

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

MICHELE FARIA RAMOS

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS T REGULADORAS AUTÓLOGAS E
ALOGÊNICAS NUMA REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS (MLR)**

Belo horizonte/MG
2018

MICHELE FARIA RAMOS

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS T REGULADORAS AUTÓLOGAS E
ALOGÊNICAS NUMA REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS (MLR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago

Belo Horizonte/MG
2018

043 Ramos, Michele Faria.
Estudo da influência de células T reguladoras autólogas e alogênicas numa Reação Mista de Linfócitos (MLR) [manuscrito] / Michele Faria Ramos. – 2018.
73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos.

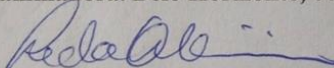
CDU: 577.1

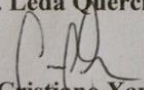


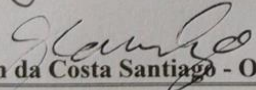
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MICHELE FARIA RAMOS.
 Aos seis dias do mês de julho de 2018 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Estudo da influência de células T reguladoras autólogas e alogênicas numa reação mista de linfócitos (MLR)", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Cristiano Xavier Lima (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de julho de 2018.


 Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)


 Dr. Cristiano Xavier Lima (UFMG)


 Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus porque sem ele nada do que foi feito se fez; Ao Sr. José Anjo, à dona Marli (in memoriam), à Mikaele e ao Michelson, minha família amada que de um modo especial fizeram parte deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus porquê de um modo tão terrível e maravilhoso eu fui formada, e já desde a criação do mundo, mesmo antes de eu ter sido formada no ventre da minha mãe ele me escolheu e me ensinou a amá-lo. Desde de então nunca deixou de estar ao meu lado, sempre dirigiu meus passos e me corrigiu com amor quando foi preciso. Agradeço a Ele porque nunca desistiu de mim mesmo eu sendo falha, Ele não olhou minha pequenez de homem, mas fez o inexplicável por mim. Me ensinou a servi-lo, a dedicar minha vida em oração, em louvor e adoração ao teu nome. Me ensinou que eu devo amar o próximo como a mim mesmo sem olhar a quem. Me ensinou a amar e respeitar meus pais e irmãos, e o mais importante para a minha alma, me ensinou a amá-lo intensamente. Quando paro para pensar no Teu grande amor por mim, penso como pode Deus criador de tudo amar a mim uma pecadora? Mas Ele escolheu me amar e sou muito grata por isso. Agradeço a Deus porque esse mestrado foi uma promessa que Ele me fez e que se cumpriu. Tudo quanto ele me disse antes de vir se cumpriu. Cada detalhe em todas as etapas se cumpriu. Todas as dificuldades e lutas que passei foi permissão Dele para meu aperfeiçoamento acadêmico e principalmente espiritual. Ele foi a minha força e meu sustento durante a realização deste trabalho e reconheço que és soberano e sem o Senhor não teria sido vitoriosa. Já agradeço ao Senhor pelos próximos anos vindouros sei que com o Senhor na minha vida não tenho o que temer, porque o Senhor move a eternidade em favor daqueles que te ama. Louvando e engradecido seja o teu nome por toda a eternidade.

Agradeço aos meus pais, Sr. José Anjo e dona Marli (in memoriam), por terem me ensinado a ser uma pessoa íntegra e correta. Por terem sido para mim exemplo de vida, de honestidade. Agradeço ao meu pai porque ele não mediu esforços para me ajudar e me sustentar aqui. A vida toda fez por mim e nunca eu conseguirei retribuir em dinheiro o que ele me fez. Gastou comigo o que ele poderia ter gastado com ele, tudo isso porque é simplesmente maravilhoso. A única forma que tenho para realmente agradecê-lo é dizendo e demonstrando a ele o quanto o amo e ele é importante para mim. Minha mãe, mulher maravilhosa e extraordinária, nos ensinou a vida toda a amar a Deus e sempre fazer o bem. Foi uma heroína em nossas vidas, acolheu tantos que tinham necessidades. Viveu para todos e esqueceu dela. Agradeço a ela mesmo não estando aqui para eu lhe dar um abraço e dizer que essa vitória é dela, porque sempre me incentivou e me apoiou nessa escolha. E o Senhor a recolheu antes que pudéssemos comemorar a realização do nosso sonho. Meus pais renunciaram muitos dos seus sonhos para que eu realizasse o meu sonho. Sou vencedora porque vocês venceram por mim primeiro. Obrigado pela compreensão, dedicação e pelo amor maravilhoso com que me amam.

