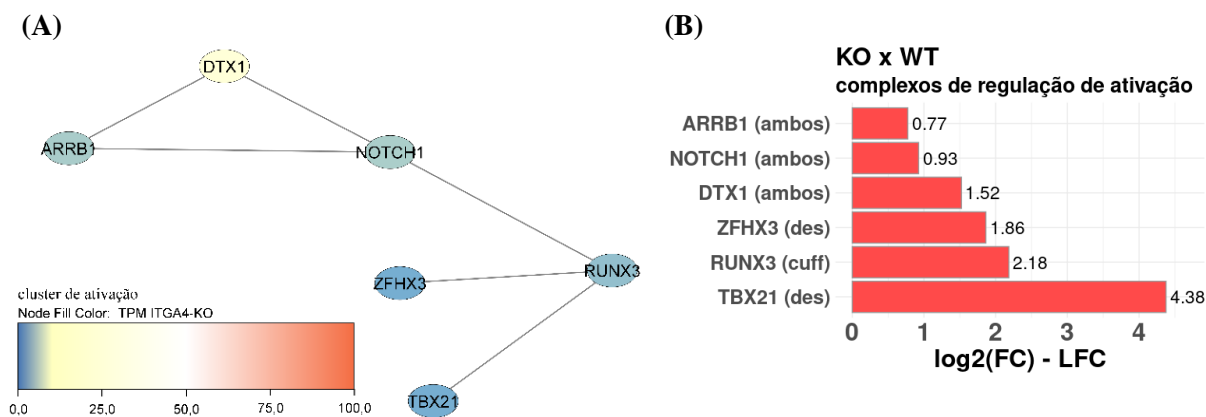


Figura 35) Sub-rede de reguladores de transcrição associados à ativação

(A) Rede de interação proteína-proteína com nós coloridos de acordo com o nível de expressão gênica (TPM). Tons de azul indicam um valor de TPM menor ou igual a 10. (B) Gráfico de barra mostrando a variação de expressão em LFC. Os termos “des”, “cuff” e “ambos” indicam que a expressão diferencial foi detectada pelo protocolo do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os valores de LFC para genes DE de acordo com o Cufflinks e DESeq2 (ambos) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por com cada um destes métodos.

As células *ITGA4-KO* apresentaram também um aumento de expressão de *NOTCH1*, simultaneamente com dois dos seus genes alvos que são *DTX1* e *TBX21*. De fato, a inibição da sinalização de Notch em células T CD4⁺ reduz a polarização para Th1 por impedir a formação de um complexo no promotor de *Tbx21* e consequente diminuição de expressão de T-bet (153). A sinalização via Notch também apresenta papel crucial na diferenciação para outras diferentes subpopulações de células T (110, 111) e está associada ao aumento de produção de IL-2 e CD25 em células T CD4⁺ (154). É importante salientar que observamos um aumento da atividade de *IL2RB* nas células *ITGA4-KO*, mas sem alterações significativas na expressão de *IL2RA* (Figura 31). Além disso, essas células apresentam redução de expressão do gene *HES1* (Figura 32), necessário para a ação de Notch na diferenciação de células T $\gamma\delta$ secretoras de IL-17, mas não na ativação de células T CD8⁺ (155) (156). Esse achado sugere que, na ausência de VLA-4, a possível atividade de *NOTCH1* ocorra independente da presença de *HES1*. Ressaltamos ainda que os processos de ativação mediados por Notch podem ter uma alça de regulação negativa nas células mutantes através do aumento de atividade de *ARRB1*. O produto deste gene em células hematopoiéticas pode associar-se a ubiquitina ligase NEDD4 e marcar *NOTCH1* para degradação (157).

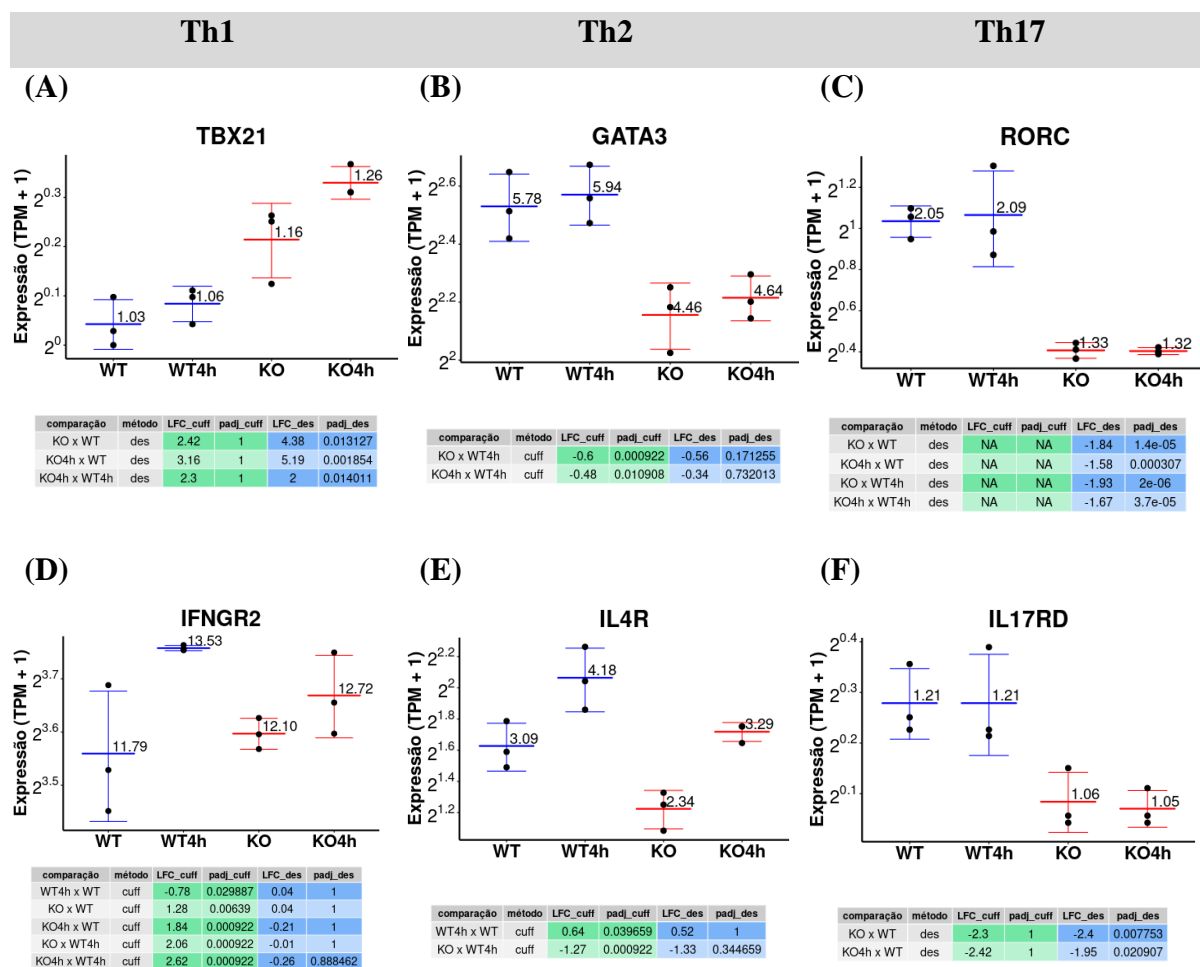


Figura 36) Índice de transcrição de importantes genes na diferenciação dos subtipos Th1, Th2 e Th17

(A) (B) (C) genes codificantes fatores de transcrição que atuam como reguladores centrais no processo de diferenciação (D) (E) (F) genes codificantes para os receptores das principais interleucinas para definição de cada subgrupo. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a F estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

Em conjunto, nossas análises de expressão gênica diferencial e de vias enriquecidas apontaram para modulações em genes envolvidos nas interações citocina-receptor e em genes reguladores transcricionais fundamentais para a via de diferenciação de linfócitos T. De fato, conforme discutido previamente, a adição de anticorpo monoclonal anti- $\alpha 4$ em processo de ativação *in vitro* de células T *naive* via estimulação com anti-CD3 e anti-CD28 ou com células dendríticas, além de alterar a localização da integrina VLA-4 na sinapse imunológica, resulta em polarização para um perfil Th1. Além disso, tratamento *in vivo* com o anti- $\alpha 4$ também gerou um desvio para resposta Th1 em modelo experimental de glomerulonefrite autoimune de

padrão Th2 (68). Destacamos ainda abordagem genética em camundongo nocaute condicional, com inativação seletiva de *Itga4* em células T, que demonstrou o desenvolvimento atrasado de neuroinflamação em modelo de encefalomielite autoimune experimental, com maior infiltração de linfócitos Th17 em relação a linfócitos Th1 (81). Em conclusão, nossos achados e os estudos aqui discutidos apontam para um relevante papel mediado pela integrina VLA-4 na regulação da diferenciação de células T.

8.4) Conclusão parcial da quarta parte dos resultados e discussão

As análises dos reguladores transcricionais diferencialmente expressos nas células ITGA4-KO revelou dois grupos gênicos codificantes para importantes proteínas na ativação e diferenciação de células T. O primeiro grupo gênico abordado codifica para possíveis componentes do complexo regulador epigenético associado à TRIM28 e responsável pela conversão metabólica durante a ativação de linfócitos T. Apesar do modelo das células ITGA4-KO ter mostrado limitações para análise da função deste complexo por não realizar uma conversão metabólica como esperado, foram identificados novos genes com possível associação funcional à TRIM28. Estudos posteriores de silenciamento gênico podem averiguar a importância destes candidatos na conversão metabólica do cultivo primário de células T.

O segundo grupo gênico analisado está associado à função de T-bet e corrobora a hipótese de que as células mutantes ganharam características de linfócitos T ativados com possível início de diferenciação em Th1. A redução de transcrição de genes associados à diferenciação nos subtipos Th2 e Th17 reforçam essa hipótese.

9) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 5: A INATIVAÇÃO DE ITGA4 PROMOVEU ALTERAÇÕES NO PERFIL DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE COM IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS EM ADESÃO, MIGRAÇÃO E SINALIZAÇÃO

A quinta parte dos resultados e discussão é dedicada às análises de genes associados à produção de proteínas que são transportadas para a membrana celular e estão associadas com as funções de adesão, migração e sinalização. Foram realizados experimentos com os cultivos de células ITGA4-KO e WT com a finalidade de avaliarmos possíveis variações referentes a tais funções.

9.1) Moléculas de adesão e de interação célula-célula diferencialmente expressas em células ITGA4-KO

A análise por GSEA para a comparação KO vs WT frente à anotação com GO (**Figura 26**), indicou uma importante modulação positiva de genes associados aos termos *cell-cell adhesion* (GO:0098609), *cell adhesion* (GO:0007155) e *biological adhesion* (GO:0022610). Para termos uma melhor visualização das possíveis alterações moleculares na superfície das células mutantes, os genes diferencialmente expressos na comparação WT vs KO foram visualizados no mapa da via *cell adhesion molecules* (hsa04514), com coloração de acordo com a modulação de expressão (**Figura 37**).

Dentre os produtos dos genes modulados positivamente nas células ITGA4-KO, temos moléculas importantes para a adesão e migração linfocitária, tais como PECAM-1 (CD31), L-selectina (CD62L), CD58 (LFA3), CD28 e ICAM-2. Os genes codificantes para moléculas de MHC HLA-A, HLA-B, HLA-E e HLA-DRB1 também estão todos modulados positivamente nas células ITGA4-KO (**Figura 38**). As diferenças de expressão encontradas para *HLA-C* e *HLA-DQB1* não possuíam suporte estatístico na comparação KO vs WT. Anteriormente, nosso Laboratório demonstrou que, em cultivos de células epiteliais tímicas, tanto o silenciamento de *ITGA5* como o silenciamento de *ITGA6* modificaram o padrão de expressão dos ligantes dessas integrinas, respectivamente as moléculas de ECM fibronectina e laminina, juntamente com outras moléculas envolvidas em adesão e migração (158,159). A modificação de expressão de genes codificantes para moléculas envolvidas em adesão, migração e sinalização via sinapse imunológica ajuda a cunhar o conceito de que existe um mecanismo regulado por integrinas no controle de expressão das moléculas envolvidas em vias de sinalização associadas às próprias integrinas.

No microambiente tímico, um complexo sistema multi-vetorial guia e seleciona os linfócitos de acordo com suas interações com as células epiteliais e a ECM (7,34,160). As integrinas desempenham um importante papel na formação e manutenção das características desse microambiente e há um mecanismo de controle de expressão de lamininas baseado na atividade de seus receptores. Os sinais presentes no microambiente tímico incluem moléculas de superfície celular e moléculas solúveis como, por exemplo, ligantes de Notch, ligantes de c-Kit, moléculas de MHC e IL-7 (160). Fora do timo, os linfócitos T continuam sua jornada de desenvolvimento que inclui os processos de diferenciação e ativação. Os mecanismos de regulação da expressão de moléculas de superfície que já haviam sido reportados para células epiteliais tímicas também podem existir em células linfocitárias.

CD2, LFA-1 e CD28 são importantes receptores de células T que emitem sinal de coestimulação para a ativação via TCR. Estes receptores ligam-se, respectivamente, a CD58, ICAM-1 e B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86), presentes nas APCs profissionais (161). A remoção de VLA-4 nas células Jurkat promoveu uma pequena redução de transcrição de *CD2* (sem significância estatística na comparação WT vs KO) e um aumento superior a duas vezes para a transcrição de *CD28* (**Figura 39**). Em células T, *CD28* tende a ser menos expresso após ativação e em situações de inflamação crônica (162). Isto está em contraste com o fenótipo de ativação observado para as células mutantes, que ocorre em concomitância com o aumento de atividade de *CD28*. De forma similar, *CD58* teve um aumento de expressão o que poderia conferir às células mutantes a capacidade de se autoestimularem via *CD2*. Linhagens de células T infectadas com o HTLV1 são capazes de induzir a atividade de *IL2* em células Jurkat por um mecanismo que envolve o aumento de expressão de *CD58* e estímulo do correceptor *CD2* (163).

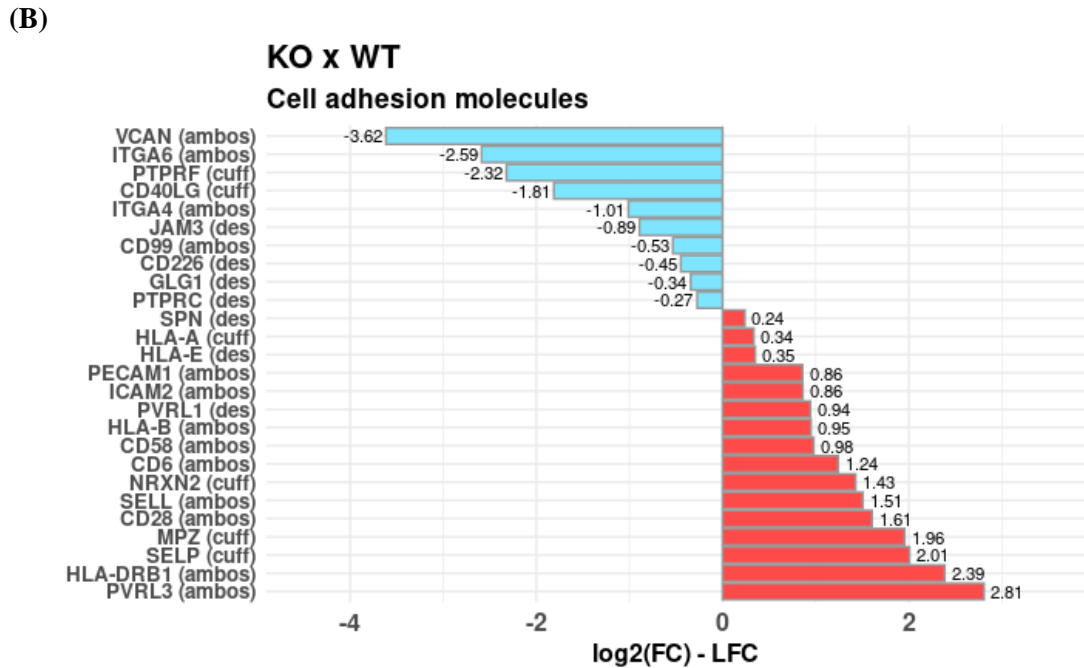
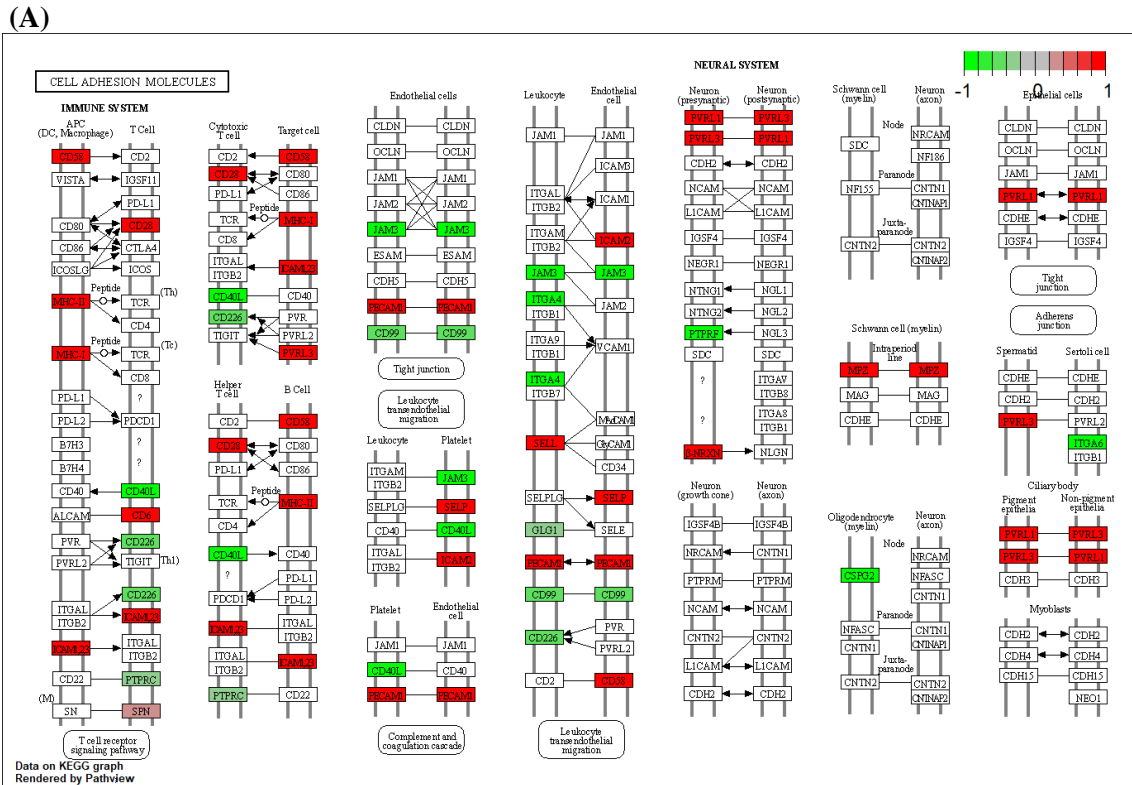


Figura 37) Variação de expressão de genes associados a adesão celular
(A) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo "Cell adhesion molecules" (hsa04514). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9. **(B)** Gráfico de barra mostrando valores de LFC para genes diferencialmente expressos na comparação KO vs WT. As siglas “des”, “cuff” e “ambos” indicam genes cuja expressão diferencial foi detectada pelo protocolo do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por

ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos.

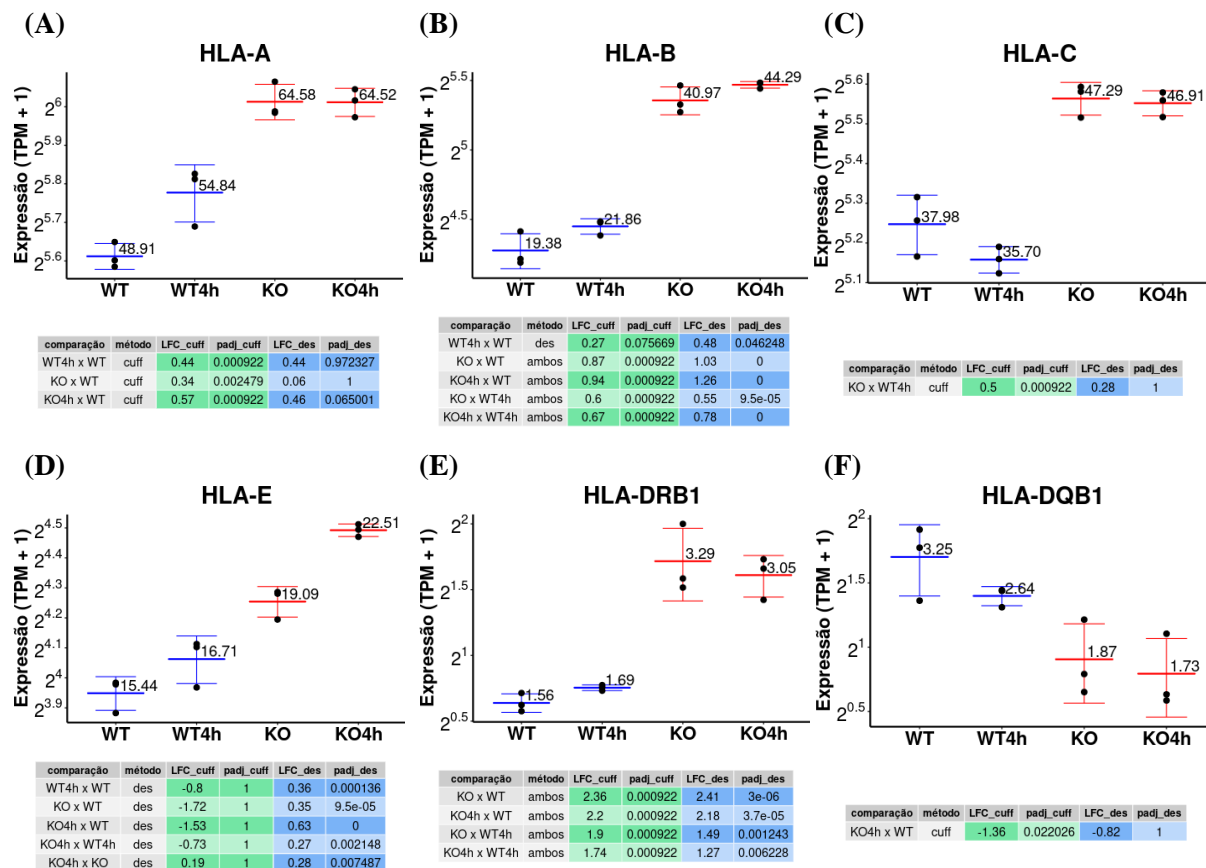


Figura 38) Nível de expressão de genes codificantes para moléculas de (A) (B) (C) MHC de classe I e (D) (E) (F) MHC de classe II

Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a F estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

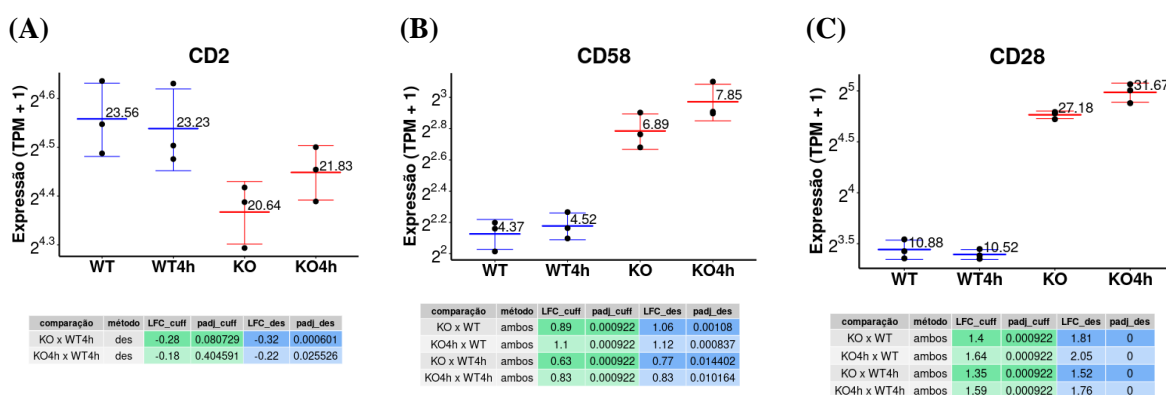


Figura 39) Nível de expressão medido em TPM para os genes (A) CD2, (B) CD58 e (C) CD28

Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para

indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) é expressa em todas as células pertencentes ao compartimento vascular, mas está mais presente nas células endoteliais. As moléculas de PECAM1 nos leucócitos podem interagir com PECAM1 das células endoteliais, contribuindo para o processo de transmigração para o tecido inflamado. Outras moléculas presentes nas junções das células endoteliais como ICAM-2, JAM-1, JAM-3, ESAM e CD99 também estão implicadas no processo de diapedese (63,164,165). As células mutantes apresentaram um aumento de atividade para *PECAM1* e *ICAM2* e uma redução de transcrição para *CD99* e *JAM3*. ICAM-2 geralmente não é expresso em células T e está presente por todo o endotélio. ICAM-1 e ICAM-2 possuem redundância no processo de recirculação de linfócitos através de linfonodos, entretanto, apenas ICAM-1 está envolvido na migração para o local de inflamações de pele e captura de linfócitos nos pulmões (166). CD99 possui uma expressão difusa por muitos tecidos e participa do recrutamento de células T para inflamações de pele. Esta molécula participa de diversos processos biológicos, que incluem adesão celular, migração, diferenciação, diapedese, inflamação e câncer (167). JAM-3 (*junctional adhesion molecule 3*) se associa à proteína de polaridade celular PARD3 para formar um complexo que atua na formação de junções oclusivas (168). Nas células *ITGA4-KO*, *PARD3* também está modulado negativamente, assim como *JAM3* (**Figura 40**).

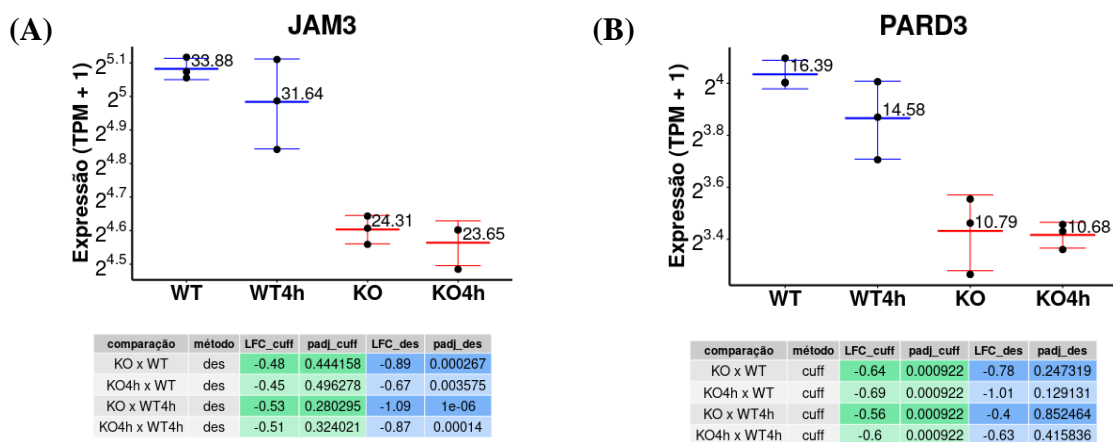


Figura 40) Nível de expressão medido em TPM para os genes (A) *JAM-3* e (B) *PARD3*.

Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de **A** e **B** estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

A L-selectina (CD62L; codificada pelo gene *SELL*) é importante para a interação inicial de leucócitos com células endoteliais, controlando assim o processo de rolamento, adesão e diapedese. Essa molécula controla a entrada de células T *naive* e de memória central em linfonodos, através da ligação às vênulas de endotélio alto (HEVs; *high endothelial venules*), enquanto as P- e E-selectinas têm papel no rolamento de células T ativadas sobre o endotélio vascular inflamado (169). Após o comprometimento da célula T com a ativação via TCR, *SELL* é regulado negativamente, podendo a detecção de sua perda ser utilizada inclusive como um marcador de ativação (170). Entretanto, é importante salientar que estudos com anticorpos bloqueadores e com camundongos CD62L-KO também demonstraram um papel importante para a L-selectina na mediação da inflamação cutânea. Nesse contexto, as células ITGA4-KO, além de apresentarem um fenótipo compatível com ativação e com possível desvio para diferenciação Th1, revelaram um aumento transcricional de *SELL*.

9.2) Perfil de expressão de integrinas

De acordo com o perfil de transcrição de integrinas analisado, VLA-4 aparece como a integrina com maior transcrição em células Jurkat WT (**Figura 41**). A mutação em *ITGA4* promoveu um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão de *ITGA1*; entretanto, os níveis de expressão para este gene são muito inferiores aos da integrina $\alpha 4$ (**Figura 41**). O gene *ITGA6* e o próprio *ITGA4* apresentaram quantidades reduzidas de RNA nas células mutantes. Dos genes codificantes para cadeias β de integrinas, apenas o *ITGB5* apresentou variação de expressão com suporte estatístico. Mas, mesmo com o aumento de transcrição nas células *ITGA4-KO*, a média dos índices de expressão por condição não superaram o valor de 1 TPM.

Para testar o efeito da inativação gênica de *ITGA4* sobre a produção de outras cadeias que se associam à cadeia $\beta 1$ de integrina, foi realizada uma análise da expressão membranar de $\alpha 5$. Nas células mutantes para o gene *ITGA4*, o nível da proteína $\alpha 5$ está pelo menos 2 vezes maior que em células Jurkat não mutantes (**Figura 42**). O aumento da quantidade desta proteína na superfície das células mutantes não é acompanhado por um acréscimo similar de atividade do gene *ITGA5*, o que nos leva a postular um possível ganho de estabilidade da proteína. Na ausência da cadeia $\alpha 4$ e frente a um conseqüente aumento de disponibilidade de subunidades $\beta 1$, mais moléculas $\alpha 5$ poderiam ser mantidas na superfície das células *ITGA4-KO* na forma de VLA-5.

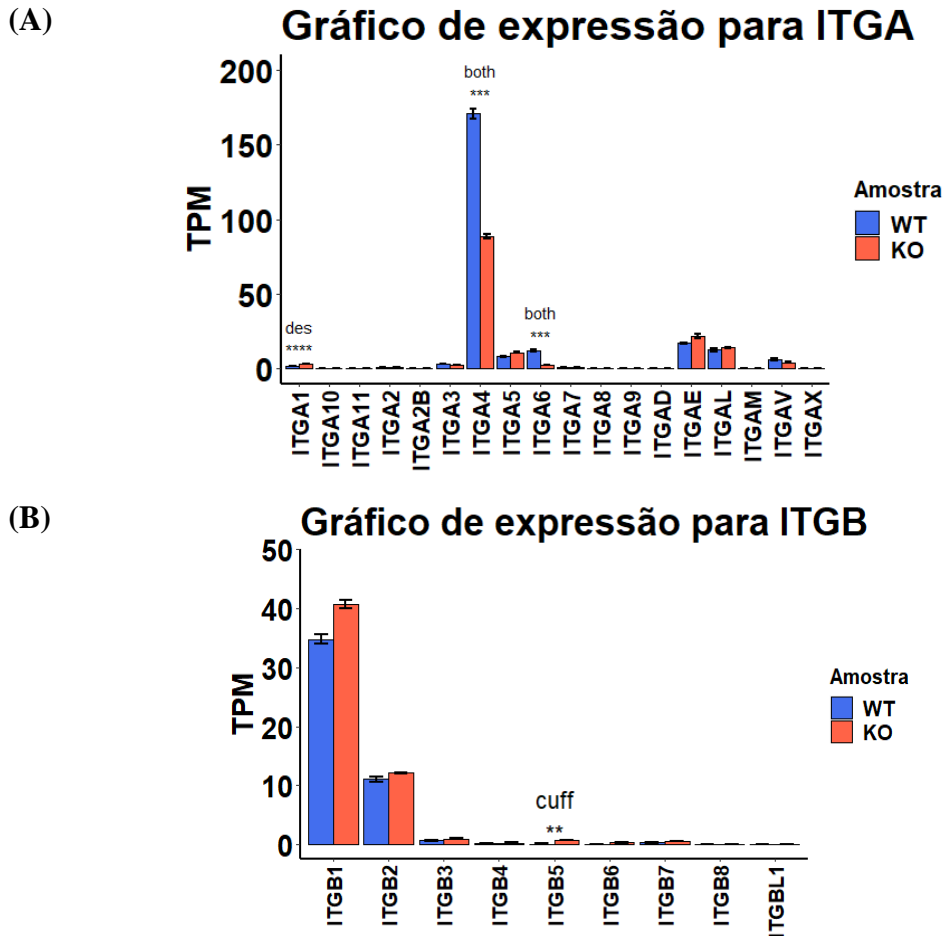


Figura 41) Gráfico de barra mostrando os valores de TPM que representam o perfil de transcrição de integrinas nas células WT e KO

(A) cadeias α (B) cadeias β . Os asteriscos indicam que a diferença de expressão possui um suporte estatístico com p-valor ajustado menor ou igual a 0,0001 (****), 0,001 (***) ou 0,01 (**). Os termos “cuff”, “des” ou “both” indicam que a diferença de expressão foi classificada como significativa pelos métodos do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os testes estatísticos sobre as diferenças de expressão foram realizados com os valores normalizados pelo Cufflinks e/ou DESeq2 e não baseados nos valores de TPM exibidos nos gráficos.

De forma interessante, o silenciamento de *ITGA6* em linhagem de células epiteliais tímicas resultou na redução de expressão membranar das cadeias $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$, que formam as integrinas VLA-2, VLA-3 e VLA-4 em associação à cadeia $\beta 1$ (159). Em contrapartida, o silenciamento de *ITGA5*, também em células epiteliais tímicas, não resultou em um aumento de expressão da subunidade $\alpha 4$ (171). Esses achados suportaram o conceito de *crossstalk* entre as vias de expressão de integrinas no epitélio tímico, com efeitos compensatórios da remoção de uma determinada integrina (159). Nesse sentido, o silenciamento de *ITGA6* em queratinócitos também gerou uma redução de expressão membranar das integrinas $\alpha 3$ e $\beta 4$ sem alterações significativas na produção dos mRNA codificantes para essas proteínas (172). Este achado aponta para a importância de mecanismos de controle pós-transcricionais regulando a

quantidade de integrinas na membrana da célula. Em conjunto, esses dados apontam para a existência de complexos mecanismos de controle de expressão entre integrinas em linfócitos T, justificando a utilização da células Jurkat *ITGA4-KO* como interessante modelo para abordar, em futuros estudos, as bases mecânicas dessa correção de integrinas.

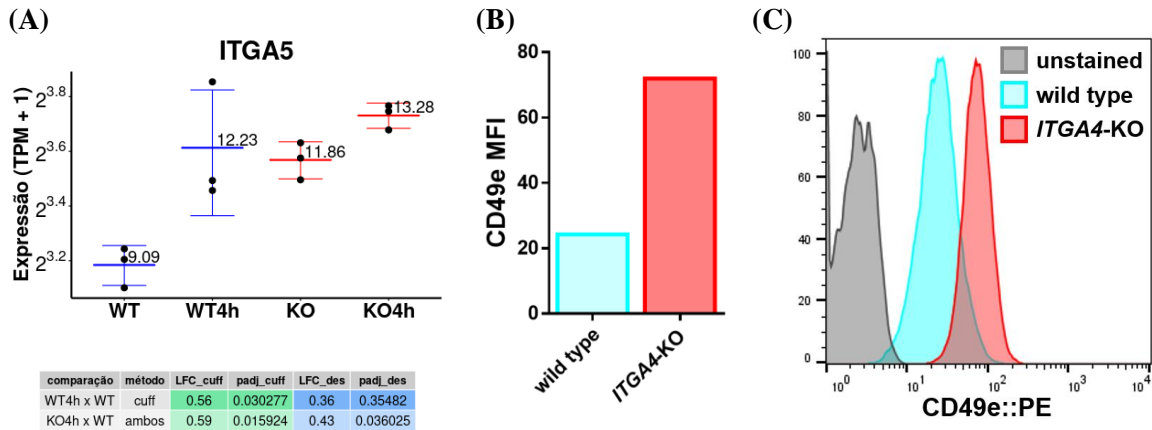


Figura 42) Análise da expressão da subunidade $\alpha 5$ (CD49e)

(A) Expressão do gene *ITGA5*. Os níveis de expressão estão expressos em TPM + 1 e o gráfico está em escala log na base 2. A tabela abaixo do gráfico expõe os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos. (B) Quantificação por citometria de fluxo da proteína $\alpha 5$ na membrana de células Jurkat não-mutantes e mutantes para *ITGA4*. A mediana da intensidade de fluorescência (MFI) é mostrada em um gráfico de barra. Dados representativos de 3 experimentos distintos. (C) Histograma de células marcadas com anti- $\alpha 5$ -PE por intensidade de fluorescência. O controle não marcado (*unstained*) corresponde a células WT *in natura* sem tratamento com anticorpos.

9.3) Ensaios de mobilidade celular

A modulação da expressão de integrinas sugere a modulação concomitante das atividades de motilidade e migratórias consequentes à perda da subunidade $\alpha 4$ de integrinas. Assim, a fim de avaliar a mobilidade das células *ITGA4-KO* frente a fibronectina e outros estímulos, foram realizados ensaios de mobilidade em superfície plana e em câmaras de *transwell*. Em um ensaio para medir a motilidade das duas linhagens celulares sobre uma superfície de vidro recoberta com fibronectina, as células *ITGA4-KO* apresentaram uma velocidade média reduzida comparativamente àquela medida para as células WT (**Figura 43**). A perda de motilidade pelas células *ITGA4-KO* frente à fibronectina era um resultado esperado e este experimento foi realizado apenas uma vez com a filmagem de 5 campos por placa. Os resultados expostos na **Figura 43** representam as medições de todas as trajetórias rastreadas nos 5 campos.

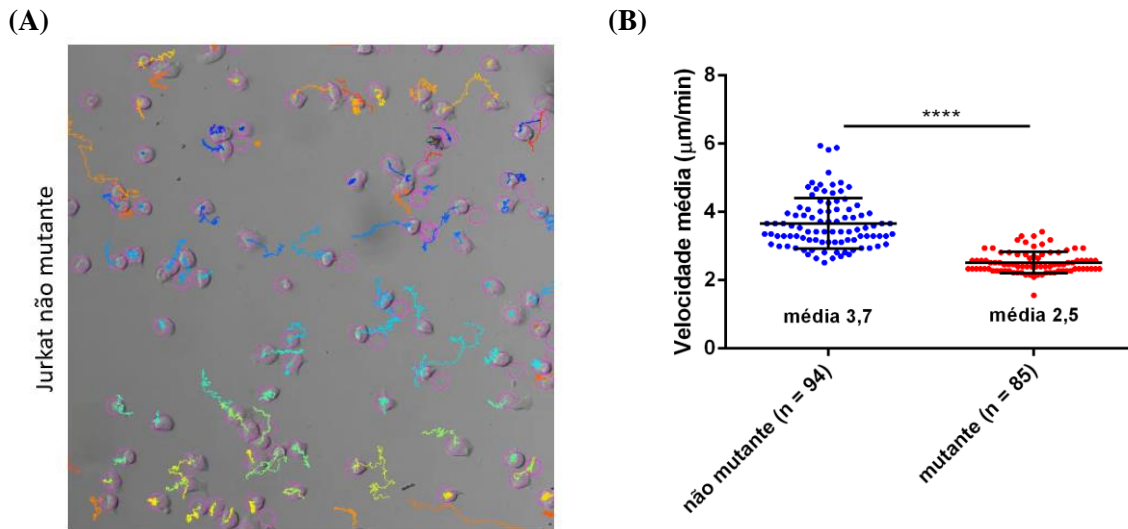


Figura 43) Ensaio de motilidade sobre superfície recoberta com fibronectina

(A) Imagem representativa da análise de rastreamento do movimento celular. A técnica foi utilizada para medir a trajetória e velocidade de locomoção de cada célula. A trajetória da célula está colorida de acordo com a velocidade média e as tonalidades de cor mais quente representam as velocidades mais altas. (B) Gráfico representativo das velocidades médias obtidas para as células Jurkat WT e *ITGA4-KO*. Os asteriscos indicam que a diferença entre as médias possui significância estatística com p -valor $\leq 0,0001$ pelo método de t-student.

Para avaliar a habilidade das células *ITGA4-KO* em realizar transmigração, foram feitos ensaios em câmaras de *transwell*. A linhagem celular mutante apresentou maior atividade de transmigração frente à fibronectina quando comparada às células não mutantes (**Figura 44**). Este resultado, aparentemente incongruente com o obtido para a observação da motilidade sobre uma superfície plana, pode estar relacionado a um processo de migração independente de integrinas. As integrinas, apesar de muito importantes para interações com a EMC, são dispensáveis para o processo de migração de diversas células do sistema imune em diferentes contextos (173). Os leucócitos murinos, mesmo com todos os genes de integrina deletados, migram em igual velocidade dentro de modelos 3D ou em tecidos inflamados (59). Em contrapartida, para linfócitos T, as integrinas são indispensáveis para o processo de adesão ao endotélio, migração contra o fluxo sanguíneo e diapedese (174). Os ensaios de transmigração em câmaras *transwell* podem ser semelhantes a um modelo de migração 3D e outras moléculas de adesão, a maquinaria de remodelamento do citoesqueleto e o tamanho celular podem influenciar bastante na motilidade observada. Por outro lado, o aumento de VLA-5 nas células mutantes poderia facilitar a migração dessas células através da câmara *transwell*. Em experimentos com camundongos NOD (*non-obese diabetic*) comparados a camundongos BALB/c, as células T e os tímócitos NOD apresentam dificuldades para atravessar a película da câmara *transwell* recoberta com fibronectina ao mesmo tempo que possuem uma redução

na expressão de VLA-5, indicando a importância dessa integrina para este modelo de migração (175).

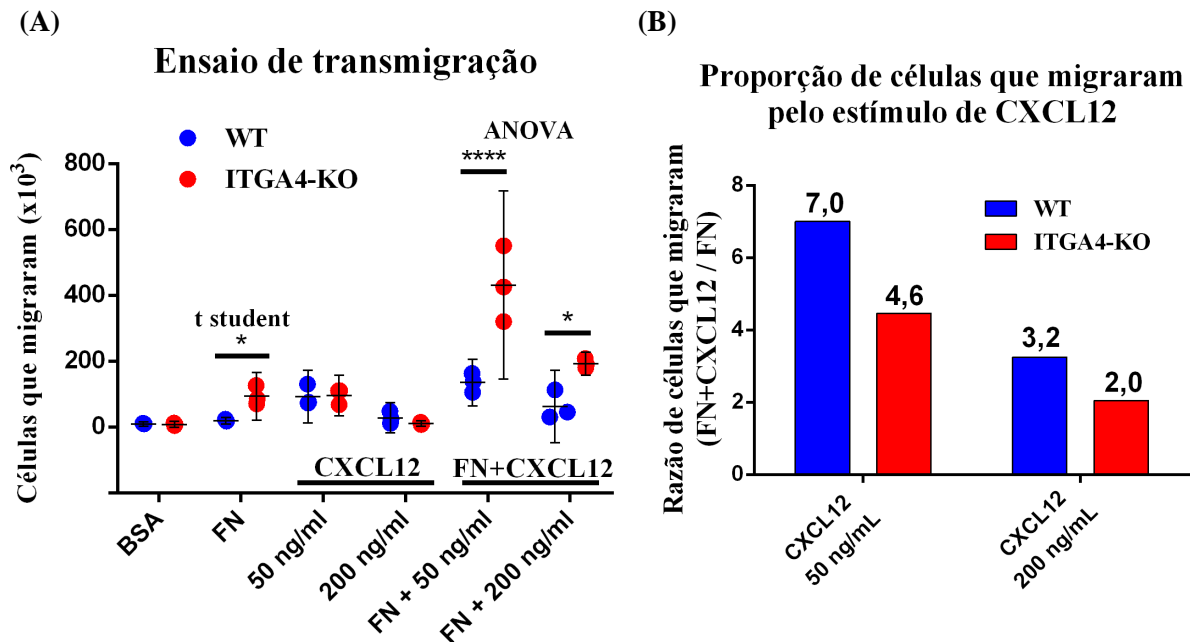


Figura 44) Transmigração frente à fibronectina (FN) e estímulo com CXCL12

A) número total de células que transmigraram B) razão das médias de transmigração (FN mais estímulo com CXCL12 em duas concentrações versus FN somente). O experimento foi repetido 3 vezes e a análise estatística foi feita pelo método ANOVA ou *t-student* (* indica que a diferença entre as médias possui significância estatística com p-valor $\leq 0,05$ e **** indica um p-valor $\leq 0,0001$). A média aritmética e o intervalo de confiança de 95% são por linhas pretas.

Ambas as linhagens celulares responderam positivamente ao estímulo com CXCL12 colocada na câmara inferior (para a qual as células devem migrar). O estímulo com o fator quimiotático teve maior efeito sobre a transmigração das células não mutantes. As células não mutantes migraram 7 vezes mais frente a fibronectina e estímulo com CXCL12 a 50 ng/mL do que frente a fibronectina somente. A mesma concentração de CXCL12 gerou um aumento de apenas 4,6 vezes na transmigração das células ITGA4-KO. Ambas as células possuem uma resposta dependente da dose e o estímulo com 50 ng/mL gerou uma quimioatração maior que o estímulo com 200 ng/mL de CXCL12. Nas duas condições experimentais a resposta proporcional das células WT foi maior que a das células ITGA4-KO.

É interessante notar que o receptor CXCR4, capaz de reconhecer especificamente a quimiocina CXCL12, é menos transcrito em células mutantes do que em células WT (**Figura 45**). Em contrapartida, o *ACKR3* (*atypical chemokine receptor 3*), também conhecido como o gene codificante para CXCR7 (*C-X-C chemokine receptor type 7*), outro receptor específico para CXCL12, possui atividade aumentada nas células mutantes. Entretanto, *ACKR3* é dezenas

de vezes menos expresso que *CXCR4* e, mesmo com aumento de atividade, poderia não ser capaz de suprir a deficiência de *CXCR7*.