Agradeço aos meus irmãos Mikaele e Michelson, que são maravilhosos. Me apoiaram e acreditaram em mim desde o princípio e não mediram esforços para me ajudar. Mikaele é um grande amor que eu tenho na vida, porque é uma grande companheira e amiga que a vida toda cuidou de mim, mesmo eu sendo a mais velha. Fez muitas coisas por mim, deixando de realizar seus sonhos para me ajudar a realizar o meu. Não há dinheiro que pague o amor que ela me demonstrou esses anos todos. Michelson sempre me colocando para cima com suas postagens e por me incentivar a correr atrás daquilo que seria o melhor para mim. Muitas vezes brigou comigo por me achar devagar quase parando, é a minha natureza meu irmão, te amo muito. Eu torço muito pelo seu sucesso também. Tenho confiança em Deus que vocês também receberão de Deus grandes vitórias, porque elas já foram decretadas desde a eternidade.

Agradeço ao Marcílio Lisboa e a Ana Carolina Berhing por terem me apoiado quando passei no mestrado, vocês me transmitiram muita força e isso me ajudou a largar tudo e correr atrás do meu sonho. A cada conquista que temos sempre temos que lembrar daqueles que sempre fizeram parte da nossa história e vocês fizeram parte da minha, mesmo sendo por um curto período de tempo. Mas foi o tempo suficiente para eu aprender muita coisa e também ensinar muita coisa. Mesmo distantes algo ainda me uni a vocês, sinto falta dos dias corridos, das risadas nas cirurgias, das broncas também (não foram muitas), dos pacientes me apertando por uma consulta, até hoje alguns me ligam. Mas valeu a pena né! Muitos pacientes saíram curados, muitos chegaram necessitados de cuidados, muitos lutaram, mas não foi possível a condições humanas salvá-los, mas o que fica registrado é o carinho que tivemos por eles e a dedicação em encontrar uma maneira de fazer com que eles se sentissem felizes em meio a tanto sofrimento. Quero em toda minha vida guardar em meu coração o que aprendi com vocês quando trabalhamos juntos. Vocês sempre foram exemplos de médicos e seres humanos para mim. Nunca vi tanta simplicidade e humildade como vi em vocês. Vocês nunca olharam para as condições daqueles que estavam cuidando, e sim olharam para o ser humano que ali estava precisando de ajuda. Tenho certeza que Deus recompensará vocês por serem prestativos, humanos e amarem ao próximo como tem feito. Sei que financeiramente falando vocês não têm o retorno que merecem, mas Deus suprirá todas as suas necessidades por darem a vida a cuidar do próximo. Nunca esquecerei de como cuidaram de mim no momento mais difícil da minha vida. Enfim, amo vocês dois de todo meu coração e que eu possa ter amizade de vocês eternamente.

Agradeço ao Professor Helton por ter confiado em mim. Sei que em vários momentos ele pode ter pensando que eu não daria conta, mas me esforcei ao máximo para provar que tenho capacidade de ir além. Isso porque tenho um ser especial que sempre vai a minha frente

preparando todas as coisas. Deus o escolheu para ser um vaso usado para que eu alcançasse esse sonho. Peço a Deus todos os dias para que nunca falte a bênção do Senhor sobre a vida dele e que o seu caminho seja de muito sucesso e realizações. Deus o recompensará não em dobro, porque ele merece muito mais.

Agradeço a Mariana Heriques e a Karla Uriarte pela amizade maravilhosa que me deram, por todos os dias me darem uma palavra de ânimo e força para vencer as batalhas que estavam travadas. Agradeço por terem cuidado de mim quando adoeci. Agradeço por confiarem em mim e fazerem meus dias mais felizes. Éramos três desconhecidas, com culturas e hábitos diferentes, mas que Deus uniu para que cuidássemos umas das outras. Com certeza houve momentos em que achamos certas atitudes diferentes, mas aprendemos que as melhores coisas da vida é termos pessoas que nos ensinam com as diferenças. Elas foram um presente maravilhoso que Deus me deu e tenho elas como duas irmãs queridas. Jamais esquecerei dos momentos maravilhosos que passamos juntas e como eu cresci em conhecimentos e atitudes através da vida delas. Vocês estão eternamente em meu coração.

Agradeço a todos do laboratório de Imunoparasitologia pelo carinho e a amizade e pelo que me ajudaram de alguma forma no meu trabalho.