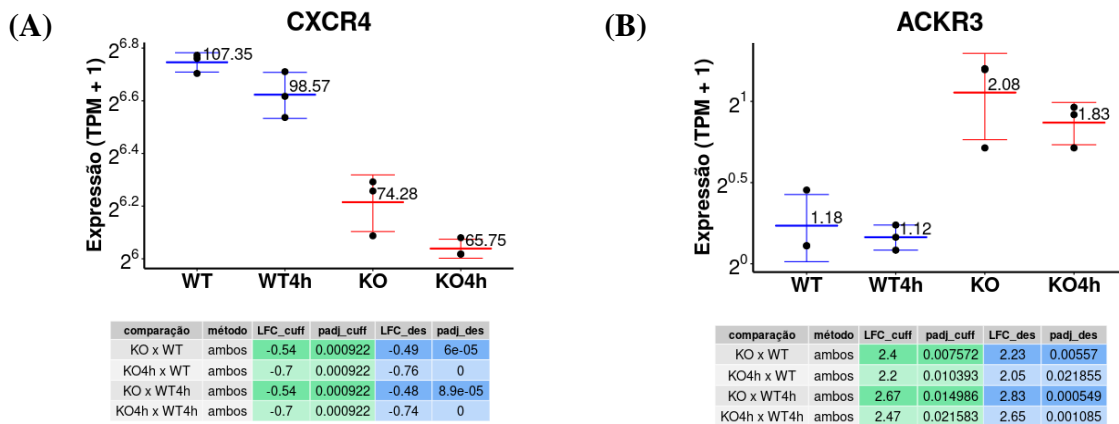


Figura 45) Perfil de transcrição de receptores de CXCL12

(A) *CXCR4*; (B) *ACKR3* (*CXCR7*). Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A e B estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

Já foi reportada a atividade cooperativa de estímulo adesivo e quimiotático em células T, mediados respectivamente por fibronectina e *CXCL12*. Ambos os sinais resultam em efeito sinérgico na fosforilação de *VAV1* e ativação de *WASP* (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*, resultando em um eficiente processo de migração de células T humanas (176,177). A redução de expressão de *CXCR7* na ausência de *VLA-4*, pode ser um indicativo de um mecanismo de retroalimentação da sinalização por estímulo adesivo e quimiotático que foi perturbado na remoção de *ITGA4*.

9.4) Mobilização intracelular de cálcio

Durante os testes preliminares de ativação das células para preparar as amostras para o RNA-Seq, nos deparamos com o surpreendente achado de que as células *ITGA4-KO* possuíam menor mobilização de cálcio intracelular que as células Jurkat WT. A mobilização de cálcio foi medida por citometria de fluxo, através do sensor de cálcio eFluor 514, após a adição de ionomicina (Figura 46). A ionomicina é um ionóforo utilizado para mimetizar parte da sinalização deflagrada pela ativação via TCR, por permitir um influxo de cálcio na célula em estudo. O influxo inicial de cálcio produzido por ionomicina, que atuando como um ionóforo, permite o transporte membranar de cálcio do meio extracelular para o intracelular, além de

induzir canais de cálcio ativados pela depleção dos estoques intracelulares de cálcio (178). Essa mobilização de cálcio para o citoplasma foi observada nas células WT, mas não foi visualizada nas células ITGA4-KO.

Para quantificar a mobilização de cálcio mediada somente por canais de cálcio, o deslocamento deste íon foi medido por fluorimetria com células estimuladas por ATP (**Figura 47**). Nestes experimentos, o efluxo do sensor de Ca^{2+} Fluo-3 por meio de transportadores ABC foi bloqueado através de um tratamento com probenicida. Após estímulos com ATP, as células mutantes apresentaram um deslocamento de cálcio aproximadamente 2,5 vezes menor que as células WT. Como controle positivo do sensor de cálcio foi utilizado a linhagem celular de macrófagos J774-G8 (179) e como controle negativo do estímulo foi utilizada uma solução salina (PBS). O sinal basal de fluorescência foi medido por 20 segundos, quando então foi aplicado a dose do estímulo. Ambas as linhagens celulares responderam com a mesma velocidade, entretanto com intensidades diferentes.

Em conjunto, esses experimentos indicam que as células ITGA4-KO apresentam uma mobilização de cálcio menos eficiente que as células Jurkat WT. Em paralelo a esses achados, verificamos que as células mutantes possuem uma redução de atividade dos genes *CACNB3* (*Voltage-Dependent L-Type Calcium Channel Subunit β -3*) e *CACNB4* (*Voltage-Dependent L-Type Calcium Channel Subunit β -4*), que codificam para subunidades β do canal de cálcio voltagem-dependente tipo L (Ca_v1) (**Figura 48**). Somado a isso, o gene codificante para o RNA *CACNA1C-AS1* (*CACNA1C antisense RNA 1*) está regulado positivamente. Este lncRNA é anotado como regulador negativo da tradução da cadeia $\alpha1$ do canal de cálcio $\text{Ca}_v1.2$ e, de acordo com análises utilizando a plataforma LncTar, ele pode ligar-se ao mRNA codificante para *CACNA1C* com um ΔG na ordem de -420 kcal/mol. Embora não haja validação estatística da diferença entre as médias dos índices de expressão para todos esses genes na comparação KO vs WT, as análises apontam para uma redução de expressão dos mRNA codificantes para as cadeias β e aumento de transcrição de *CACNA1C-AS1* nas células mutantes, sugerindo um amplo efeito da inativação de ITGA4 sobre genes envolvidos na mobilização de cálcio em células T.

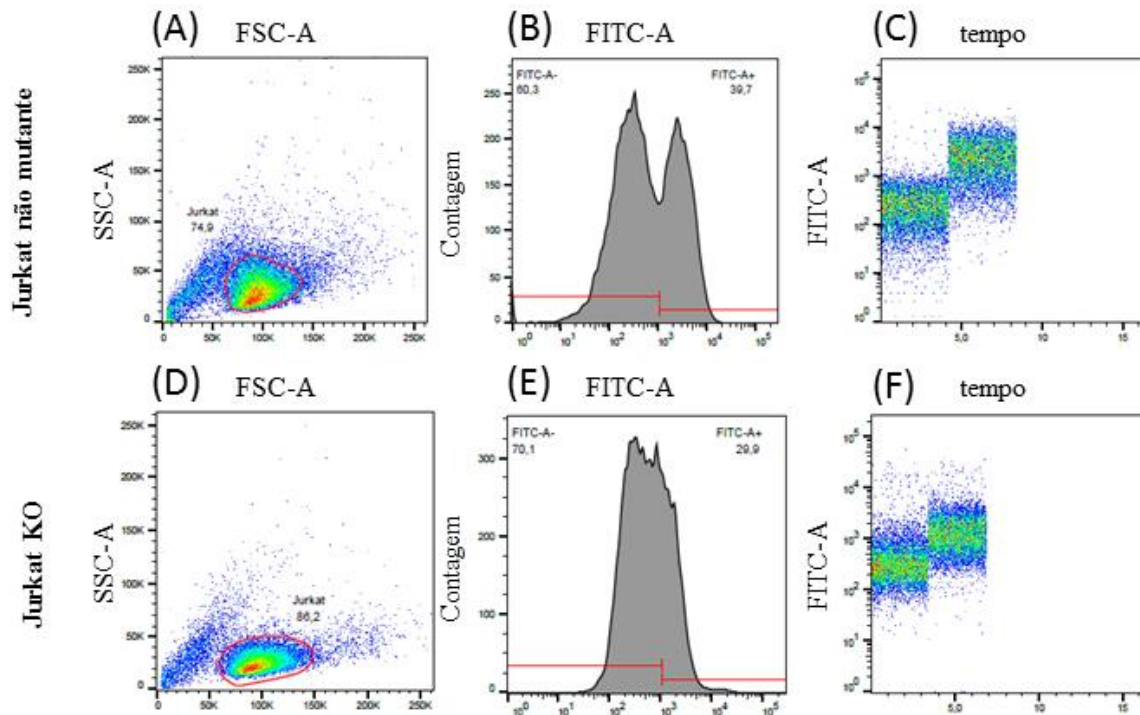
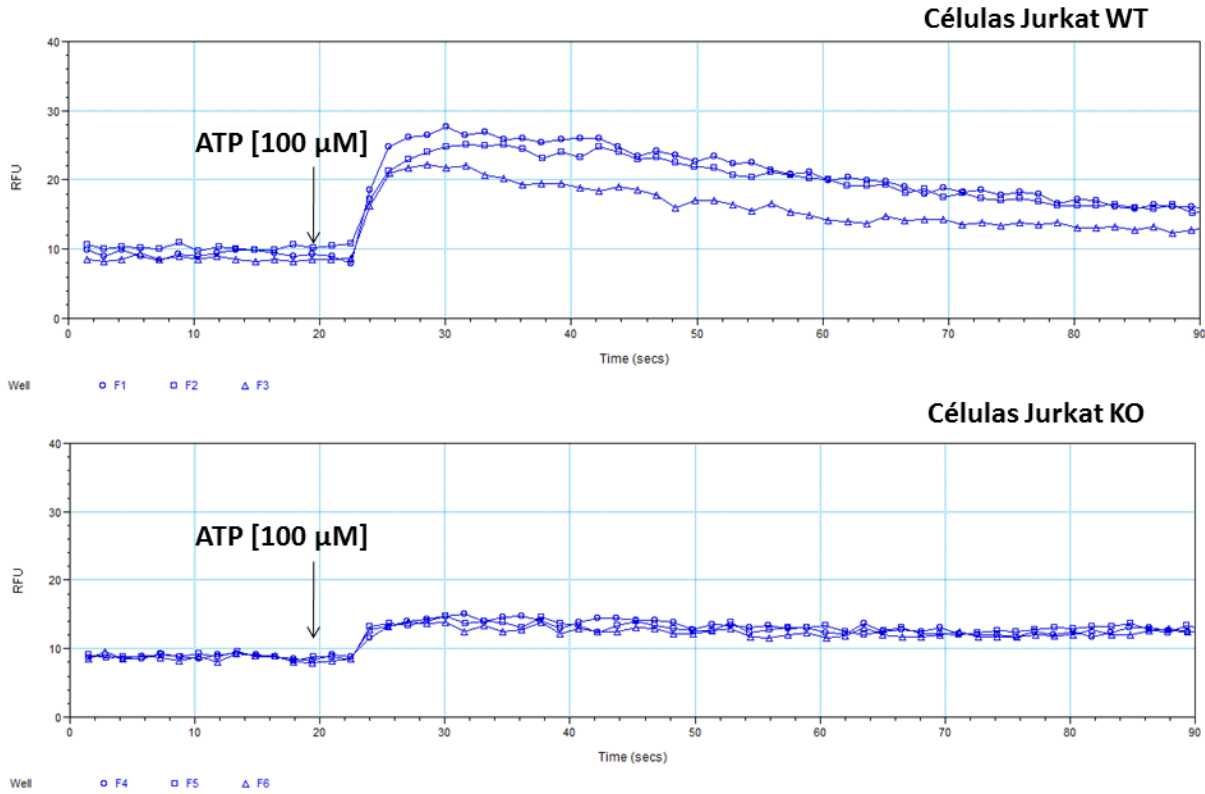


Figura 46) Medida do deslocamento intracelular de cálcio por citometria de fluxo

(A) (D) Estratégia para seleção de células; (B) (E) histograma de células por intensidade de fluorescência após a adição de ionomicina; (C) (F) intensidade de fluorescência detectada ao longo do tempo. Dados representativos de 2 experimentos distintos.

Nesse contexto, ressaltamos também que, dos quatro genes codificantes para fitas $\alpha 1$ de canais cálcio voltagem dependente do tipo L, apenas *CACNA1C* (*Cav1.2*) e *CACNA1D* (*Cav1.3*) apresentaram expressão detectável nas células Jurkat e ambos são menos transcritos nas células mutantes. O canal de cálcio *Cav1.4*, formado ao redor da fita $\alpha 1$ *CACNA1F*, já foi implicado no desenvolvimento e sobrevivência de células T imaturas (180); entretanto, os dados do transcriptoma apontam para restrições de expressão dos canais *Cav1.2* e *Cav1.3* nas células *ITGA4-KO*. Ainda é necessário fazer experimentos funcionais para melhor entendermos a natureza da diferença entre as linhagens WT e KO quanto a mobilização de cálcio. Dentre estes experimentos, podemos citar o teste da mobilidade e cálcio após o tratamento com inibidores seletivos de canais de cálcio, como as dihidropiridinas ou o diltiazem (Figura 48 E), e após o silenciamento de genes como *CACNA1C* e *CACNA1D*.

(A)



(B)

Análise do deslocamento intracelular de Ca^{2+}
após estímulo com ATP

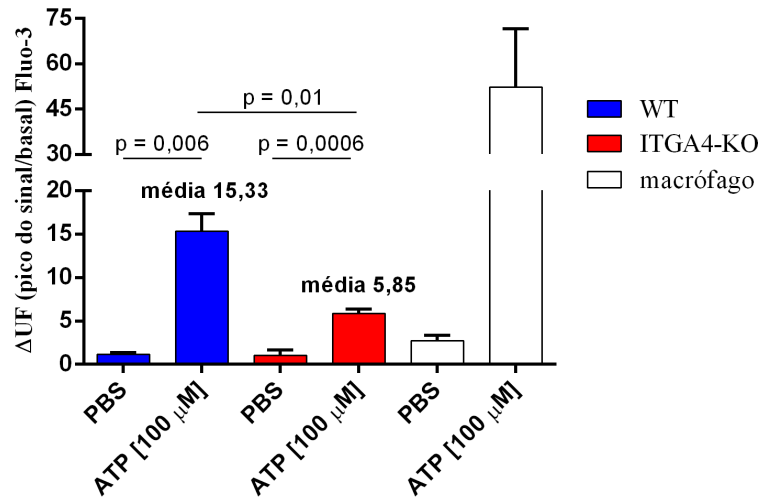


Figura 47) Medida do deslocamento de cálcio feita em leitor de microplaca FlexStation III

(A) Gráfico exibindo a emissão de unidades fluorescência (UF) pelo sensor de Ca^{2+} Fluo-3 ao longo do tempo. Figura representativa de 3 experimentos. (B) Gráfico de barra mostrando a variação total de fluorescência por tipo celular e estímulo. A hipótese nula de diferença entre as médias foi testada pelo método *t-test*. O desvio padrão está representado pela linha acima da barra e o experimento foi realizado 3 vezes com triplicata experimental.

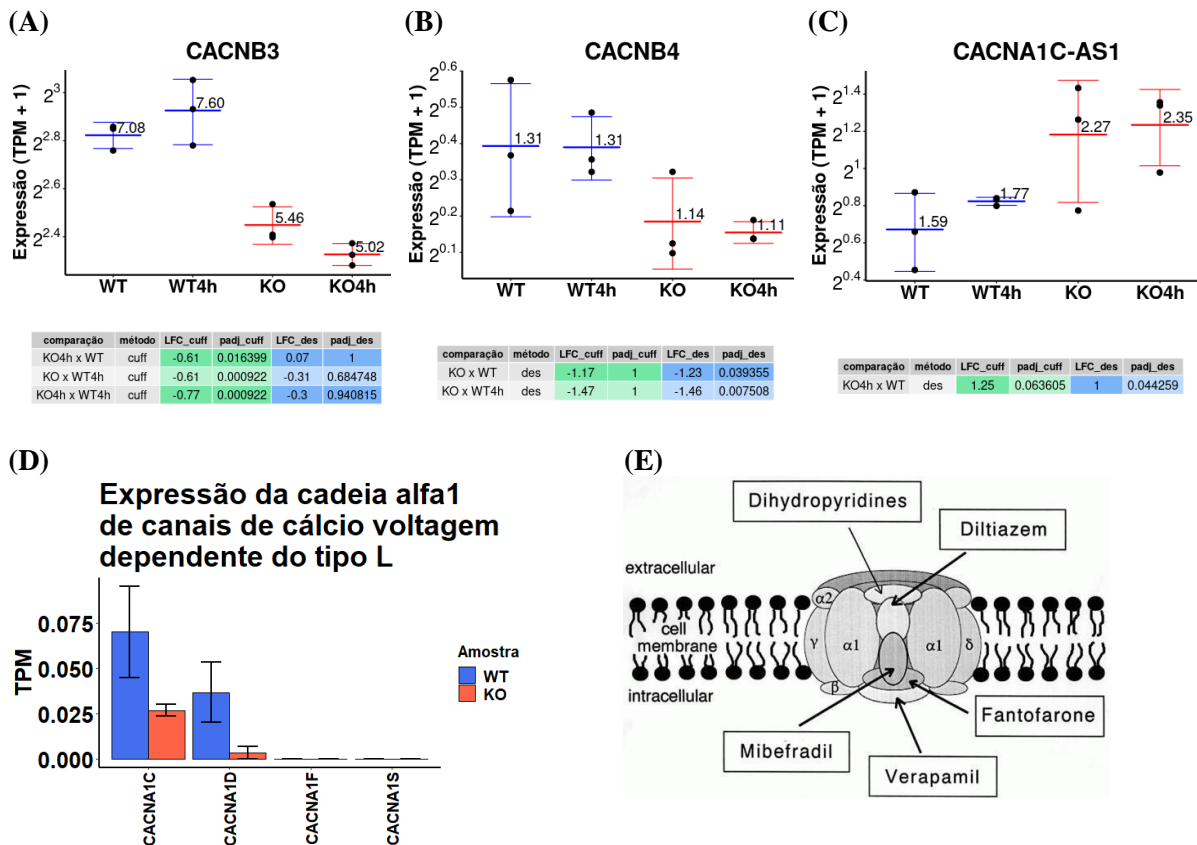


Figura 48) Nível de expressão medido em TPM para genes envolvidos no influxo de cálcio mediado por canais voltagem dependentes do tipo L

(A) (B) Genes codificantes para fitas β (C) RNA antisense com capacidade de ligar-se ao mRNA de CACNA1C ($Ca_v1.2$). Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks e “des” para se referir ao DESeq2. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos. (D) Genes codificantes para as fitas $\alpha1$ de canais Ca_v1 . (E) Estrutura dos canais Ca_v1 e sítios de ligação de bloqueadores de canais de cálcio com diferentes níveis de seletividade (fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_channel).

9.5) Conclusão parcial da quinta parte dos resultados e discussão

A inativação de *ITGA4* promoveu uma acentuada modificação do perfil de expressão de moléculas de membrana, com alteração de atividade de genes codificantes para outras integrinas, componentes do MHC, selectinas, proteoglicanos e canais iônicos. Nesse sentido, as células *ITGA4-KO* apresentaram uma perda de velocidade média no deslocamento sobre uma superfície recoberta com fibronectina. Contudo, estas células apresentaram maior taxa de transmigração em experimentos em câmaras de Transwell recobertas com fibronectina.

As células mutantes também apresentaram uma redução de atividade dos genes codificantes para canais de cálcio voltagem dependente com correspondente perda de mobilização de cálcio intracelular.

10) RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 6: MIMETIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO VIA TCR COM ANTICORPOS ATIVADORES

A sexta e última parte dos resultados é dedicada às análises referentes ao experimento de mimetização da ativação via TCR utilizando células *ITGA4-KO* e WT tratadas com anticorpos ativadores. Até o momento já foi descrito que as células mutantes ganharam um perfil de expressão gênica compatível com a ativação e regulação da ativação por alças de retroalimentação negativa. Será dado foco em como ficou o transcriptoma dessas células após induzi-las à ativação com anticorpos.

10.1) Expressão de marcadores de ativação

As células *ITGA4-KO* apresentaram um fenótipo indicativo de ativação linfocitária com uma tendência para a diferenciação em Th1. Entretanto, quando essas células foram ativadas por 4 horas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, apresentaram uma ativação mais branda que as células Jurkat WT, de acordo com o perfil transcricional de *CD69* e *Nur77* (proteína codificada pelo gene *NR4A1*), marcadores de ativação recente de células T expressos, respectivamente, na membrana e no núcleo da célula. De fato, as células mutantes apresentam um aumento de atividade de *CD69* e *NR4A1* e, após a estimulação, as células WT atingiram níveis mais altos de transcrição para os mesmos genes.

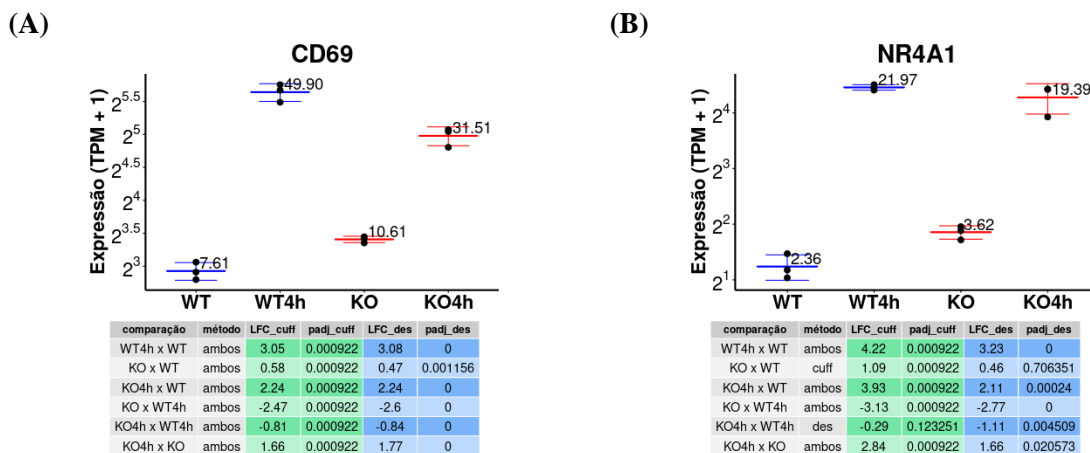


Figura 49) Nível de expressão de genes codificantes para marcadores de ativação linfocitária (A) *CD69* - marcador de expressão membranar e (B) *Nur77* - marcador de expressão nuclear. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A e B estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

É importante salientar que CD69 é um receptor transmembranar da família das C-lectinas do tipo II e sinaliza por intermédio das moléculas de JAK3 e STAT5. Sua expressão é aumentada logo após a estimulação de leucócitos e, em linfócitos T, sua função está associada à modulação da resposta emigratória dirigida por esfingosina-1-fosfato (S1P) de órgãos linfoides periféricos. Ao redor do promotor de *CD69* há sítios de ligação para os fatores de transcrição NFKB1, EGR1 e JUN (181). Nossos resultados revelam que as células *ITGA4-KO* possuem um aumento de transcrição de NFKB1, mas menor atividade dos genes ERG1 e JUN, mesmo após ativação (**Figura 50**). A menor expressão de CD69 nas células mutantes ativadas pode estar associada a reduzida atividade de ERG1 e JUN em comparação com as células WT.

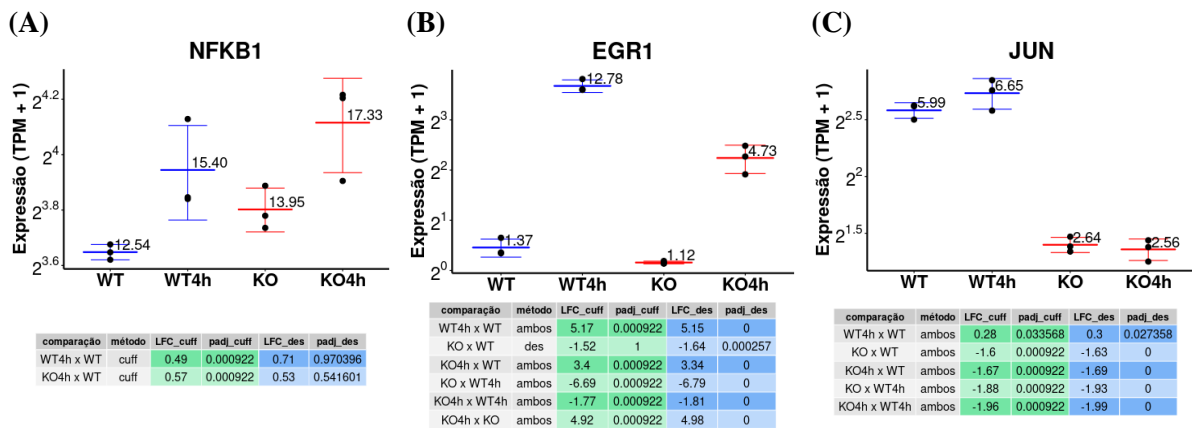


Figura 50) Nível de expressão de genes codificantes para fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação de expressão de CD69

(A) NFKB1 (B) EGR1 (C) JUN. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

Nur77 é um fator de transcrição capaz controlar a expressão de diversos genes associados ao metabolismo energético sendo um elemento-chave para a transição metabólica observada durante a ativação de células T. Além disso, a perda de função de *NR4A1* está associada a fenótipos de maior susceptibilidade a ativação celular e autoimunidade, o que indica seu papel no aumento da tolerância aos sinais de ativação (182). As células *ITGA4-KO* além de apresentarem um aumento de transcrição de Nur77, também possuem alterações transcricionais compatíveis com uma modificação do perfil metabólico, como abordado na seção 8.2, e apresentaram um aumento de tolerância de ativação por responderem com menor eficiência quando tratadas com anticorpos ativadores.

10.2) Avaliação da intensidade do efeito do tratamento com anticorpos ativadores sobre as células mutantes

Para avaliarmos o impacto da mimetização da ativação via TCR nas células ITGA4-KO e WT, foi realizado uma análise de proximidade entre as amostras sequenciadas por clusterização com base na distância de Jaccard (**Figura 51**). A clusterização utilizando os índices de expressão de todos os genes diferencialmente expressos pelo método do DESeq2, agrupou as amostras por tipo celular e distinguiu os grupos tratados e não tratados com anticorpos anti-CD3/CD28. A distância de Jaccard entre as células WT antes e depois do processo de ativação é maior que a distância entre as células mutantes antes e após o mesmo tratamento. Para melhor observar essa diferença nas distâncias de Jaccard, a mesma análise de clusterização foi realizada considerando-se somente os 78 genes DE durante a ativação das células WT e ITGA4-KO. Esses resultados indicam que a amplitude da variação de expressão dos genes modulados com a ativação via com anticorpos é menor nas células ITGA4-KO. Em ambas as análises, todos os clados referentes às 4 amostras biológicas agruparam em mais de 94% dos cladogramas construídos com um teste de bootstrap de 10 mil replicatas.

Para visualizar as diferenças de expressão relacionadas ao processo de ativação, foi montado um mapa de calor com os índices de expressão medidos em TPM para os genes DE durante a ativação das células WT e ITGA4-KO (**Figura 69, ANEXO 8**). Um grupo de 161 genes DE ($FC \geq 2$) para as comparações WT4h vs WT e KO4h vs KO, conforme análise com os métodos do Cufflinks e/ou DESeq2, foram visualizados após clusterização. O maior grupo de genes coexpressos estão anotados no cladograma com a barra de cor vermelha e corresponde a genes regulados positivamente durante a ativação de ambos os tipos celulares. Este *cluster* pode ser visualizado em maior aumento na **Figura 52** e possui duas características marcantes: é possível observar níveis de expressão mais atenuados no subgrupo KO4h em comparação com o subgrupo WT4h e há uma maior homogeneidade nos padrões de expressão entre os genes deste *cluster* do que entre os genes pertencentes aos demais *clusters*. Dentre os genes pertencentes ao *cluster* destacado na **Figura 52**, encontramos importantes reguladores de ativação como EGR1, FOS e JUNB que fazem parte dos chamados genes imediatos e participam da primeira resposta a estímulos de proliferação celular.

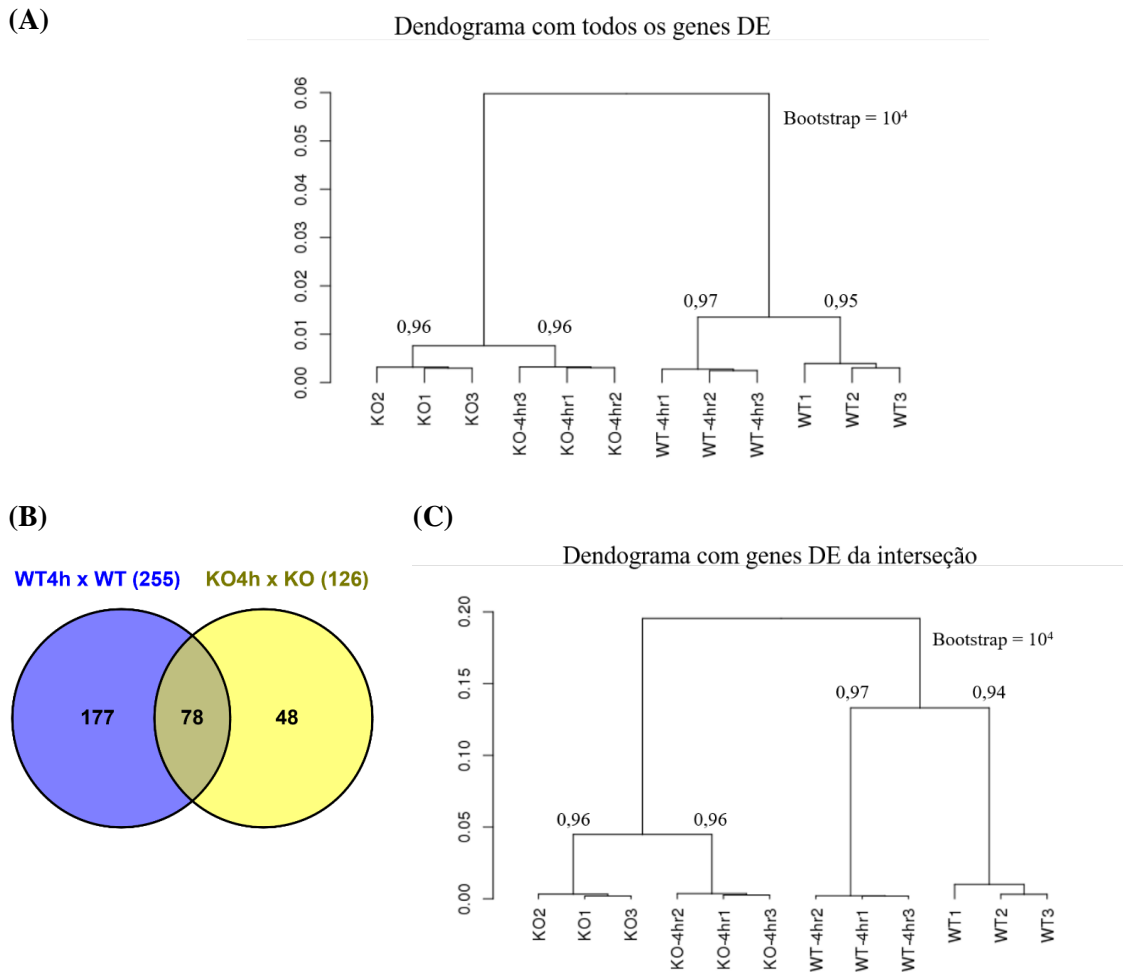


Figura 51) Clusterização das amostras com base nos genes diferencialmente expressos de acordo com o método do DESeq2

(A) todos os genes DE em qualquer uma das 6 comparações possíveis (B) diagrama de venn mostrando o número de genes na interseção dos grupos gênicos modulados durante a ativação das células WT e KO (C) somente genes DE para a interseção entre as comparações WT4h vs WT e KO4h vs KO. A significância do teste de Bootstrap é indicada na origem do clado correspondente a cada amostra biológica.

EGR-1 e FOS são proteínas do tipo dedo de zinco capazes de se ligarem ao promotor de *IL-2*, desempenhando um papel crucial para a ativação linfocitária (183). Durante a ativação das células ITGA4-KO, foi observado uma menor ativação de *IL2* em comparação às células WT (**Figura 53**). NAB2, que atua junto EGR-1 na ativação de *IL2*, também possui perfil de expressão semelhante e pode ser um corresponsável pela reduzida atividade de *IL2* nas células mutantes (184). Outro gene alvo de EGR-1 é *CD40LG* que também está alocado no mesmo cluster anotado com a cor vermelha na **Figura 52**. Os membros 2 a 4 da família dos EGR são modulados de forma semelhante ao *EGR1* (**Figura 54**). Estes genes EGR são modulados independentemente da síntese de proteína, o que sugere sua participação na resposta imediata aos sinais percebidos na membrana da célula. Além disso, EGR-2 e -3 já foram apontados como

reguladores negativos da resposta imune e responsáveis pelo estado de anergia da célula em repouso (184). Apesar das células *ITGA4-KO* apresentarem um perfil de expressão compatível com a ativação celular, foi observado no seu transcriptoma uma supressão da resposta de importantes genes imediatos com consequente expressão atenuada dos seus genes alvos.

Associado a redução de expressão de genes imediatos nas células *ITGA4-KO*, há um aumento de expressão de reguladores da via canônica do TCR como *PTPN2*, *PTPN6* e *CSK* (*C-Terminal Src Kinase*) (**Figura 55**). Ambas modificações presentes nestas células podem ser componentes de alças de regulação negativa resultante do fenótipo de ativação. *PTPN6* é um elemento clássico de uma alça de regulação negativa da via do TCR (185) e responde ao tratamento com anticorpos ativadores, em ambas as linhagens celulares, com acentuado aumento de expressão. Os níveis de transcrição de *PTPN6* nas células *ITGA4-KO* não ativada são equivalentes aos índices de transcrição deste gene nas células WT após 4 h de ativação. Nas células mutantes, os níveis de transcrição de *PTPN6* sobem ainda mais, levando-nos a crer que a ação das alças reguladoras negativas, já ativadas nas células *ITGA-KO* não tratadas, contribuem para o processo de ativação mais atenuado após mimetização da ativação da via do TCR com anticorpos.

10.3) Conclusão parcial da sexta parte dos resultados e discussão

As células *ITGA4-KO* apresentaram aumento de expressão de marcadores de ativação de um linfócito T, mas quando submetidas ao tratamento com anticorpos ativadores apresentaram menor amplitude de variação de genes associados à ativação. Esses resultados provavelmente são devido à expressão nas células mutantes de genes reguladores da ativação como *SHP1* e reguladores da via JAK-STAT (que foi abordado na parte 3 dos resultados). A menor mobilização de cálcio das células *ITGA4-KO* (que foi abordado na parte 5 dos resultados) também pode ter contribuído para uma ativação menos proeminente.

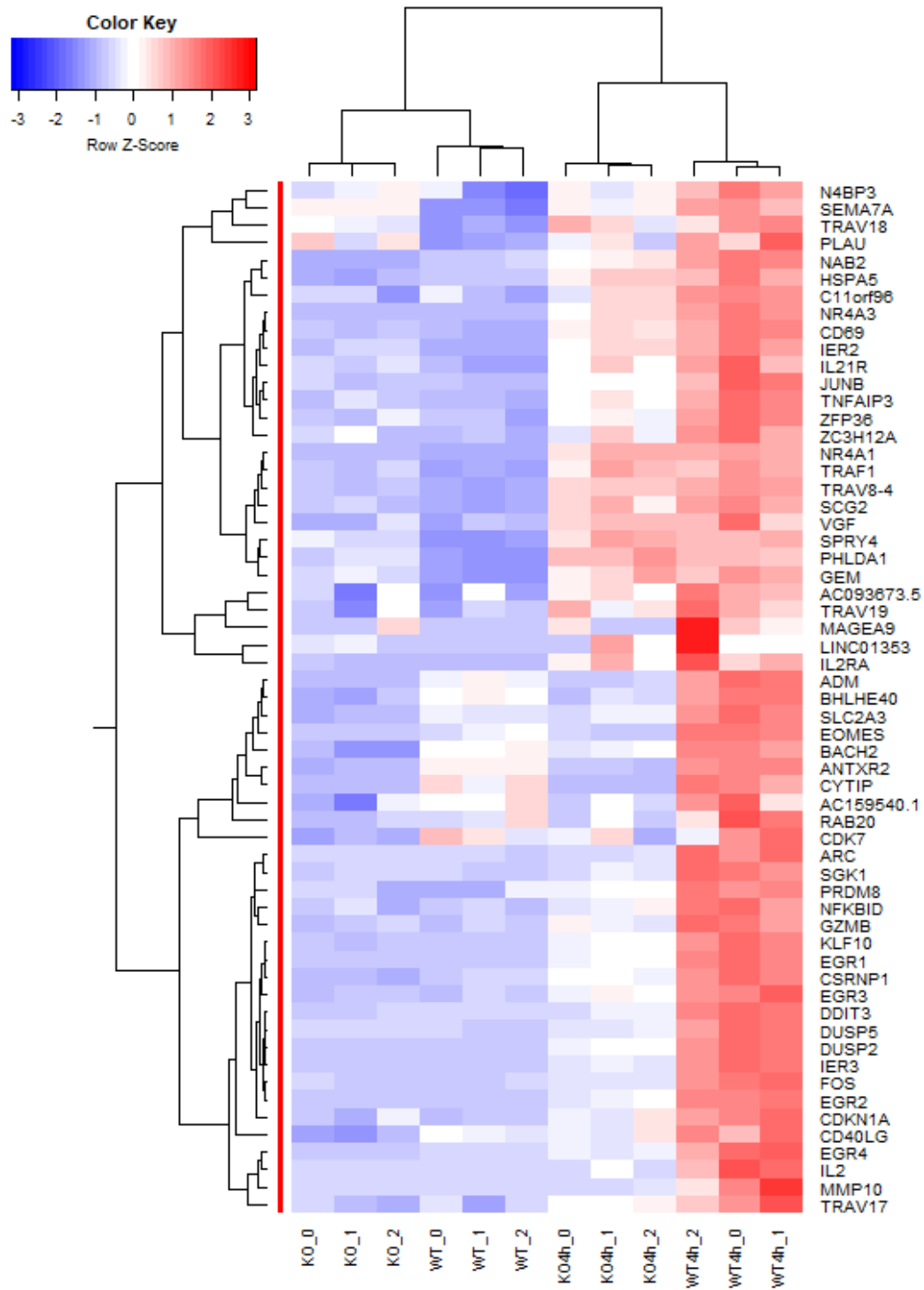


Figura 52) Mapa de calor mostrando o perfil de expressão de 55 genes diferencialmente expressos durante a ativação das células WT e KO com um valor de $FC \geq 2$

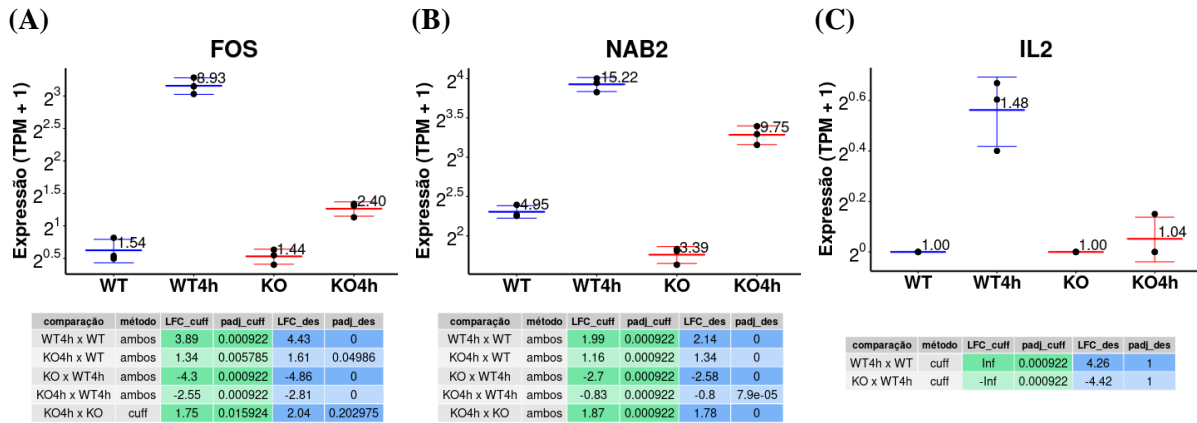


Figura 53) Nível de expressão de genes envolvidos na produção de IL-2

(A) *FOS*, (B) *NAB2* e (C) *IL2*. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

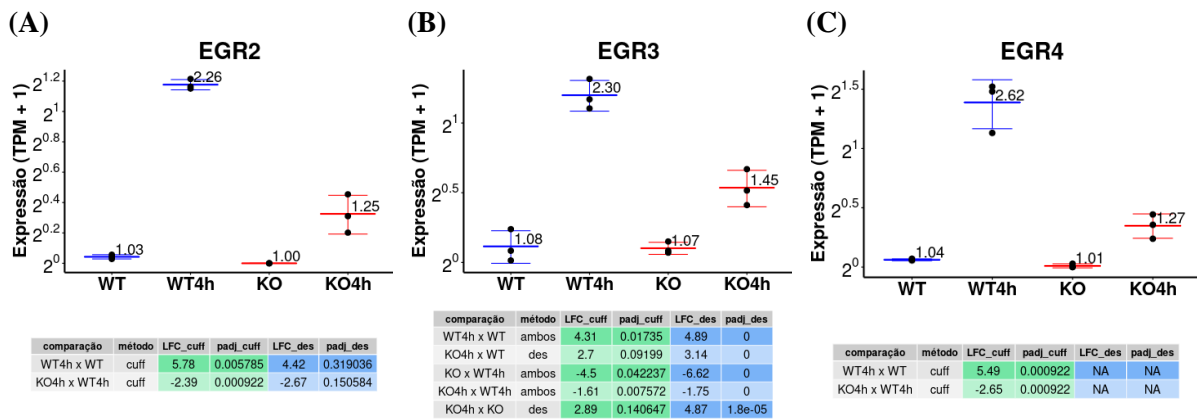


Figura 54) Nível de expressão de genes da família EGR

(A) *EGR1*, (B) *EGR2* e (C) *EGR3*. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos de A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

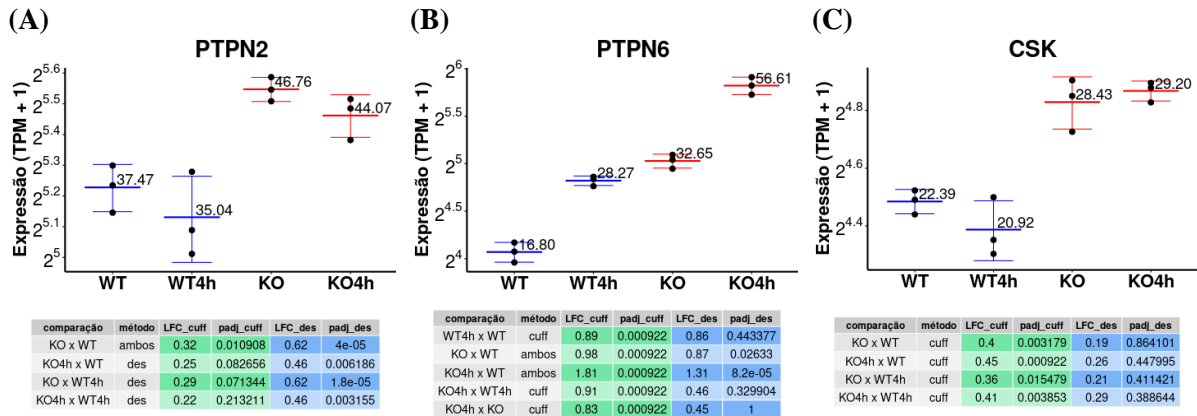


Figura 55) Nível de expressão de genes reguladores da via do TCR

(A) *PTPN2*, (B) *PTPN6* e (C) *CSK*. Os níveis de expressão estão expostos em TPM + 1 e os gráficos A a C estão em escala log na base 2. As tabelas abaixo dos gráficos de expressão expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

11) CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A mutação gerada por CRISPR/Cas9 no clone E8H4E5 bloqueou a possibilidade de produção de uma proteína funcional a partir do gene *ITGA4*. Embora não tenhamos realizado experimentos de resgate de fenótipo, os resultados encontrados na caracterização funcional da linhagem ITGA4-KO mostraram fenótipos com alterações bastante surpreendentes. Dentre eles podemos citar a perda de volume celular, perda de capacidade para ajustar a taxa de crescimento celular às condições do meio de cultivo, maior capacidade transmigatória frente à fibronectina em experimentos com câmaras transwell e menor mobilização de cálcio.

Além disso, a caracterização molecular feita por RNA-Seq sugere que a perda da subunidade $\alpha 4$ de integrinas promoveu um fenótipo compatível com a ativação e polarização em linfócitos de fenótipo Th1.

Por outro lado, as células ITGA4-KO responderam com menor intensidade ao tratamento com anticorpos para mimetizar a ativação via TCR. Até então, as integrinas nunca haviam sido relacionadas a uma função supressora da ativação e apenas a importância de LFA-1 para a coestimulação da via do TCR tinha sido reportada. A remoção de VLA-4 com consequente perfil transcricional compatível a ativação linfocitária traz uma nova perspectiva sobre o papel dessa integrina para o sistema imune. Esses resultados são de suma importância para abordagens que visavam o *ITGA4* como potencial alvo para terapia gênica, pois, até então, não se considerava que sua inativação poderia modular a ativação de células T.

Do ponto de vista técnico, é preciso ponderar que estas observações foram feitas com apenas uma linhagem ITGA4-KO e é necessário confirmar esses achados em outros clones também mutantes nulos para a integrina $\alpha 4$. Também temos como perspectiva, avaliar o silenciamento gênico de *ITGA4* em cultivos primários de células T humanas para observar o efeito da perda de função de VLA-4 sobre a ativação e diferenciação dessas células.

11.1) Proliferação celular

As células Jurkat ITGA4-KO apresentam igual velocidade de crescimento que as células WT nas fases iniciais de crescimento, entretanto elas retardam a entrada na fase de desaceleração. Já foi visto que a deleção da integrina $\beta 1$ na linhagem MDA-MB-231, de câncer de mama, gerou um aumento da proliferação das células mutantes em comparação com as não mutantes (186), mas em baixas concentrações celulares, a mutação no gene *ITGB1* gerou uma diminuição da taxa de crescimento das células MDA-MB-23 em comparação com as células WT.

11.2) Motilidade e quimiotaxia

Era esperado que a inativação do *ITGA4* reduzisse a motilidade das células mutantes frente à fibronectina. Entretanto, isso só foi observado na migração em um modelo 2D onde as células *ITGA4-KO* possuíam menor velocidade de locomoção frente ao observado para as células WT. Surpreendentemente, as células mutantes apresentaram uma frequência de transmigração maior que as não mutantes. Esse efeito pode estar relacionado à expressão compensatória da subunidade $\alpha 5$ de integrina ou modificações em processos biológicos que aumentam a capacidade da célula mutante em remodelar o citoesqueleto. É reportado que a migração em modelos 2D ou 3D são processos distintos e que as integrinas parecem ser essencialmente fundamentais para a migração em modelos 2D (173).

Os ensaios de transmigração com estímulo de CXCL12 confirmaram dados da literatura que indicam o efeito sinérgico dos estímulos por fibronectina e quimiocina. Além disso, as células *ITGA4-KO* possuem menor expressão do receptor CXCR4 e respondem com menor eficiência ao estímulo de CXCL12.

11.3) Controle de expressão de moléculas relacionadas à adesão celular

Os níveis de RNA proveniente do *ITGA5* não estão significativamente aumentados nas células *ITGA4-KO*; entretanto, há uma grande elevação na detecção, por citometria de fluxo, da expressão membranar da integrina $\alpha 5$. Suspeitamos que, na ausência da cadeia $\alpha 4$, exista maior disponibilidade da integrina $\beta 1$ com conseqüente estabilização da subunidade $\alpha 5$ na membrana da célula na forma de VLA-5. Para testar essa hipótese, vamos superexpressar a integrina $\beta 1$ em células Jurkat WT e *ITGA4-KO* e observar os níveis das integrinas $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ na membrana das células.