Agradeço a Marcela Helena por ter me acolhido com tanto carinho e ter dedicado seu precioso tempo em me ensinar. Não tenho palavras para expressar o quão importante ela é em minha vida e quanto sou grata pelo que ela fez. Ela não sabe, mas houve alguns gestos dela que fizeram com que minha admiração por ela crescesse e nossa amizade se tornasse uma fortaleza. Em muitos momentos consolamos uma a outra pelas lutas e pejejas que estávamos vivendo. Mesmo eu não tendo muito para acrescentar com palavras, ela sempre colocava sua confiança em mim para falar do que estava sentindo. Confiança não é uma coisa que nasce da noite para o dia, mas quando se tem sinceridade e humildade, a confiança cresce e estabelece uma conexão entre as partes. Tenho ela como um exemplo acadêmico que me fez ver que eu posso ser vencedora e conquistar grandes coisas com meu esforço.

Agradeço a Laila por me ensinar a não desistir, a confiar e acreditar em meu potencial. Por me dar uns puxões de orelha quando eu falava que não ia conseguir. Foi muito importante na minha vida durante estes dois anos, jamais esquecerei da sua simplicidade, boa vontade, dos finais de semanas que gastou comigo me ensinando ciência. Tenho certeza que o futuro te reserva grandes coisas porque você merece. Peço a Deus que te recompense por tudo que fez por mim e pela sua amizade sincera e verdadeira. Você tem muito para crescer.

Agradeço a Camila, pessoa mais que maravilhosa. Que chorou comigo quando achei que era o fim. Me ajudou a buscar forças para vencer muitos desafios que surgiram e que eu

achei que seria difícil vencer. Pessoa extraordinária, de um coração sem limite de tamanho. Nunca mediu esforços para ajudar os colegas e dedicou ao extremo quando decidiu ajudar. A primeira vez que a vi, me recebeu no laboratório com muita simpatia e isso já me fez sentir à vontade e desejosa de compartilhar com ela de uma amizade. Ela é muito especial em minha vida, que possamos viver essa amizade para sempre. Deus te abençoe.

Agradeço a Mariana Souza que surgiu na minha vida para ser uma amiga do coração. Uma pessoa extraordinária, muito inteligente e que tem um brilho próprio. Eu sei que foi Deus que me deu a sua amizade como presente. O que mais me marcou, foi a confiança que ela colocou em mim para ajudá-la nos seus experimentos. Isso me fez sentir uma pesquisadora. Sua paciência em explicar e me ensinar me fez ter segurança em realizar os experimentos. Foi uma peça muito importante para mim no meu aprendizado em bases. Me ensinou que não devo ser ansiosa. Me consolou quando eu precisei e demonstrou que a nossa amizade é para uma vida toda. Não tenho palavras para expressar o amor que sinto por ela e nem o quanto sou grata por tudo. Peço a Deus que te dê tudo que eu como ser humano não posso te dar, só Ele para te recompensar. Te amo Mari, você é como uma irmã para mim.

Agradeço ao Tertuliano por ter me aguentado com as minhas falações e ter me ensinado que ouvir é muito melhor do que falar. Como nossa amizade fluiu tão rápido. Em pouco tempo de convívio parece que nos conhecemos a anos. Ele é um amigo muito precioso para mim. Desejo que nossa amizade seja a cada dia fortificada e que Deus o abençoe dando tudo que almeja o seu coração.

Agradeço a Stephanie por se preocupar comigo e me abraçar todos os dias, sempre trazendo com seu abraço força para lutar pela vitória. Sua amizade foi um grande presente que recebi de Deus e que guardarei com muito carinho em meu coração. São poucas as pessoas que têm sensibilidade para fazer a diferença na vida do outro. E isso você tem de sobra. Que Deus te abençoe sempre e te dê tudo que almeja o seu coração. Ele é Deus e te recompensará pelo cuidado comigo.

Agradeço a Eneida Paganni que foi uma pessoa que me ensinou como se comportar e trabalhar em um laboratório. Agradeço a ela por cada momento que paramos para conversar sobre vários assuntos que me alegraram e me ajudaram a ser uma acadêmica melhor. Agradeço pela sua amizade que muito importante para mim, tenho uma grande admiração pela sua pessoa, pois é correta, sincera, sabe corrigir e também nos defender quando é necessário.

Agradeço a Rafaela uma pessoa maravilhosa, que me ajudou muito não só nas tarefas do laboratório, mas me deu palavras maravilhosas quando eu me senti triste e desanimada. Sempre companheira e cuidou dos meus filhotinhos todo o tempo. Até me colocar para dormir

ela foi em minha casa. Existem pessoas que conseguem demonstrar o quanto são nobres com os seus gestos, e a Rafa é assim. Desejo que ela cresça a cada dia e continue essa pessoa humilde, alegre e simples. Peço a Deus que cuide dela todos os dias.