Um conjunto de moléculas de adesão e interação célula-célula são modulados positivamente na linhagem *ITGA4-KO*. Resultados semelhantes já haviam sido reportados com células epiteliais tímicas tratadas com RNAi contra $\alpha 5$ e $\alpha 6$. Assim, nossos achados demonstram que mecanismos de controle de expressão de moléculas de superfície controlados por integrinas também ocorrem em células T.

11.4) Efeitos da inativação de *ITGA4* sobre a ativação e a diferenciação celular

A inativação do gene *ITGA4* promoveu um fenótipo compatível com a ativação via TCR e diferenciação para o subtipo Th1. Enquanto a participação de LFA-1 já havia sido bem descrita para o processo de formação da sinapse imunológica e ativação das células T, pouco

se sabe sobre a relação de VLA-4 com a ativação via TCR. A perda de função de *ITGA4* com subsequente formação de um fenótipo transcricional semelhante à ativação linfocitária, nos leva a postular a existência de um mecanismo de regulação da ativação via TCR pela integrina VLA-4. De fato, as células *ITGA4-KO* possuem também a ativação de alças de regulação negativa da via do TCR como o aumento de expressão do gene *PTPN6*, que codifica a proteína tirosina-fosfatase SHP1, um importante fator regulador da ativação de células T. A via de ativação do TCR depende da ativação de LCK (*Leukocyte C-Terminal Src Kinase*) e a ação regulatória exercida por SHP1 é crucial para o fino ajuste do processo de ativação nas etapas proximais ao receptor (185). Outros reguladores da via também estão mais transcritos nas células *ITGA4-KO* como *PTPN2* e *CSK*. Além disso, os níveis de mobilização de cálcio intracelular são menores para as células Jurkat mutantes. Isso, somado à ativação de alças de regulação negativa, pode ser a causa para a ativação mais branda após o tratamento com anticorpos para mimetizar a ativação via TCR. A mobilização intracelular de cálcio é de extrema importância para o início do processo de ativação, podendo ser um limitante para a transdução do sinal nas células mutantes. Nesse sentido, a confirmação dessas observações em outros modelos – por exemplo, através do silenciamento de *ITGA4* em células T primárias – será uma etapa relevante de futuros experimentos para a verificação desse postulado.

11.5) Sumário dos achados mais significativos em relação aos objetivos iniciais do projeto

- 1) Caracterizar o efeito da inativação gênica de *ITGA4* por CRISPR/Cas9 sobre os processos de ativação, adesão e migração de linfócitos T. Nesse sentido, vimos que as células mutantes:
 - i) apresentaram diminuição na mobilização intracelular de Ca^{2+} , o que pode interferir na sua ativação via TCR;
 - ii) mostraram menor mobilidade sobre fibronectina;
 - iii) mostraram maior capacidade de transmigração dirigida por fibronectina;
 - iv) exibiram menor resposta quimiotática à CXCL12.
- 2) Investigar mecanismos moleculares dependentes de inativação de *ITGA4* por meio de fenotipagem molecular:
 - i) a inativação gênica de *ITGA4* promoveu aumento da quantidade da cadeia $\alpha 5$ de integrina (CD49e) na superfície das células *ITGA4-KO*.
 - ii) a inativação gênica de *ITGA4* impactou o perfil de transcrição gênica das células Jurkat mais do que a mimetização do processo de ativação via TCR feita com anticorpos;

XI) CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- iii) as células mutantes exibiram um perfil de transcrição que indica com um processo de modulação da ativação celular e polarização para células Th1;
- iv) a ativação das células ITGA4-KO com anticorpos (anti-CD3 e anti-CD28) é mais branda que a ativação das células não mutantes.

12) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol* [Internet]. 2019;20(July):783–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-019-0399-9>
2. MILLER JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1961 Sep 30;2(7205):748–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14474038>
3. Liu D, Ellis H. The Mystery of the Thymus Gland. 2016;00(March):1–6.
4. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(7):489–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617694>
5. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Basica* 11ed - Junqueira e Carneiro. 2008. 535 p.
6. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016;12(2):77–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.168>
7. Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*. 2007 Jan;25:649–79.
8. Manley NR, Richie ER, Blackburn CC, Condie BG, Sage J. Structure and function of the thymic microenvironment. *Front Biosci* (Landmark Ed [Internet]. 2011 Jun 1;16(1):2461–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622189>
9. STEINMANN GG, KLAUS B, MÜLLER-HERMELINK H -K. The Involution of the Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty: A Morphometric Study. *Scand J Immunol*. 1985;22(5):563–75.
10. Granadier D, Iovino L, Kinsella S, Dudakov JA. Dynamics of thymus function and T cell receptor repertoire breadth in health and disease. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2021 Feb;43(1):119–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33608819>
11. Hale JS, Boursalian TE, Turk GL, Fink PJ. Thymic output in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(22):8447–52.
12. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8 + cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 Jun 22;234(6):8509–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.27782>
13. Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* [Internet]. 1984;308(5955):145–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6199676>
14. Zheng J, Liu Y, Lau Y-L, Tu W. $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2013 Jan 15;10(1):50–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/cmi201243>
15. Legut M, Cole DK, Sewell AK. The promise of gammadelta T cells and the gammadelta T cell receptor for cancer immunotherapy [Internet]. *Cell Mol Immunol*. 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25864915>
16. Gao GF, Rao Z, Bell JI. Molecular coordination of $\alpha\beta$ T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol*. 2002;23(8):408–13.
17. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018;14(s2):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
18. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: A bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(11):777–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3536>
19. Natarajan K, Jiang J, May NA, Mage MG, Boyd LF, McShan AC, et al. The role of molecular flexibility in antigen presentation and T cell receptor-mediated signaling. *Front Immunol*. 2018;9(JUL):1–13.
20. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu S, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a Cytolytic Molecule, Is Also a Chemoattractant and Proinflammatory Activator. *J Immunol*. 2005;174(9):5243–8.
21. Pawlak M, Ho AW, Kuchroo VK. Cytokines and transcription factors in the differentiation of CD4+ T helper cell subsets and induction of tissue inflammation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2020;67:57–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.09.001>
22. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A* [Internet]. 2014 Jan;85(1):36–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009159>
23. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol*. 2012;13(10):991–9.
24. Hosokawa H, Rothenberg E V. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2018;10(5):1–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716889>

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

25. Hosokawa H, Rothenberg E V. How transcription factors drive choice of the T cell fate. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00426-6>
26. Hayes SM, Li LQ, Love PE. TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity*. 2005;22(5):583–93.
27. Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, Robey EA. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol*. 2005;3(6):1062–9.
28. Vasconcelos-fontes L, Ferreira-reis R, Ramalho J. Development of Thymic Regulatory T Lymphocytes. *Thymus Transcr Cell Biol*. 2019;1(12):255–72.
29. Jurberg AD, Cotta-de-almeida V. Thymus Transcriptome of TGF- β Superfamily. *Thymus Transcr Cell Biol*. 2019;1(11):247–54.
30. Peaudecerf L, Lemos S, Galgano A, Krenn G, Vasseur F, Di Santo JP, et al. Thymocytes may persist and differentiate without any input from bone marrow progenitors. *J Exp Med*. 2012;209(8):1401–8.
31. Martins VC, Ruggiero E, Schlenner SM, Madan V, Schmidt M, Fink PJ, et al. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J Exp Med*. 2012;209(8):1409–17.
32. Foss DL, Donskoy E, Goldschneider I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med*. 2001;193(3):365–74.
33. Krueger A, Willenzon S, Łyszkiwicz M, Kremmer E, Förster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood*. 2010;115(10):1906–12.
34. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-De-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: A combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol*. 2002;23(6):305–13.
35. Griffith A V., Fallahi M, Nakase H, Gosink M, Young B, Petrie HT. Spatial Mapping of Thymic Stromal Microenvironments Reveals Unique Features Influencing T Lymphoid Differentiation. *Immunity* [Internet]. 2009;31(6):999–1009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.024>
36. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: A spatial and temporal perspective. *Immunol Rev*. 2016;271(1):114–26.
37. Krummel MF, Bartumeus F, Gérard A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(3):193–201. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2015.16>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852928>
38. Carman C V., Martinelli R. T Lymphocyte-Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(NOV):603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635815>
39. Stein J V. T Cell Motility as Modulator of Interactions with Dendritic Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(NOV):559. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579132>
40. Dupré L, Houmadi R, Tang C, Rey-Barroso J. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(NOV):586. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635800>
41. Muller WA. Localized signals that regulate transendothelial migration. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2016;38:24–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.006>
42. Ley K, Rivera-Nieves J, Sandborn WJ, Shattil S. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2016 Mar;15(3):173–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26822833>
43. Hynes RO. The emergence of integrins: A personal and historical perspective. *Matrix Biol*. 2004;23(6):333–40.
44. Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 2012;135(4):268–75.
45. Valignat MP, Theodoly O, Gucciardi A, Hogg N, Lellouch AC. T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration. *Biophys J* [Internet]. 2013;104(2):322–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.007>
46. Dominguez GA, Anderson NR, Hammer DA. The direction of migration of T-lymphocytes under flow depends upon which adhesion receptors are engaged. *Integr Biol (United Kingdom)* [Internet]. 2015;7(3):345–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4IB00201F>
47. Müller MA, Brunie L, Bächer AS, Kessler H, Gottschalk KE, Reuning U. Cytoplasmic salt bridge formation in integrin $\alpha\beta 3$ stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects. *Cell Signal* [Internet]. 2014;26(11):2493–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.013>
48. Ginsberg MH. Integrin activation. *BMB Rep*. 2014;47(12):655–9.
49. Humphries JD, Chastney MR, Askari JA, Humphries MJ. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2019;56:14–21. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.004>
50. Fagerholm S, Hilden TJ, Gahmberg CG. Lck tyrosine kinase important for activation of the CD11a/CD18-integrins in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2002;32(6):1670–8.
 51. Goda S, Quale AC, Woods ML, Felthaus A, Shimizu Y. Control of TCR-Mediated Activation of β 1 Integrins by the ZAP-70 Tyrosine Kinase Interdomain B Region and the Linker for Activation of T Cells Adapter Protein. *J Immunol.* 2004;172(9):5379–87.
 52. Wu JN, Koretzky GA. The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol.* 2004;16(6):379–93.
 53. Judd BA, Myung PS, Leng L, Oberfell A, Pear WS, Shattil SJ, et al. Hematopoietic reconstitution of SLP-76 corrects hemostasis and platelet signaling through α Ib β 3 and collagen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12056–61.
 54. Myung PS, Derimanov GS, Jordan MS, Punt JA, Liu QH, Judd BA, et al. Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function. *Immunity.* 2001;15(6):1011–26.
 55. Wang H, Wei B, Bismuth G, Rudd CE. SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(30):12436–41.
 56. Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol.* 2003;4(8):741–8.
 57. Raab M, Wang H, Lu Y, Smith X, Wu Z, Strebhardt K, et al. T Cell Receptor “Inside-Out” Pathway via Signaling Module SKAP1-RapL Regulates T Cell Motility and Interactions in Lymph Nodes. *Immunity* [Internet]. 2010;32(4):541–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.007>
 58. Raab M, Lu Y, Kohler K, Smith X, Strebhardt K, Rudd CE. LFA-1 activates focal adhesion kinases FAK1/PYK2 to generate LAT-GRB2-SKAP1 complexes that terminate T-cell conjugate formation. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(May):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms16001>
 59. Lämmermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Söldner R, Hirsch K, et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature.* 2008;453(7191):51–5.
 60. Ivetic A, Green HLH, Hart SJ. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):1–22.
 61. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* [Internet]. 2014;41(5):694–707. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
 62. Roy NH, Kim SHJ, Buffone A, Blumenthal D, Huang B, Agarwal S, et al. LFA-1 signals to promote actin polymerization and upstream migration in T cells. *J Cell Sci.* 2020;133(17).
 63. Ludwig RJ, Hardt K, Hatting M, Bistrrian R, Diehl S, Radeke HH, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with α 4 β 1 integrin. *Immunology.* 2009;128(2):196–205.
 64. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):467–77.
 65. Wang H, Rudd CE. SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 2008;18(10):486–93.
 66. Basu R, Huse M. Mechanical Communication at the Immunological Synapse. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017;27(4):241–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.10.005>
 67. Yokosuka T, Saito T. The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2010;340(1):81–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960310>
 68. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yáñez-Mó M, Escudero E, Ursa Á, et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(30):11058–63.
 69. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8(5).
 70. Sato T, Tachibana K, Nojima Y, D’Avirro N, Morimoto C. Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *J Immunol* [Internet]. 1995;155(6):2938–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673711>
 71. Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: The roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med.* 1996;184(1):215–28.
 72. Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of α 4 β 1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* [Internet]. 1997;89(7):2461–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V89.7.2461>
 73. Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: Leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: A prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37(1):24–39.

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

74. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* [Internet]. 2018;97(4):742–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>
75. Jain P, Coisne C, Enzmann G, Rottapel R, Engelhardt B. $\alpha 4 \beta 1$ Integrin Mediates the Recruitment of Immature Dendritic Cells across the Blood-Brain Barrier during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2010;184(12):7196–206.
76. Parker Harp CR, Archambault AS, Cheung M, Williams JW, Czepielewski RS, Duncker PC, et al. Neutrophils promote VLA-4-dependent B cell antigen presentation and accumulation within the meninges during neuroinflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(48):24221–30.
77. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* [Internet]. 1992 Mar 5;356(6364):63–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538783>
78. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Mar 2;354(9):899–910. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510744>
79. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GPA, Libonati MA, et al. A Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2003;348(1):15–23.
80. Savino W, Chaves B, Bonomo AC, Cotta-de-Almeida V. Integrin-directed antibody-based immunotherapy: focus on VLA-4. *Immunother Adv* [Internet]. 2021 Feb 9;0(0):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2020.1840620>
81. Glatigny S, Duhon R, Oukka M, Bettelli E. Cutting Edge: Loss of $\alpha 4$ Integrin Expression Differentially Affects the Homing of Th1 and Th17 Cells. *J Immunol*. 2011;187(12):6176–9.
82. Alahmari B, Cooper ML, Vij K, Ritchey J, Ruminski P, Gao F, et al. Selective targeting of $\alpha 4 \beta 1$ integrin attenuates murine graft versus host disease. *Leukemia* [Internet]. 2020;34(11):3100–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0786-0>
83. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 1977;19(5):621–6.
84. Kelleher D, Pandol SJ, Kagnoff MF. Phorbol myristate acetate induces IL-2 secretion by HUT 78 cells by a mechanism independent of protein kinase C translocation. *Immunology* [Internet]. 1988 Nov;65(3):351–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3264806>
85. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* [Internet]. 1984 Jul;133(1):123–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327821>
86. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281–308.
87. Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH. An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. *PLoS One*. 2013;8(3):1–11.
88. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using SurveyorTM nuclease. *Biotechniques* [Internet]. 2004 Apr;36(4):702–7. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/04364PF01>
89. Jaqaman K, Loerke D, Mettlen M, Kuwata H, Grinstein S, Schmid SL, et al. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat Methods*. 2008;5(8):695–702.
90. Sprouffske K, Wagner A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2016;17(1):17–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>
91. Moré JJ. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. In: G.A. W, editor. *Numerical Analysis* [Internet]. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg; 1977. p. 105–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637111>
92. Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, Nusbaum C, Thompson DA, Friedman N, et al. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nat Methods* [Internet]. 2010;7(9):709–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1491>
93. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
94. Dodt M, Roehr JT, Ahmed R, Dieterich C. FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology (Basel)* [Internet]. 2012 Dec 14;1(3):895–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832523>
95. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2019;37(8):907–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

96. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–9.
97. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol*. 2015;33(3):290–5.
98. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*. 2012;7(3):562–78.
99. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013;31(1):46–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2450>
100. Goff LA, Trapnell C, Kelley D. CummeRbund: visualization and exploration of Cufflinks high-throughput sequencing data. R Packag version [Internet]. 2012;2(0):1–45. Available from: <http://www.bioconductor.org/packages/3.../cummeRbund-manual.pdf>
101. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/ Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc*. 2009;4(8):1184–91.
102. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Aug 1;30(15):2114–20. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu170>
103. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
104. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2011 Aug 4;12:323. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816040>
105. James T Robinson, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011;29(1):24–6. Available from: <https://www.broadinstitute.org/igv/node/250>
106. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166–9.
107. Ignatiadis N, Klaus B, Zaugg JB, Huber W. Data-driven hypothesis weighting increases detection power in genome-scale multiple testing. *Nat Methods*. 2016;13(7):577–80.
108. Yoav Benjamini, Yoel Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57(1):289–300.
109. Carlson M. GO.db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology [Internet]. 2019. Available from: <https://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/GO.db.html>
110. Hennig C. Cluster-wise assessment of cluster stability. *Comput Stat Data Anal*. 2007;52(1):258–71.
111. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1;28(1):27–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592173>
112. Day-Richter J, Harris MA, Haendel M, Clark JI, Ireland A, Lomax J, et al. OBO-Edit - An ontology editor for biologists. *Bioinformatics*. 2007;23(16):2198–200.
113. Kehl T, Schneider L, Schmidt F, Stöckel D, Gerstner N, Backes C, et al. RegulatorTrail: A web service for the identification of key transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W146–53.
114. Kehl T, Schneider L, Kattler K, Stöckel D, Wegert J, Gerstner N, et al. REGGAE: A novel approach for the identification of key transcriptional regulators. *Bioinformatics*. 2018;34(20):3503–10.
115. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
116. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* [Internet]. 2003 Nov;13(11):2498–504. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001910481/>
117. Li J, Ma W, Zeng P, Wang J, Geng B, Yang J, et al. LncTar: A tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Brief Bioinform*. 2014;16(5):806–12.
118. Häussinger D, Reinehr R, Schliess F. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol*. 2006;187(1–2):249–55.
119. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. 2009;89(1):193–277.
120. Speicher T, Siegenthaler B, Bogorad RL, Ruppert R, Petzold T, Padrissa-Altes S, et al. Knockdown and knockout of β 1-integrin in hepatocytes impairs liver regeneration through inhibition of growth factor signalling. *Nat Commun*. 2014;5(May):1–13.
121. Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G, Ferre P, et al. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int J Obes* [Internet]. 2003;27(10):1178–86. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ijo.0802399>

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

122. Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2020;1863(4).
123. Poh AR, O'Donoghue RJJ, Ernst M. Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(18):15752–71.
124. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The γ c Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity* [Internet]. 2019;50(4):832–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.028>
125. Renauld JC. Class II cytokine receptors and their ligands: Key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(8):667–76.
126. Walter MR. Structural analysis of IL-10 and type I interferon family members and their complexes with receptor. *Adv Protein Chem.* 2004;68:171–223.
127. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018;18(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
128. Walter MR. The molecular basis of IL-10 function: From receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;380:191–212.
129. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, et al. Interleukin 10 receptor signaling: Master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans [Internet]. 1st ed. Vol. 122, *Advances in Immunology.* Elsevier Inc.; 2014. 177–210 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00005-5>
130. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80-).* 2017;356(6337):513–9.
131. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal.* 2017;15(1):1–13.
132. Owen DL, Farrar MA. STAT5 and CD4 + T Cell Immunity. *F1000Research* [Internet]. 2017;6(0):32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163905>
133. Shi M, Lin TH, Appell KC, Berg LJ. Janus-Kinase-3-Dependent Signals Induce Chromatin Remodeling at the *Ifng* Locus during T Helper 1 Cell Differentiation. *Immunity.* 2008;28(6):763–73.
134. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol* [Internet]. 2012;24(3):209–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.010>
135. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Jan;15(1):49–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722>
136. Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol* [Internet]. 1st ed. 2010;105(C):63–98. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05003-0)
137. Jung SM, Lee JH, Park J, Oh YS, Lee SK, Park JS, et al. Smad6 inhibits non-canonical TGF- β 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nat Commun.* 2013;4.
138. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai JI, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature.* 1997;389(6651):622–6.
139. Bald T, Smyth MJ. TGF- β shuts the door on T cells. *Br J Cancer.* 2018;119(1):1–3.
140. Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF- β Response During T Cell Activation Is Modulated by IL-10. *J Immunol.* 2001;167(2):773–8.
141. Iyengar S, Farnham PJ. KAP1 protein: An enigmatic master regulator of the genome. *J Biol Chem.* 2011;286(30):26267–76.
142. Gehrman U, Burbage M, Zueva E, Goudot C, Esnault C, Ye M, et al. Critical role for TRIM28 and HP1 β / γ in the epigenetic control of T cell metabolic reprogramming and effector differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(51):25839–49.
143. Chikuma S, Suita N, Okazaki IM, Shibayama S, Honjo T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development in vivo. *Nat Immunol.* 2012;13(6):596–603.
144. Jones RG, Thompson CB. Revving the Engine: Signal Transduction Fuels T Cell Activation. *Immunity.* 2007;27(2):173–8.
145. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* [Internet]. 2013;38(4):633–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
146. Harachi M, Masui K, Okamura Y, Tsukui R, Mischel PS, Shibata N. mTOR complexes as a nutrient sensor for driving cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).
147. Mabuchi M, Kataoka H, Miura Y, Kim TS, Kawaguchi M, Ebi M, et al. Tumor suppressor, AT motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in response to TGF- β signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;398(2):321–

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.090>
148. Nojiri S, Joh T, Miura Y, Sakata N, Nomura T, Nakao H, et al. ATBF1 enhances the suppression of STAT3 signaling by interaction with PIAS3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(1):97–103.
 149. Tomomori S, Nakano Y, Ochi H, Onohara Y, Sairaku A, Tokuyama T, et al. Maintenance of low inflammation level by the ZFH3 SNP rs2106261 minor allele contributes to reduced atrial fibrillation recurrence after pulmonary vein isolation. *PLoS One*. 2018;13(9):1–11.
 150. Collins A, Littman DR, Taniuchi I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2):106–15.
 151. Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, Muroi S, Kuroda M, Hatam F, et al. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbfb binding to the Il4 silencer. *J Exp Med*. 2007;204(8):1749–55.
 152. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med*. 2009;206(1):51–9.
 153. Minter LM, Turley DM, Das P, Shin HM, Joshi I, Lawlor RG, et al. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* [Internet]. 2005 Jul;6(7):680–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15991363>
 154. Adler SH, Chiffolleau E, Xu L, Dalton NM, Burg JM, Wells AD, et al. Notch Signaling Augments T Cell Responsiveness by Enhancing CD25 Expression. *J Immunol*. 2003;171(6):2896–903.
 155. De Sousa DM, Duval F, Daudelin JF, Boulet S, Labrecque N. The Notch signaling pathway controls CD8+ T cell differentiation independently of the classical effector HES1. *PLoS One*. 2019;14(4):3–11.
 156. Shibata K, Yamada H, Sato T, Dejima T, Nakamura M, Ikawa T, et al. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Blood*. 2011;118(3):586–93.
 157. Zhang P, He Q, Chen D, Liu W, Wang L, Zhang C, et al. G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via Notch1 inhibition. *Cell Res* [Internet]. 2015;25(10):1093–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2015.109>
 158. Pinto-Mariz F, Rodrigues Carvalho L, Pruber De Queiroz Campos Araujo A, De Mello W, Goncalves Ribeiro M, Cunha MDCSA, et al. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2015;5:45.
 159. Ferreira Golbert DC, Correa-de-Santana E, Ribeiro-Alves M, de Vasconcelos ATR, Savino W. ITGA6 gene silencing by RNA interference modulates the expression of a large number of cell migration-related genes in human thymic epithelial cells. *BMC Genomics*. 2013;14(Suppl 6):1–9.
 160. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Golbert DCF, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(NOV):579. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635793>
 161. Pilat N, Schwarz C, Wekerle T. Modulating T-cell costimulation as new immunosuppressive concept in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17(4):368–75.
 162. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(11):6572–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352273>
 163. Kimata JT, Palker TJ, Ratner L. The mitogenic activity of human T-cell leukemia virus type I is T-cell associated and requires the CD2/LFA-3 activation pathway. *J Virol*. 1993;67(6):3134–41.
 164. Cunningham SA, Rodriguez JM, Pia Arrate M, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with $\alpha 4\beta 1$. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27589–92.
 165. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2514–23.
 166. Lehmann JCU, Jablonski-Westrich D, Haubold U, Gutierrez-Ramos J-C, Springer T, Hamann A. Overlapping and Selective Roles of Endothelial Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in Lymphocyte Trafficking. *J Immunol*. 2003;171(5):2588–93.
 167. Pasello M, Manara MC, Scotlandi K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):55–68.
 168. Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, et al. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: A possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci*. 2003;116(19):3879–91.
 169. Hobbs SJ, Nolz JC. Regulation of T cell trafficking by enzymatic synthesis of O-glycans. *Front Immunol*. 2017;8(MAY).
 170. MacKinnon JR, Knott RM, Forrester J V. Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(9):1137–41.
 171. Linhares-Lacerda L, Ribeiro-Alves M, Nogueira ACMDA, Mendes-da-Cruz DA, Magalhães DA, Dardenne M, et al. RNA interference-mediated knockdown of CD49e ($\alpha 5$ integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC*

XII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Genomics [Internet]. 2010;11 Suppl 5(Suppl 5):S2. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164-11-S5>
172. Kligys KR, Wu Y, Hopkinson SB, Kaur S, Plataniias LC, Jones JCR. A6B4 Integrin, a Master Regulator of Expression of Integrins in Human Keratinocytes. *J Biol Chem*. 2012;287(22):17975–84.
 173. Pinner SE, Sahai E. Integrin-independent movement of immune cells. *F1000 Biol Rep*. 2009;1(September):2–6.
 174. Kim SHJ, Hammer DA. Integrin crosstalk allows CD4+ T lymphocytes to continue migrating in the upstream direction after flow. *Integr Biol (Camb)*. 2019;11(10):384–93.
 175. Cotta-de-Almeida V, Serra Villa-Verde DM, Lepault F, Pléau JM, Dardenne M, Savino W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: A fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol*. 2004;34(6):1578–87.
 176. Vicente-Manzanares M, Cruz-Adalia A, Martín-Cófreces NB, Cabrero JR, Dosil M, Alvarado-Sánchez B, et al. Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood*. 2005;105(8):3026–34.
 177. Cotta-de-Almeida V, Dupré L, Guipouy D, Vasconcelos Z. Signal integration during T lymphocyte activation and function: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Immunol*. 2015;6(FEB):1–11.
 178. Fasolato C, Hoth M, Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem*. 1993;268(28):20737–40.
 179. Unkeless JC, Kaplan G, Plutner H, Cohn Z a. Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(3):1400–4.
 180. Omilusik K, Priatel JJ, Chen X, Wang YT, Xu H, Choi KB, et al. The CaV1.4 Calcium Channel Is a Critical Regulator of T Cell Receptor Signaling and Naive T Cell Homeostasis. *Immunity* [Internet]. 2011;35(3):349–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.011>
 181. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946–53.
 182. Liebmann M, Hucke S, Koch K, Eschborn M, Ghelman J, Chasan AI, et al. Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(34):E8017–26.
 183. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins sp1 and EGR-1. *J Biol Chem*. 1995;270(38):22500–6.
 184. Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Galindo-Campos M, Alcocer-Varela J. Early growth response transcription factors and the modulation of immune response. Implications towards autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2010;9(6):454–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.006>
 185. Ormonde JVS, Nie Y, Madrenas J. TAOK3, a Regulator of LCK-SHP-1 Crosstalk during TCR Signaling. *Crit Rev Immunol*. 2019;39(1):59–81.
 186. Hou S, Isaji T, Hang Q, Im S, Fukuda T, Gu J. Distinct effects of β 1 integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):18430. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep18430>
 187. González A, Hall MN. Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J*. 2017;36(4):397–408.
 188. Parson W, Kirchebner R, Mühlmann R, Renner K, Kofler A, Schmidt S, et al. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *FASEB J* [Internet]. 2005 Mar;19(3):434–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637111>

13) ANEXOS

ANEXO 1

13.1) Genotipagem das células Jurkat

Na **TABELA 3**, é apresentada a genotipagem da linhagem de células Jurkat Clone E6.1 utilizada no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT). Na primeira coluna são exibidos os 22 *loci* testados através do método STR, pelo BCRJ, em maio de 2017 (relatório de ensaio n° STR/006/17, ordem de serviço: OS.S.0306.17). Na segunda coluna é apresentado o resultado obtido com a amostra de Jurkat do LPT. Na terceira, é mostrado o padrão de genotipagem por STR da linhagem de células Jurkat E6.1 (cat# 88042803) do *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC). Na quarta coluna, é exposto o padrão de genotipagem por STR para a linhagem Jurkat Clone E6.1 (TIB-152) do *American Type Culture Collection* (ATCC). Na quinta coluna, está representado o padrão de genotipagem por STR encontrado Parson W. *et al* para sua linhagem de células Jurkat selvagem ou inicial como mencionado pelos autores (188). A similaridade do resultado de genotipagem da linhagem do LPT, com os padrões de referência, demonstra a autenticidade das células Jurkat utilizadas no presente projeto.

TABELA 3) Resultado da genotipagem da linhagem Jurkat Clone E6.1 do LPT

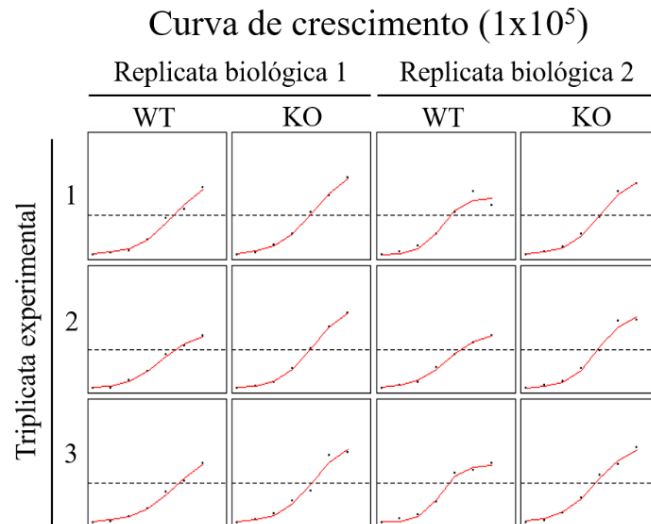
| <i>locus</i> | Amostra LPT | Amostra ECACC | Amostra ATCC | Amostra Parson W. <i>et al</i> , 2005 |
|---------------|-------------|---------------|--------------|---------------------------------------|
| 1) Amelogenin | X;Y | X;Y | X;Y | X |
| 2) CSF1PO | 11;12 | 11;12 | 11;12 | 11;12 |
| 3) D10S1237 | 19;23 | | | |
| 4) D13S317 | 8;12 | 8;12 | 8;12 | 8;11 |
| 5) D16S539 | 11 | 11 | 11 | 10;11 |
| 6) D18S51 | 13;21 | | | 13;22 |
| 7) D19S433 | 14;15.2 | | | |
| 8) D1S1656 | 16;16.3 | | | |
| 9) D21S11 | 31.2;33.2 | | | 31.2;33.2 |
| 10) D22S1045 | 14;17 | | | |
| 11) D2S1338 | 19;23 | | | |
| 12) D3S1358 | 15;17 | | | 15;17 |
| 13) D5S818 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| 14) D7S820 | 8;12 | 8;10 | 8;12 | 8;9.3 |
| 15) D8S1179 | 13;14 | | | 12;14 |
| 16) F13B | 8;1 | | | |
| 17) FGA | 20;21 | | | 19;22 |
| 18) Penta D | 11;13;15 | | | 11 |
| 19) Penta E | 10;12 | | | 10;12 |
| 20) TH01 | 6;9.3 | 6;9.3 | 6;9.3 | 6;9.3 |
| 21) TPOX | 8;10 | 8;10 | 8;10 | 8;10 |
| 22) VWA | 18 | 18 | 18 | 17;18 |

ANEXO 2

13.2) Ajuste da curva de crescimento com modelo matemático

Na **Figura 56**, são exibidos os gráficos das curvas de crescimento para os cultivos de células Jurkat WT e *ITGA4*-KO após o ajuste com o modelo de regressão logística exposto na **Equação 1**.

(A)



(B)

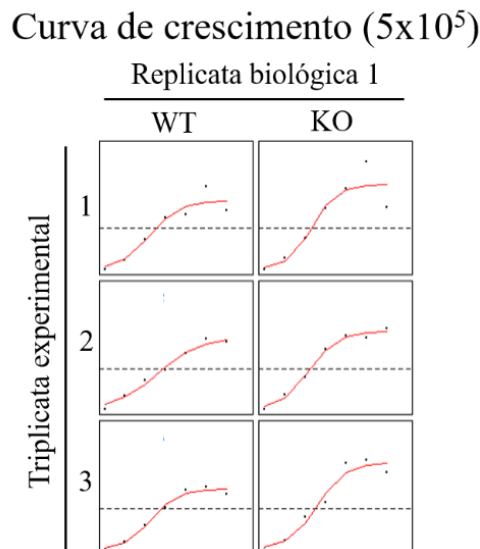


Figura 56) Curvas de crescimento ajustadas

(A) Experimentos iniciados com cultivos a 1×10^5 . (B) Experimentos iniciados com cultivos a 5×10^5 células/mL. Cada ponto representa a concentração celular estimada após ajuste com o modelo. Os dados de entrada foram contagens do número de células/mL em intervalos de 24 h. A linha tracejada representa a concentração de 1×10^6 células/mL.

ANEXO 3

13.3) Análise de qualidade do RNA-seq com o programa FastQC

Abaixo são apresentados dois relatórios de qualidade de sequência obtidos com o programa FastQC após o tratamento com o programa Trimmomatic (**Figura 57** e **Figura 58**). Os gráficos foram obtidos a partir de leituras da amostra WT#0 e são representativos para as demais amostras.

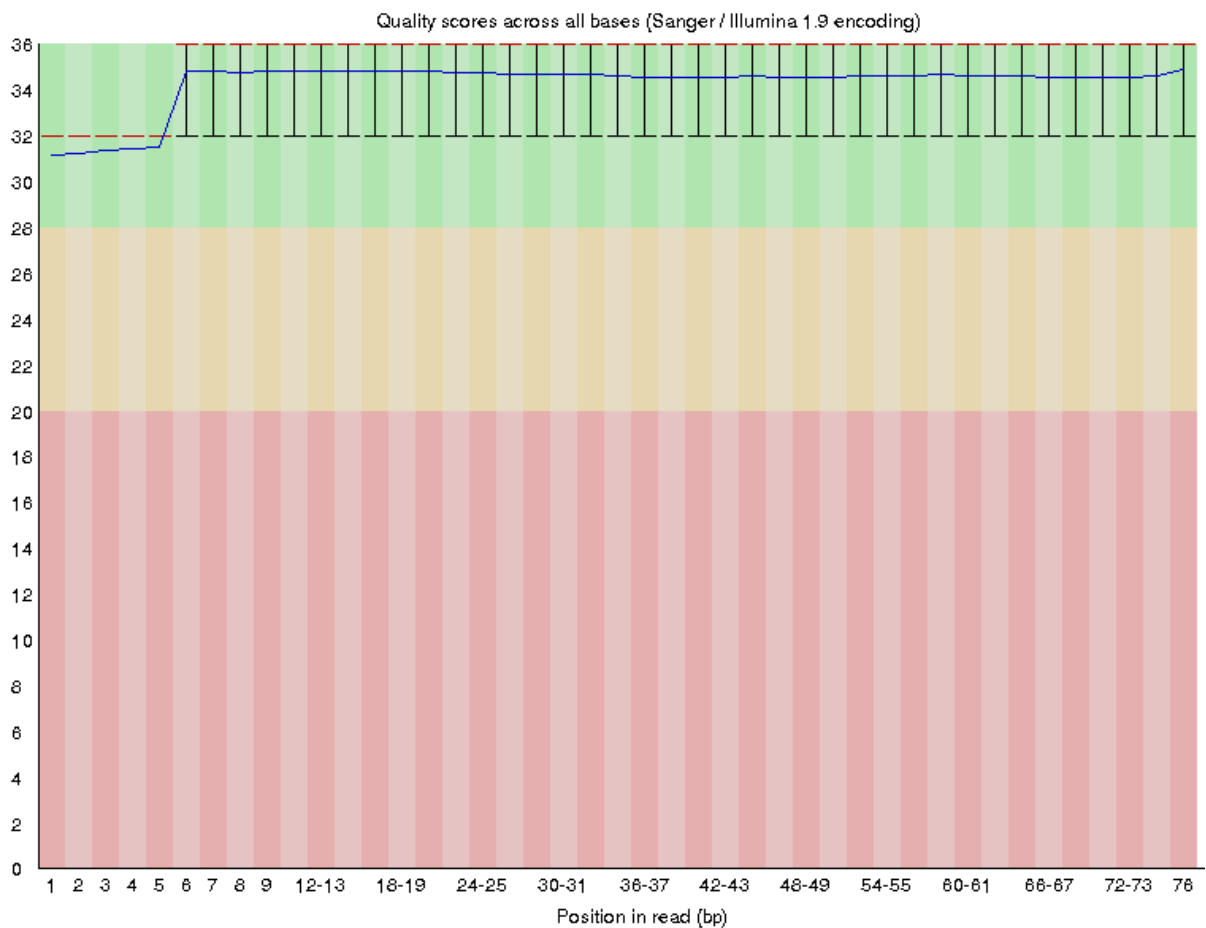


Figura 57) Gráfico da qualidade média por base

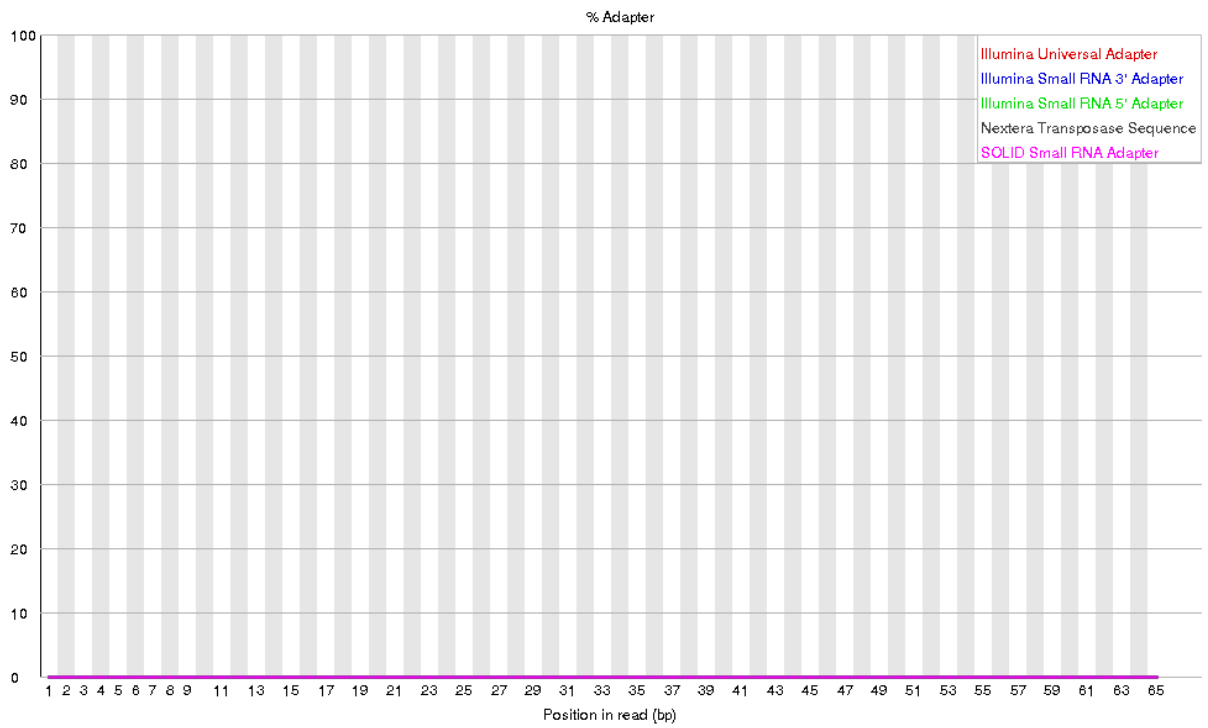


Figura 58) Gráfico do percentual de contaminação de adaptador por base

ANEXO 4

13.4) Biotipos de RNA não codificantes de proteína

Os 449 genes diferencialmente expressos, que são codificantes de RNA não traduzidos em proteína, foram divididos de acordo com a classificação do biotipo do RNA codificado descrita na anotação do genoma fornecida pelo Ensembl (**Figura 59**). A maior parte destes genes são codificantes para RNA longos não codificantes (lncRNA) e os demais incluem RNA ribossomal mitocondrial (mtrRNA), pequenos RNA nucleolares (snoRNA), pequenos RNA específicos de corpos de cajal (scaRNA), pequenos RNA nucleares (snRNA).

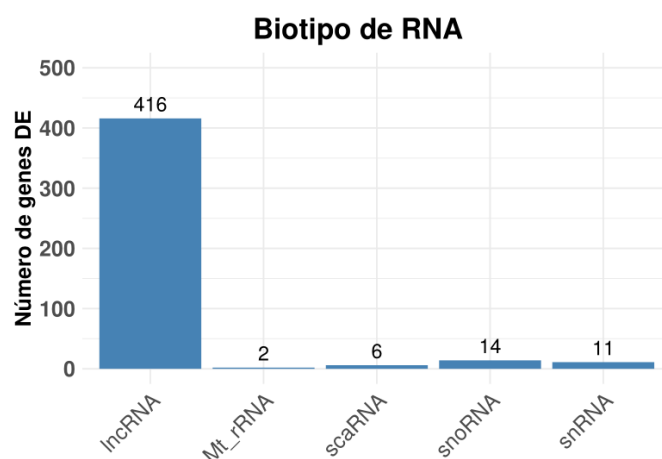


Figura 59) Gráfico de barra mostrando número de genes DE codificantes para RNA que não são traduzidos em proteína

Foram considerados todos os genes DE em qualquer uma das 6 comparações possíveis (**Figura 11**).

ANEXO 5**13.5) Via de sinalização das TGFβ**

SMAD6, um importante regulador negativo das vias canônica e não canônica de sinalização por TGF-β (137,138), está 2 vezes mais transcrito, enquanto que *SMAD1* possui uma modulação negativa de mais de 2 vezes nas células mutantes (**Figura 60** e **Figura 61**). A via de TGF-β tem uma importante ação imunossupressora e, em tumores, pode gerar um processo chamado de exclusão de células T, capaz reduzir a eficiência do sistema imune dentro do ambiente tumoral (139). De uma forma geral, os sinais intermediados por TGF-β em linfócitos são imunossupressores e a redução de atividade de genes associados a esta via pode indicar uma perda de regulação com consequente transição para um estado de ativação celular. TGF-β1 inibe a proliferação e secreção de citocinas em células T CD4⁺ em repouso, mas tem menor efeito sobre células T ativadas, devido à redução de expressão do seu receptor do tipo II. Por outro lado, já foi reportado que IL-10, outra citocina imunossupressora com modulação positiva nas células *ITGA4-KO* (**Figura 28**), pode recuperar a responsividade de célula T ativada por aumentar os níveis de expressão de *TGFBR2* (140). Nesse contexto, uma possível desregulação na via de sinalização de TGF-β, após a inativação de *ITGA4*, poderia modular o estado de ativação das células Jurkat, com o desligamento dessa via podendo facilitar o aparecimento de um fenótipo compatível com o estado ativado.

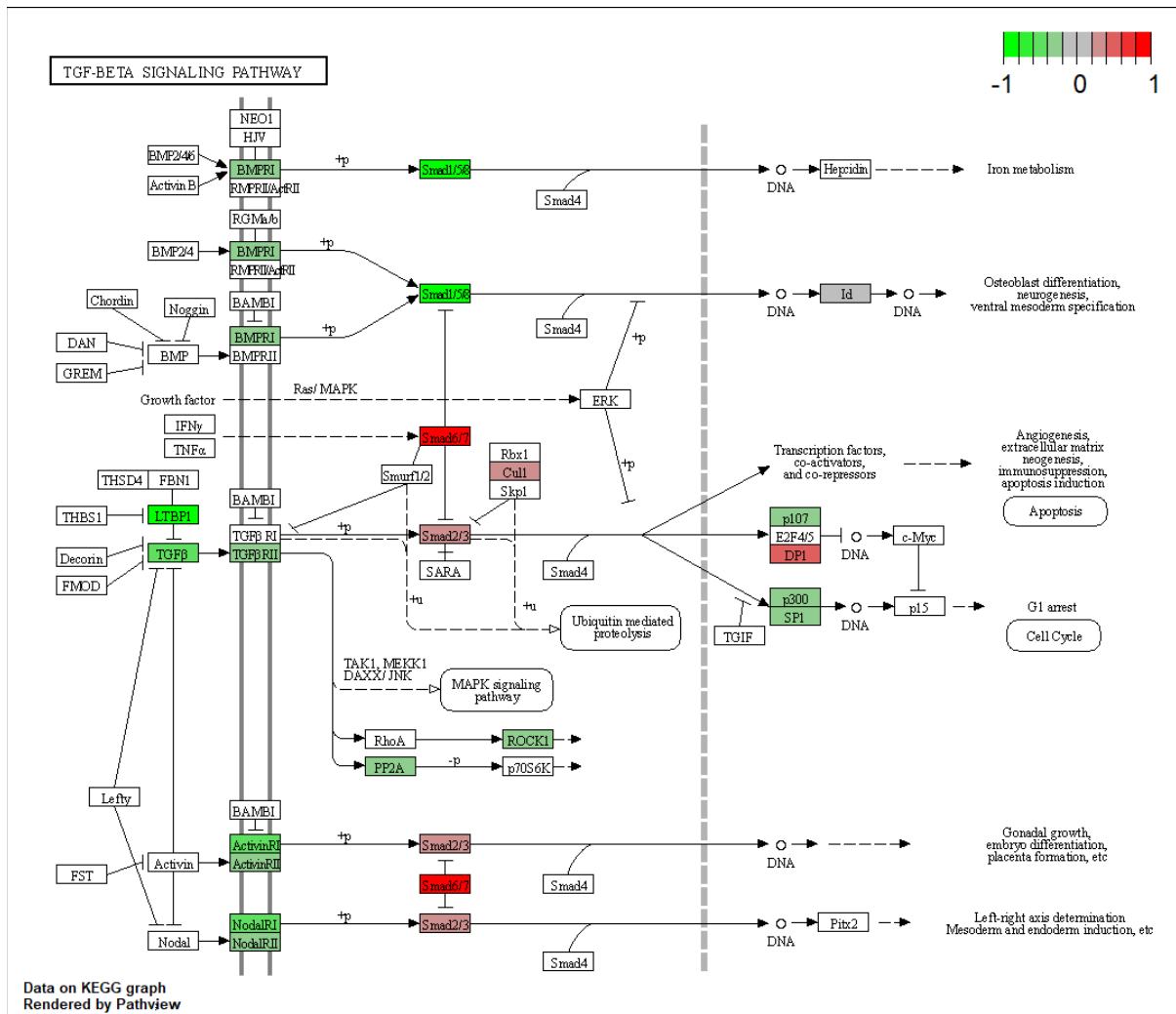


Figura 60) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo “TGF-beta signaling pathway” (hsa04350)

Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9.