Agradeço ao Leonardo pela amizade e por ter sido meu montador particular de guarda-roupas e cama. É especial porque sempre está disposto a ajudar e não posso deixar de citar: fazendo um café MARA para nós.

Agradeço a Sarah que é uma pessoa maravilhosa, muito inteligente e uma exemplo de dedicação para mim. Sempre esteve disposta a me ensinar e a me incentivar. Muitas outras coisas ela fez por mim e sou muito grata.

Agradeço a Tiffany e a Gabriela pelo carinho e amizade e pela ajuda em meus experimentos. Agradeço ao Gregório pelo companheirismo durante este período de aprendizado.

Agradeço ao Marcus Vinícius por ter sido um grande amigo e ajudador intelectual, nos momentos de desesperos com os artigos científicos, sempre me socorreu. Sempre me deu uma palavra de ânimo e consolo. Até mesmo longe tem me dado um suporte acadêmico que tem acrescentando muito em minha vida. Agradeço também pelas suas orações meu amigo.que Deus de recompense.

Agradeço a Ana Beatriz (Tiza), Dayane e Lorena do laboratório de citometria da Fio Cruz, pela atenção e ajuda dada a mim quando precisei usar os equipamentos de citometria.

Agradeço ao Pedro da Fio Cruz por sempre ter boa vontade em me ajuda com os anticorpos e o CFSE.

Agradeço a Lis Antonelli por ter me ensinado a analisar os resultados de citometria e pela disposição em me ajudar nos dias dos experimentos com os ajustes do citômetro de fluxo.

Agradeço a Letícia Oliveira por ser para mim uma irmã e sempre orar por mim neste período de mestrado. Suas orações foram transmissão de vida para mim e mesmo não tendo parte neste trabalho tecnicamente falando, você foi importante com sua fé. Você me alegrou e me consolou nos momentos que estive triste e foi uma grande amiga. Um verdadeiro presente de Deus para mim. A vida em BH não é fácil, por estar longe de casa. Mas você fez com que o sofrimento você amenizado com sua amizade. Não tenho palavras para expressar o quanto você especial para mim. Quero que nossa amizade seja eterna e que Deus te recompense, você merece tudo e mais um pouco. Amo você.

Agradeço ao Ariel, um anjo que Deus enviou para me ajudar com estatística. Sua contribuição foi muito importante para eu entender como plotar meus dados e aprender aqueles

cálculos cabulosos em estatística. Que Deus te recompense meu amigo pela sua boa vontade em me ajudar e pelo carinho da sua amizade.

Agradeço ao professor Leonardo de Araújo Lopes pela sua amizade e por colocar sua confiança e expectativa em mim. Desde a graduação vem me incentivando a fazer este mestrado e sei que ele espera muito mais de mim. Não sei se vou deixá-lo orgulhoso, mas posso dizer que estou aprendendo a ser pesquisadora. E quero deixar de lembrança aqui uma frase que ele me escreveu em um bilhete dois anos após eu estar formada e que guardo até hoje: “Prezada, querida e estimada ½ ponto (como me chama) Professor não é aquele que entrega as respostas prontas, mas ensina os meios para os alunos conseguirem alcançá-las, conforme dizia Galileu Galilei. Tenho plena consciência que você consegue alcançar suas respostas e me encher de orgulho. Abraços do seu orientador Leo”. Levarei isso comigo para sempre e colocarei em prática para que no futuro quando eu tiver meus alunos poder sempre ter uma palavra que os faça correr atrás dos seus sonhos e nunca os julgarei por incapacidades, mas sim mostrarei que todo esforço é válido e que a experiência se adquire com o tempo e dedicação.

Agradeço aos meus amigos de Ipatinga que mesmo distantes estiveram presentes com uma palavra amiga, com suas orações, torcendo por mim e nunca me esquecerem. Agradeço a Paula Cristina porque sempre me deu forças e nunca deixou de ser minha amiga do coração. Ela é muito especial para mim, não esqueço as palavras de consolo e os dias que eu estava triste me alegrou com seu carinho. Agradeço ao Idemar que sempre foi um amigo verdadeiro e um pai para mim. Mesmo distante me socorreu quando eu precisei.

Agradeço todos os nossos amigos que de alguma forma estiveram presentes neste percurso me dando força e incentivo e que ajudaram no andamento do meu projeto.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela oportunidade de ter realizado meu mestrado nestas Instituição e às Agências de Fomento FAPEMIG e CNPq.

“Recompensou-me o Senhor conforme a minha justiça, retribuiu-me conforme a pureza das minhas mãos. Porque guardei os caminhos do Senhor, e não me apartei impiamente do meu Deus. Porque todos os seus juízos estavam diante de mim, e não rejeitei os seus estatutos. Também fui sincero perante ele, e me guardei da minha iniquidade”.