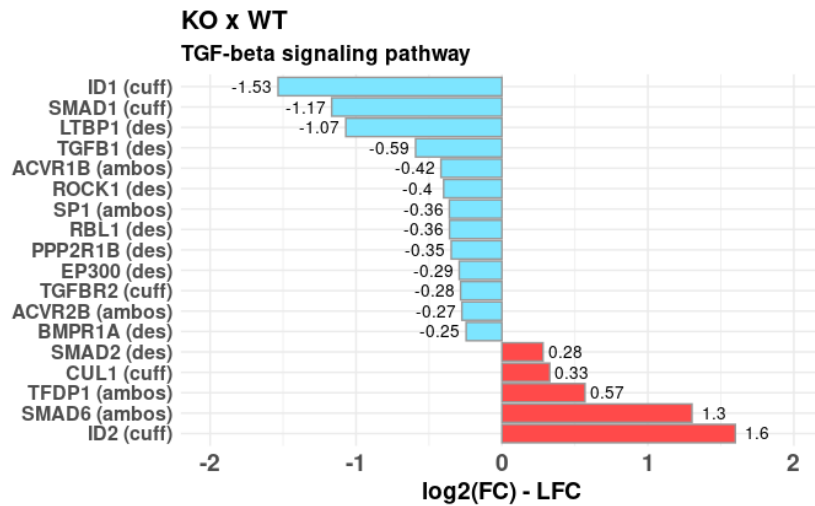


Figura 61) Gráfico de barra mostrando os valores de LFC para genes da via de TGF- β diferencialmente expressos na comparação KO vs WT

As siglas “des”, “cuff” e “ambos” indicam os genes cuja expressão diferencial foi detectada pelo protocolo do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos.

ANEXO 6

13.6) Rede de reguladores transcripcionais

Para visualizar a atividade dos genes codificantes para proteínas pertencentes a rede de interações proteína-proteína construída com reguladores transcripcionais, os nódulos dessa rede foram coloridos com os valores de TPM encontrados para as células *ITGA4-KO* (**Figura 62**).

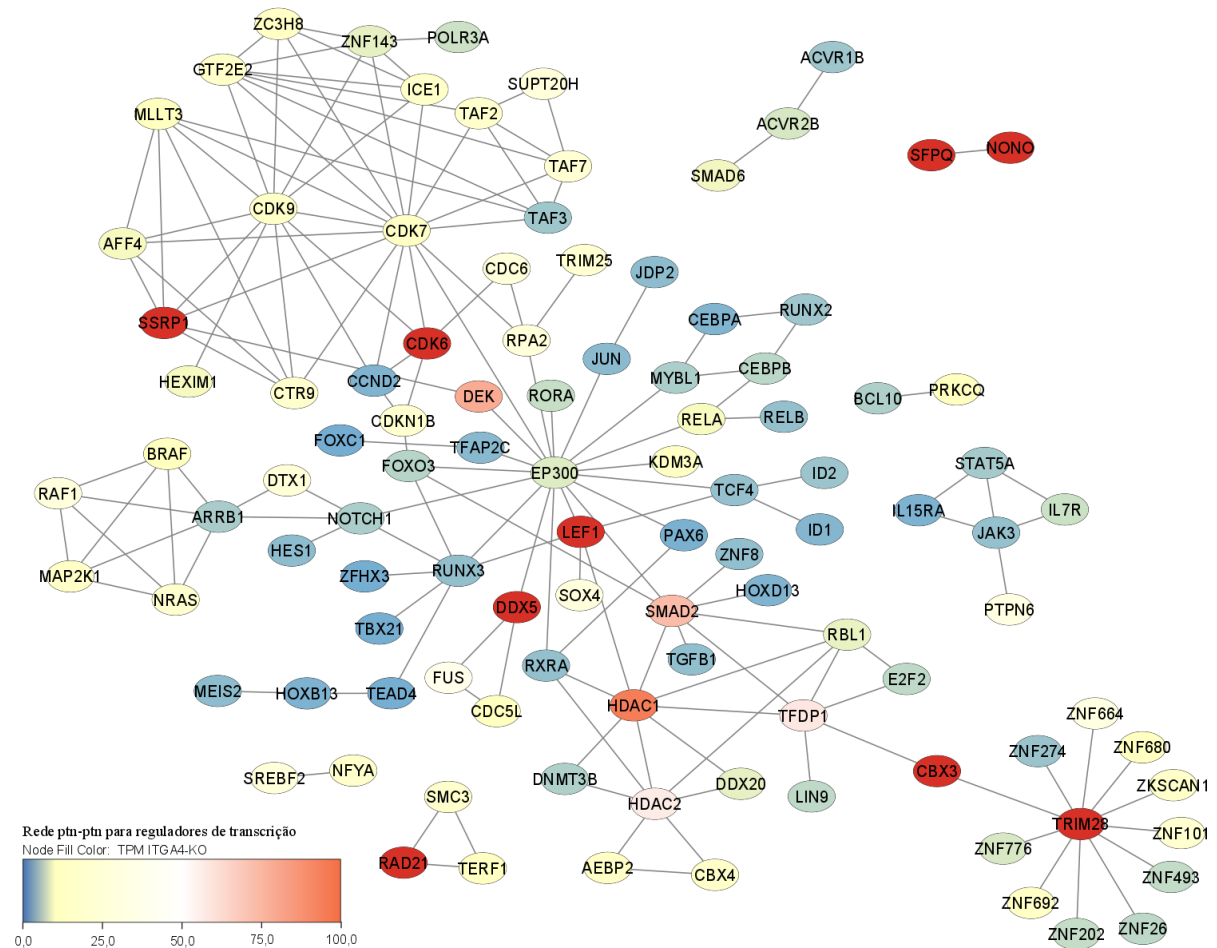
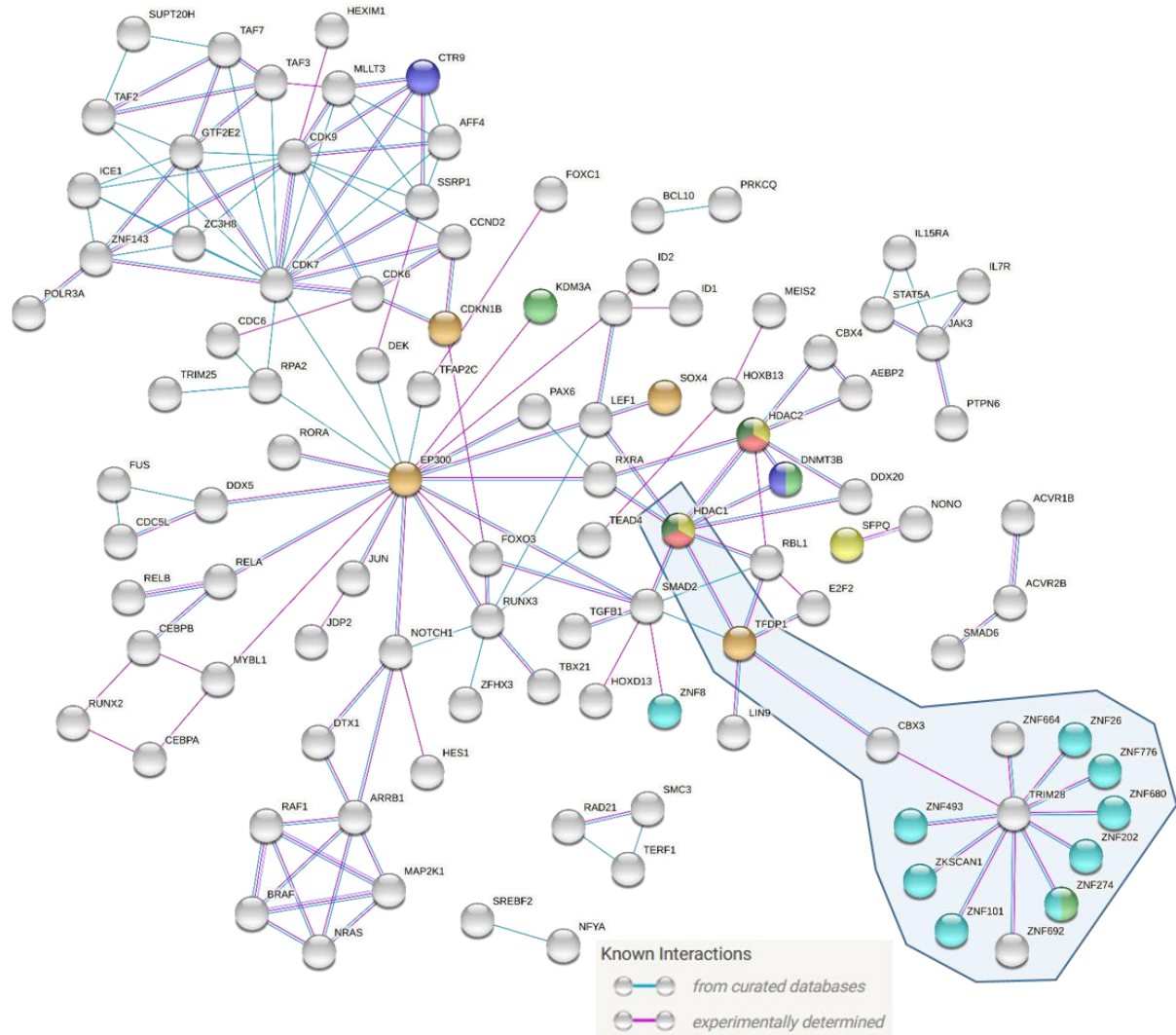


Figura 62) Rede de interação proteína-proteína para reguladores de transcrição diferencialmente expressos na comparação KO vs WT

Os nós foram coloridos de acordo com os valores de TPM para as células *ITGA4-KO*. Tonalidades esverdeadas ou azuladas representam valores de TPM inferiores a 10.

Para identificar genes possivelmente envolvidos na atividade de TRIM28 nas células mutantes, a rede de interações proteína-proteína construída com reguladores transcricionais foi colorida de acordo com a associação da proteína representada a termos enriquecidos em uma análise de enriquecimento de função feita na plataforma do STRING (Figura 63). HDAC1 está associado a termos que indicam a função de deacetilação de histona.



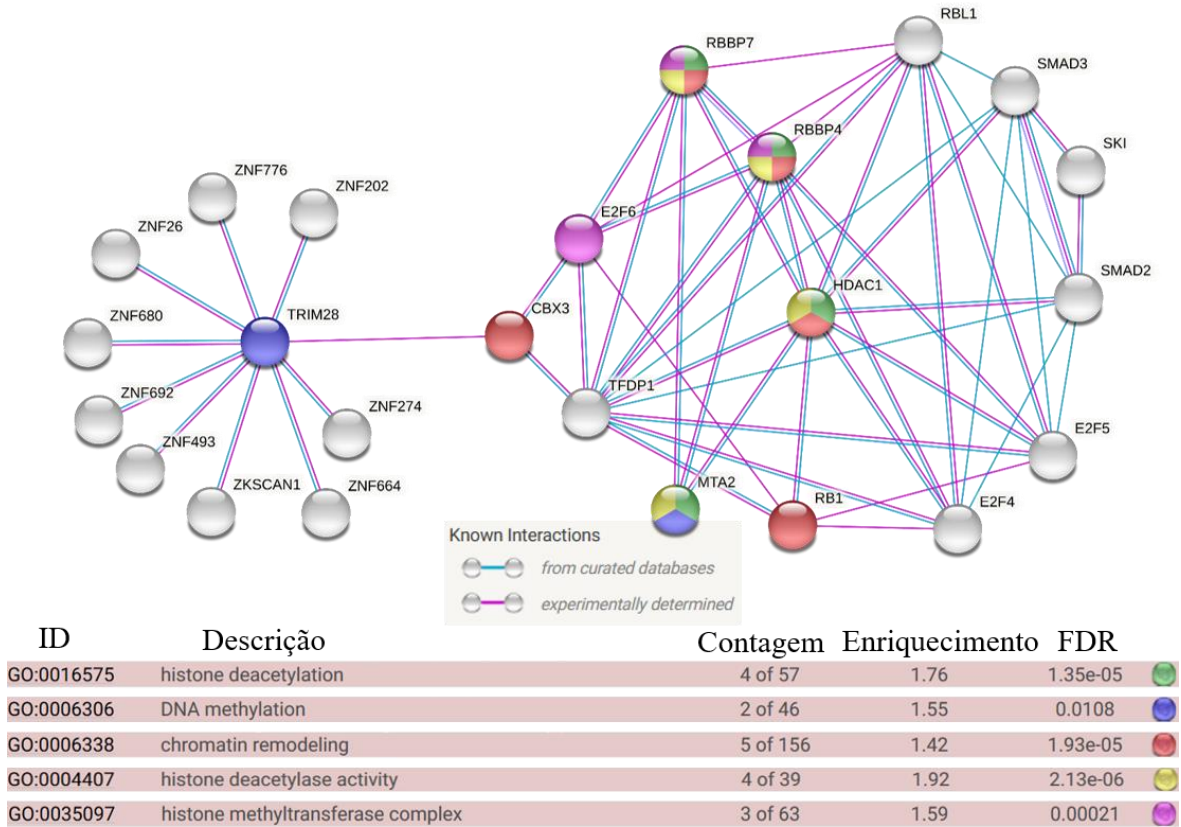
| ID | Descrição | Contagem | Enriquecimento | FDR | |
|------------|--|-----------|----------------|---------|--|
| GO:0070932 | histone H3 deacetylation | 4 of 20 | 1.29 | 0.00074 | |
| GO:0006977 | DNA damage response, signal transduction by p53 class m... | 5 of 59 | 0.92 | 0.0027 | |
| GO:0051570 | regulation of histone H3-K9 methylation | 3 of 21 | 1.15 | 0.0082 | |
| GO:0070933 | histone H4 deacetylation | 2 of 9 | 1.34 | 0.0199 | |
| GO:0051571 | positive regulation of histone H3-K4 methylation | 2 of 16 | 1.09 | 0.0440 | |
| PF01352 | KRAB box | 10 of 382 | 0.41 | 0.0430 | |
| PF00850 | Histone deacetylase domain | 2 of 11 | 1.25 | 0.0455 | |

Figura 63) Redes de interação proteína-proteína entre reguladores de transcrição

Nós que correspondem a proteínas associadas a funções de TRIM28 estão destacados pelo fundo colorido em azul. A cor das conexões corresponde a fonte da informação. Os dados referentes ao enriquecimento dos termos selecionados estão tabelados. A posição dos nós foi ajustada manualmente para que nenhuma conexão passasse exatamente abaixo de um nó. Nós sem conexões não estão exibidos.

O nome das 14 proteínas possivelmente associadas a função de TRIM28 (ver nós destacados em fundo azul na **Figura 63**) foram utilizados para a coleta de mais proteínas que poderiam se associar a este complexo. Após duas rodadas de amplificação de rede com a plataforma STRING, foi construída uma rede com 24 nós mostradas na **Figura 64**.

(A)



(B)

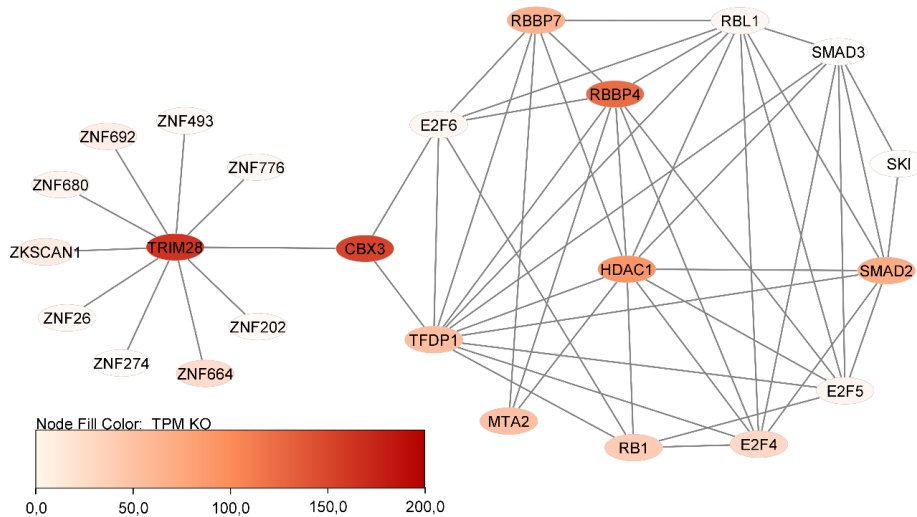


Figura 64) Rede de interação proteína-proteína montada por crescimento da sub-rede contendo TRIM28

(A) Os nós foram coloridos de acordo com a associação das proteínas representadas com termos enriquecidos e relacionados a função de TRIM28. (B) Os nós foram coloridos de acordo com os valores de TPM para o gene codificante da proteína representada.

ANEXO 7

13.7) Variações metabólicas nas células ITGA4-KO

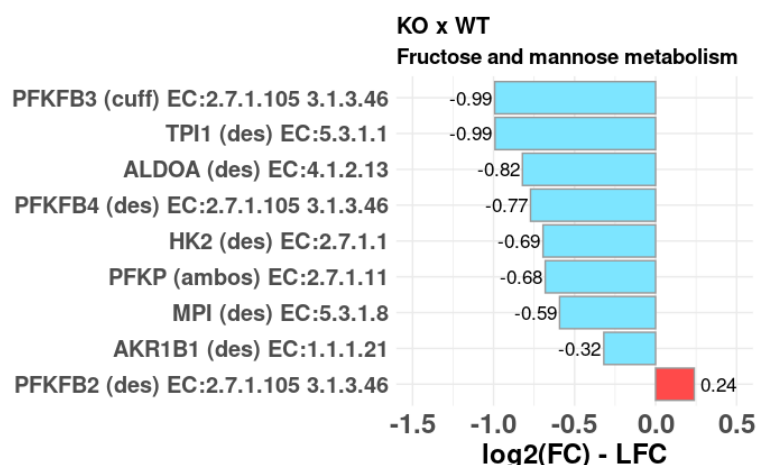
Nas células ITGA4-KO, diversos genes associados ao metabolismo energético tiveram sua expressão aumentada ou diminuída ao mesmo tempo que genes codificantes para proteínas do complexo associado à TRIM28. Este complexo atua como regulador epigenético importante para o processo de conversão metabólica durante a ativação de células T. Durante este processo as células ativadas passam a gerar energia por glicólise e respiração oxidativa ao mesmo tempo. No entanto, as células ITGA4-KO apresentaram um perfil de expressão que sugere a redução da glicólise e aumento da degradação de ácidos graxos.

Se observarmos, na comparação KO vs WT, a variação de expressão de genes associados a vias do KEGG relacionadas a degradação de açúcares, como a via do metabolismo de frutose e manose (hsa00051) e do metabolismo da glicose (hsa00010), observamos uma redução de atividade que sugere uma opção das células mutantes por fontes de energia não glicídicas (**Figura 65**). Para obtermos uma melhor observação das modificações do metabolismo energético das células mutantes a partir de açúcares, a via central de metabolismo do carbono em câncer (hsa05230) foi empregada para visualizarmos os genes diferencialmente expressos na comparação WT vs KO (**Figura 66**). *SLC2A1* (GLUT1) possui uma diminuição de transcrição superior a duas vezes o que poderia ocasionar uma redução do importe de glicose nas células mutantes. O gene codificante da hexoquinase 2 (*HK2*), enzima que catalisa a conversão de glicose em glicose-6-fosfato, também está menos expresso nas células ITGA4-KO, o que é outro indicativo da redução da glicólise como fonte principal de energia nesta linhagem. *AKT3*, que é capaz de controlar o metabolismo energético através da ativação da via de mTOR (146), está suprimido e reguladores do metabolismo energético a jusantes de mTOR, como *HK2* e *PDK1*, também estão modulados negativamente nas células mutantes. *PDK1* codifica para a enzima piruvato desidrogenase complexo quinase (PDC quinase ou PDK), que é capaz de suprimir por fosforilação a atividade do complexo piruvato desidrogenase e inibir a fosforilação oxidativa em uma importante entrada de substrato para ciclo do citrato. A redução de transcrição do inibidor codificado por *PDK1*, associada ao aumento de atividade de genes codificantes para importantes enzimas da produção de energia por fosforilação oxidativa, como SDHA (EC 1.3.5.1) e as subunidades 1, 2 e 3 da NADH-ubiquinona oxidoreductase (MT-ND) (EC 7.1.1.2), indicam que as células ITGA4-KO possuem o ciclo do citrato em um estado mais ativo que as células WT.

As células T ativadas e muitos tipos de células cancerosas optam pela produção de energia através da glicólise por um mecanismo de ajuste metabólico conhecido como efeito de Warburg (145). As células Jurkat mutantes apresentaram um comportamento diferente do esperado para uma célula linfocitária ativada, ou para uma célula tumoral, e reduziram a transcrição de importantes genes para o metabolismo energético suportado pela glicólise. Por outro lado, há um aumento de atividade de genes codificantes para enzimas envolvidas na degradação de ácidos graxos, como ACSL6 (EC 6.1.2.3), CPT1A, CPT2, HADH (EC 1.1.35) e ACADS (EC 1.3.8.1) (**Figura 68**), sugerindo que a β -oxidação é uma importante fonte de carbono para fosforilação oxidativa nessas células.

As divergências metabólicas entre o observado para as células mutantes e o esperado para a ativação de células T efectoras pode ser devido a diferenças nos fatores ZNF corregulados com TRIM28 e problemas de sinalização da célula KO na via de AKT. Contudo, não podemos descartar outras características de fundo das células Jurkat que constituem uma limitação desse modelo de estudo.

(A)



(B)

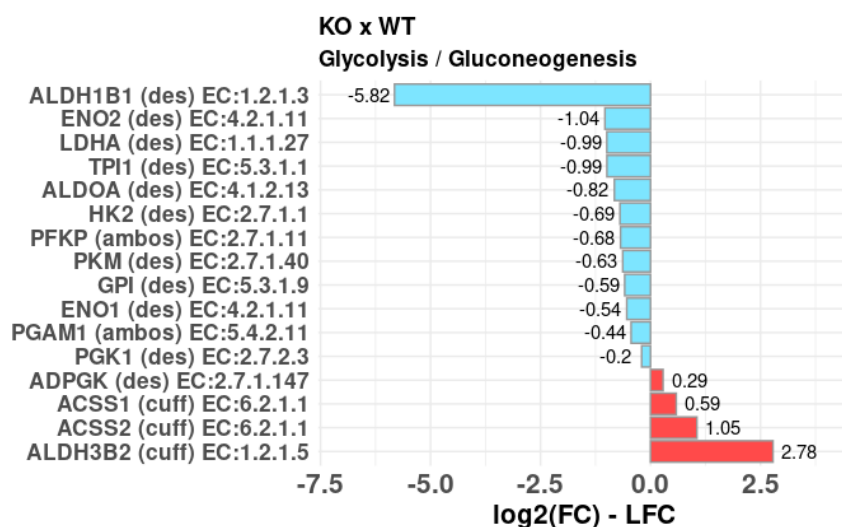
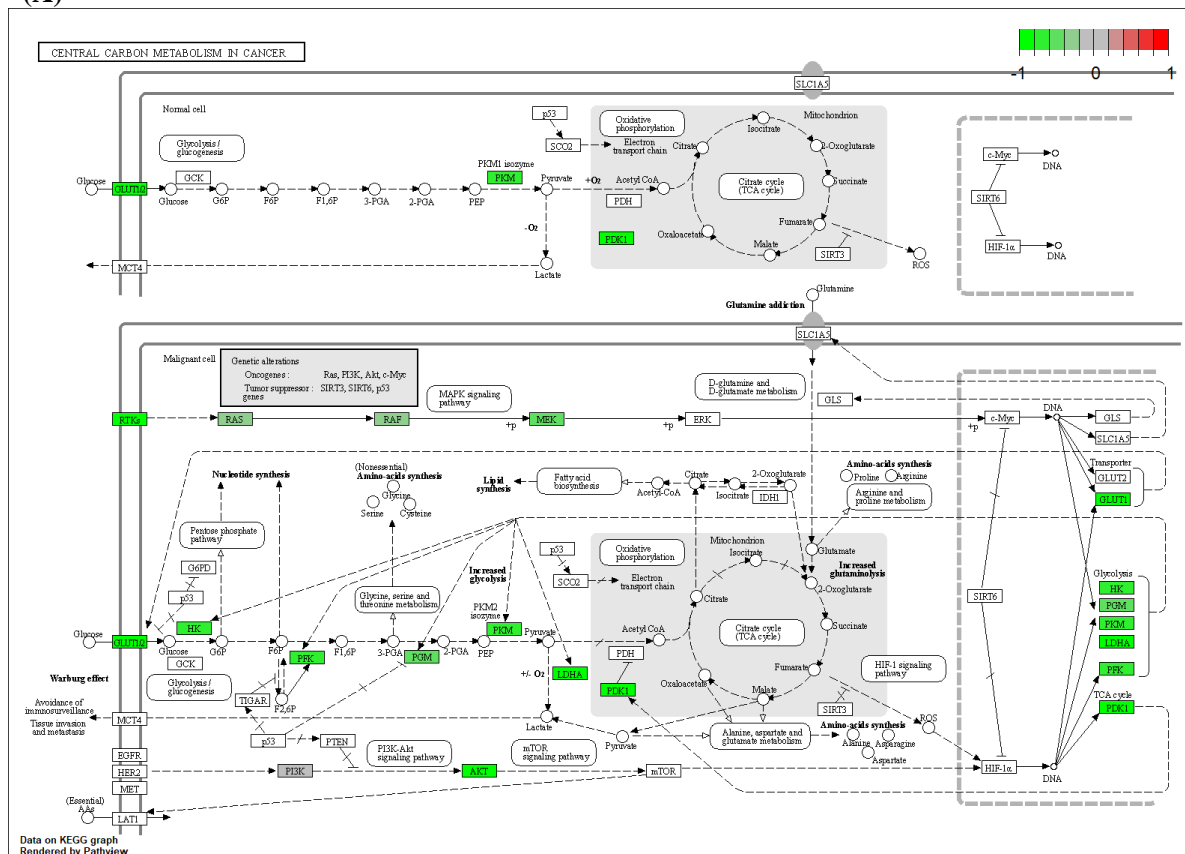


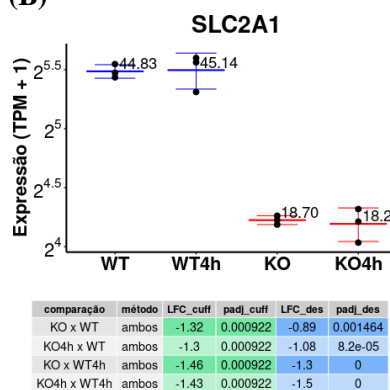
Figura 65) Metabolismo energético de açúcares

Gráfico de barra mostrando o LFC, obtido na comparação KO vs WT, para os genes pertencentes as vias de: (A) metabolismo de frutose e manose (hsa00051) (B) glicólise (hsa00010). Os termos “des”, “cuff” e “ambos” indicam que a expressão diferencial foi detectada pelo protocolo do Cufflinks, DESeq2 ou ambos, respectivamente. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. O número EC (*Enzyme Commission Number*) de cada enzima é indicado ao lado do método que validou a expressão diferencial.

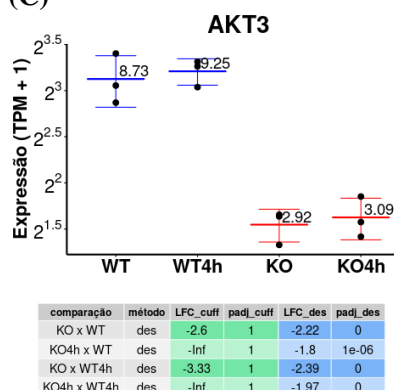
(A)



(B)



(C)



(D)

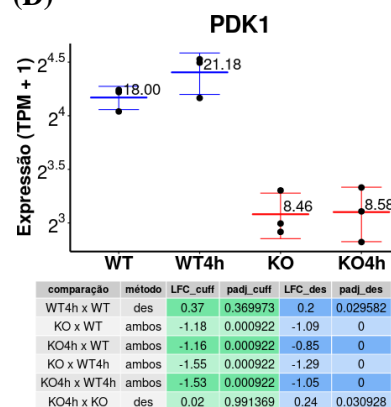


Figura 66) Modulação negativa da glicólise com possível ativação do ciclo do citrato

(A) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo "central carbon metabolism in cancer" (hsa05230). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9. Níveis de expressão dos genes codificantes para o (B) receptor de glicose *SLC2A1* (*GLUT1*), (C) *AKT3* e (D) a quinase supressora do ciclo do citrato *PDK1*. Os gráficos de B a D mostram os níveis de expressão em TPM + 1 e na escala log na base 2. As tabelas abaixo destes gráficos expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna "métodos" indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo "cuff" para indicar o Cufflinks, "des" para se referir ao DESeq2 e "ambos" para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

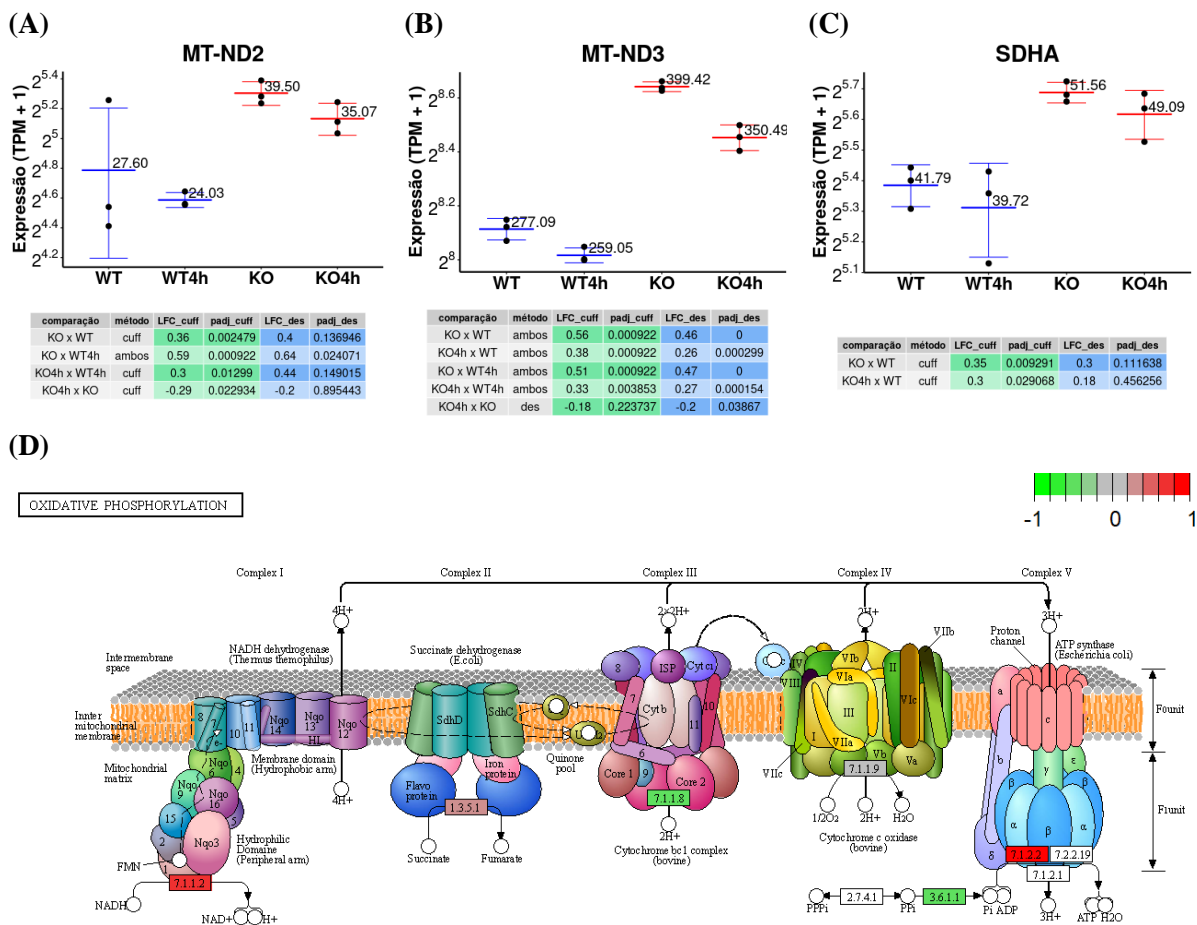
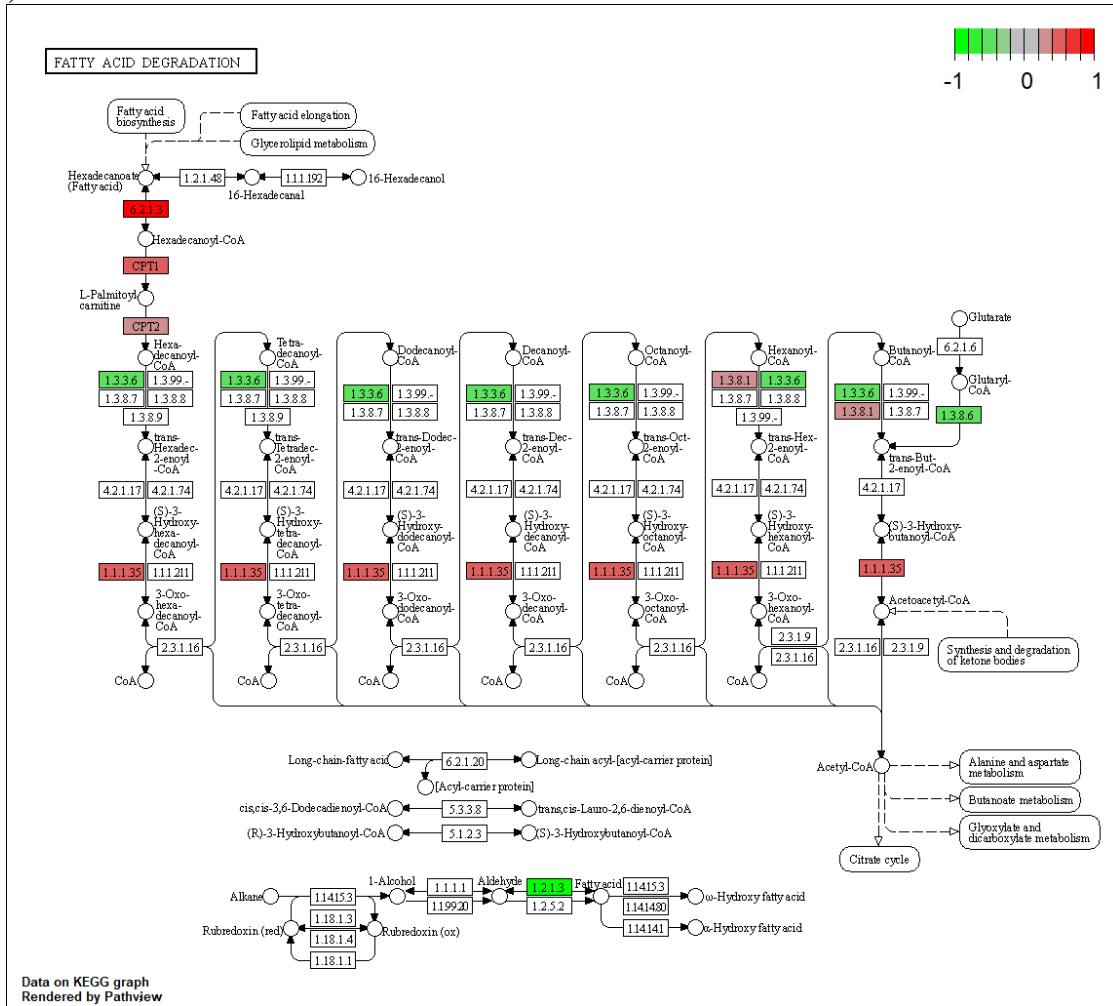


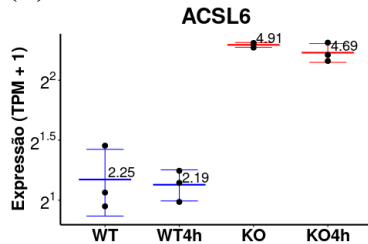
Figura 67) Alteração do metabolismo energético com favorecimento do ciclo do citrato nas células mutantes

Níveis de expressão medidos em TPM dos de importantes enzimas para o ciclo do citrato: **(A)** MT-ND2 (aumento parecido foi identificado para *MT-ND1*), **(B)** MT-ND3 e **(C)** SDHA. Os gráficos de A a C mostram os níveis de expressão em TPM + 1 e na escala log na base 2. As tabelas abaixo destes gráficos expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos. **(D)** Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo “oxidative phosphorylation” hsa00190). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. Os valores de LFC utilizados neste gráfico para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. Foi possível detectar a modulação positiva de genes associados as funções enzimáticas com classificação EC1.3.5.1 (*SDHA*) e EC7.1.2.2 (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*) para a comparação WT vs KO. Retângulos que representam enzimas são identificados com o respectivo número EC (*Enzyme Commission Number*). A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9.

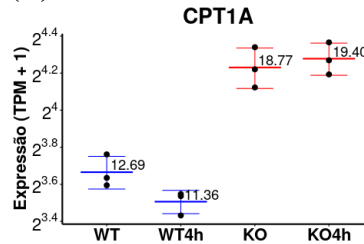
(A)



(B)



(C)



(D)

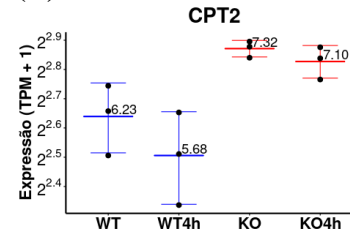


Figura 68) Alterações metabólicas das células mutantes condizem com uma alimentação baseada em β -oxidação

(A) Diagrama adaptado do banco de dados do KEGG correspondente a genes associados ao termo "Fatty acid degradation" (hsa00071). Os retângulos foram coloridos de acordo com o valor de LFC para o respectivo gene DE na comparação KO vs WT. Os retângulos brancos representam genes que não foram detectados como DE na comparação KO vs WT. Os valores de LFC utilizados nestes gráficos para os genes classificados como DE por ambos os métodos (Cufflinks e DESeq2) correspondem a média aritmética dos valores de LFC obtidos por cada um desses protocolos. Retângulos que representam enzimas são identificados com o respectivo número EC (*Enzyme Commission Number*). A descrição da notação utilizada no mapa do KEGG é exposta na **Figura 70** no ANEXO 9. **(B) (C) (D)** Nível de expressão das enzimas que catalisam o início da degradação dos ácidos graxos e importe das

cadeias carbônicas para a mitocôndria. Os gráficos de **B** a **D** mostram os níveis de expressão em TPM + 1 e na escala log na base 2. As tabelas abaixo destes gráficos expõem os resultados dos testes estatísticos. A coluna “métodos” indica o protocolo que validou a expressão diferencial e é utilizado o termo “cuff” para indicar o Cufflinks, “des” para se referir ao DESeq2 e “ambos” para fazer menção aos dois métodos. O LFC e p-valor ajustado (padj) são exibidos para cada um dos métodos.

ANEXO 8

13.8) genes DE entre as amostras WT4h vs WT ou KO4h vs KO

Na **Figura 69** é exposto um mapa de calor feito a partir dos níveis de expressão medidos em TPM para os genes DE entre as amostras WT4h vs WT e/ou KO4h vs KO (conjunto união).

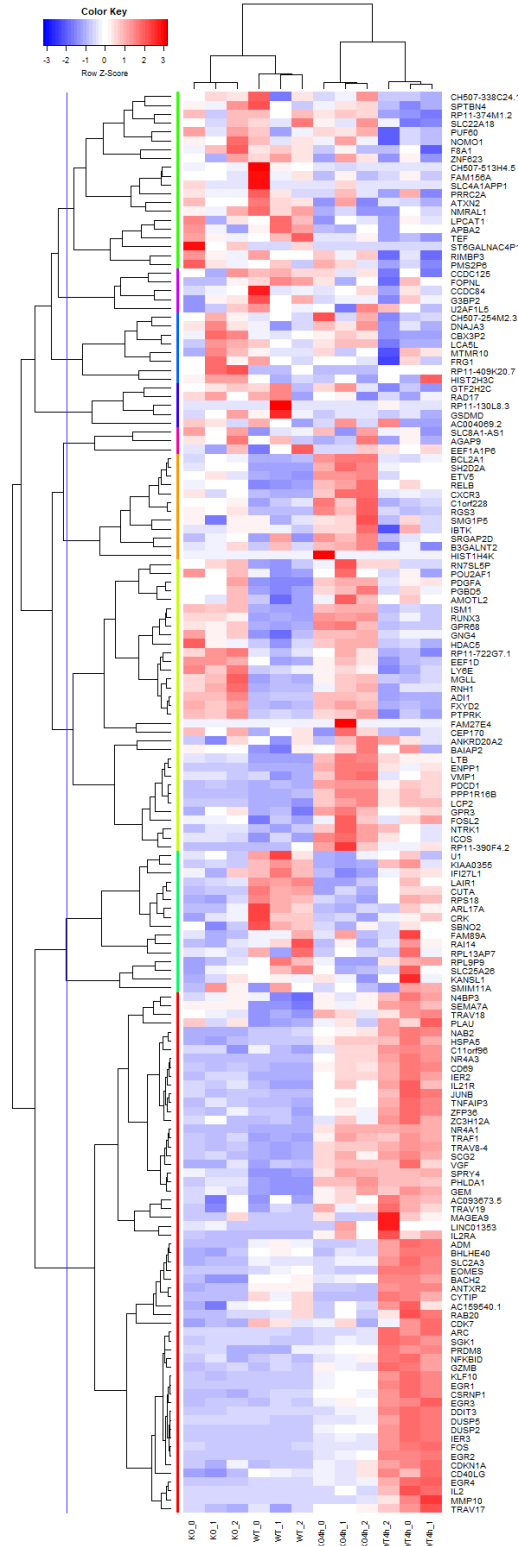


Figura 69) Mapa de calor para genes DE entre as amostras WT4h vs WT ou KO4h vs KO. A linha azul indica o ponto limite usado para separar os clusters anotados por cores.

ANEXO 9

13.9) Legenda de símbolos utilizados nos mapas do KEGG

Na figura 70 é apresentado um esquema com os códigos de símbolos utilizados nos mapas de vias feitos com os modelos oferecidos pela Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG).

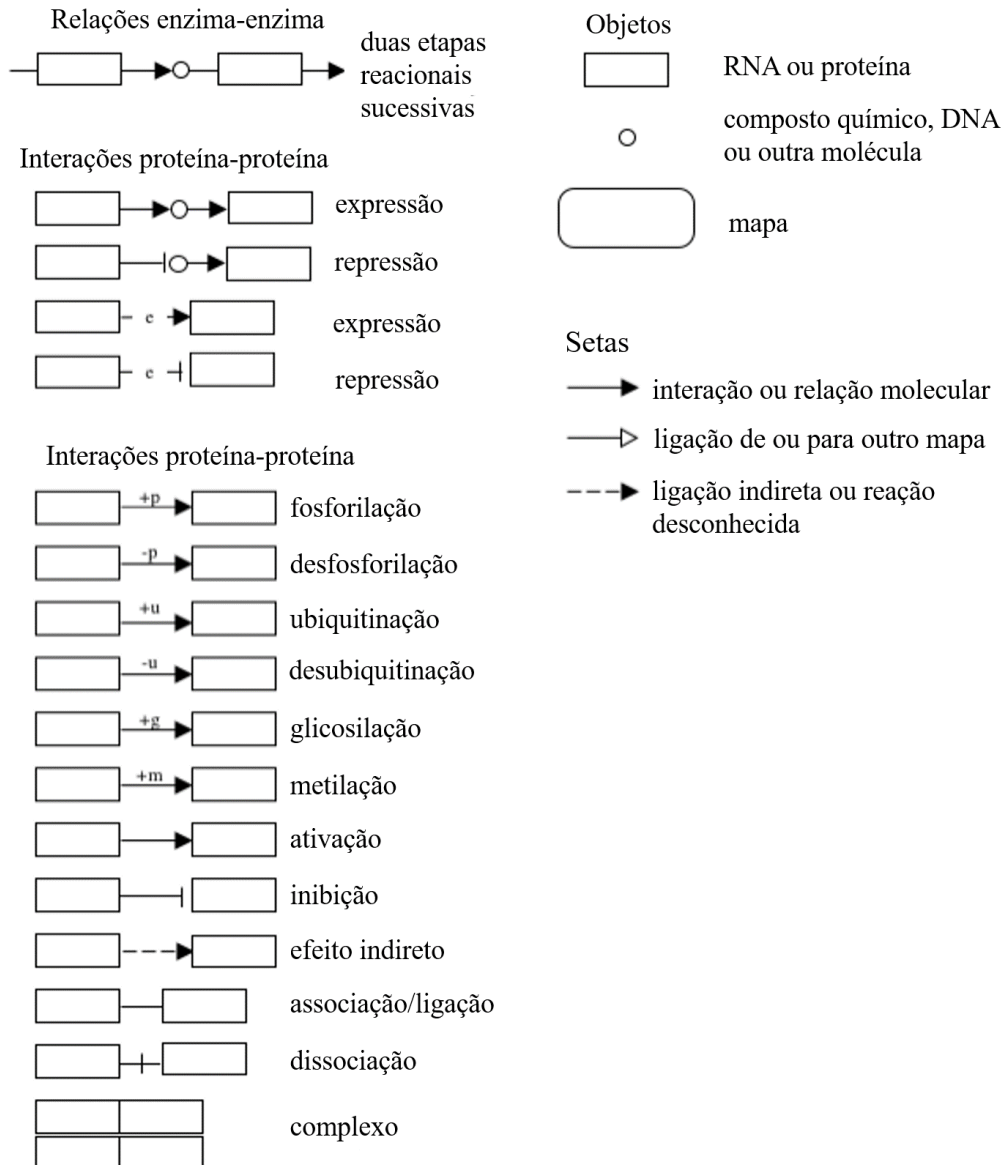


Figura 70) Diagrama¹ identificando os símbolos utilizados nos mapas de vias do KEGG

1 – O diagrama foi adaptado da documentação sobre as notações utilizadas para construir os modelos de mapas de vias disponibilizados pelo KEGG, acessado em março de 2021 (https://www.genome.jp/kegg/document/help_pathway.html).