Salmos 18:20-23.

RESUMO

O transplante de órgãos é uma estratégia clínica para tratar pacientes com falência funcional de órgãos, mas o grande obstáculo no sucesso do transplante clínico é a rejeição de células. O insucesso resulta ativação das respostas aloimunes mediadas por células T, através do reconhecimento de aloantígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) do doador ou do receptor. A rejeição aguda pode ser evitada através de estratégias profiláticas usando terapia imunossupressora, mas estes imunossupressores são incapazes de evitar a rejeição crônica. Um tratamento para rejeição crônica tem sido o retransplante, mas a escassez de órgão tem induzido pesquisas de novas terapias para promover tolerância operacional nos receptores. As células T reguladoras (Tregs) são potentes imune supressoras das respostas imunes através de produção de citocinas supressoras, supressão direta de células efetoras e modulação da maturação e função das células apresentadoras de antígenos. Células Treg estão envolvidas com a indução e manutenção da tolerância e tem sido alvo importante de estudo para terapia associada a indução de tolerância operacional. Uma terapia celular usando células T reguladora $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low} FoxP3^+$ como estratégia de indução de tolerância operacional tem sido alvo de estudos em vários modelos de transplantes. Uma abordagem detalhada da função das células T reguladoras neste contexto, permitirá atingir um entendimento amplo dos mecanismos moleculares na promoção de tolerância operacional e permitir o sucesso terapêutico. Neste trabalho, estudamos o comportamento imunorregulatório das células Tregs em um ensaio *in vitro* chamado Mixed Lymphocyte Reaction (MLR), onde os linfócitos T respondedores de um indivíduo quando cultivados juntamente com as APCs estimuladoras de outro indivíduo para induzir reatividade alogênica na presença ou não de células Treg homotípica ou alotípica às APCs durante 7 dias. As células Treg, células T $CD4^+$ e APCs foram separadas por sorting e depois plaqueadas. As células T $CD4^+$ foram marcadas com CFSE e o grau de proliferação foi analisado de acordo com a diluição do CFSE. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as células T reguladoras são capazes de imunossuprimir a proliferação de células T $CD4^+$ e que ainda as células T $CD4^+FoxP3^+$ alogênicas são melhores indutoras de supressão da proliferação em MLR. Observou-se também que as células Tregs suprimiram a produção de $IFN\gamma$ e TNF em MLR, mas não induziu secreção de IL-10. Esses achados mostram que as células Tregs são potentes indutora da supressão da ativação de células $TCD4^+$ por células APCs, sendo promissoras para desenvolvimento de uma terapia celular.

Palavras-chaves: Transplante, Alorreconhecimento, Terapia Celular, Célula Treg, Tolerância, Reação Mista de Linfócitos.

ABSTRACT

Organ transplantation is a clinical strategy to treat patients with functional organ failure, but the major obstacle to the success of clinical transplantation is the rejection of cells. The unsuccessful results of activation alloimmune responses mediated by the T cells, through recognition of alloantigens presented by donor or recipient antigen presenting cells (APCs). Acute rejection can be prevented by prophylactic strategies using immunosuppressive therapy, but these immunosuppressants are unable to prevent chronic rejection. A treatment for chronic rejection has been retransplantation, but organ shortage has also driven research for new therapies to promote operational tolerance in recipients. T regulator cells (Tregs) are potent immune suppressors of immune responses by suppressor cytokines production, direct suppression of effector cells and modulation of maturation and function of antigen presenting cells. Treg cells are involved in the induction and maintenance of tolerance and have been an important study target for therapy associated with induction of operational tolerance. A cellular therapy using CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low} FoxP3⁺ regulatory T cells as a strategy of operational tolerance induction has been the subject of studies in various transplants model. A detailed approach to the role of regulatory T cells in this context, achieved a broad understanding of the molecular mechanisms in promoting operational tolerance and enabling therapeutic success. In this paper, we studied the immunoregulatory behavior of Treg cells in an in vitro assay called Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) where T lymphocytes of an individual responders when cultured together with the APCs that stimulate another individual to induce allogeneic reactivity in the presence or absence of homotypic or allopidic Treg cells to the APCs for 7 days. Treg cells, CD4⁺ T cells and APCs were separated by sorting and then plated. CD4⁺ T cells were marked with CFSE and the proliferation degree was analyzed according to CFSE dilution. The results obtained in this study showed that regulatory T cells are capable of immunosuppressing the proliferation of CD4⁺ T cells and that allogeneic FoxP3⁺ CD4⁺ T cells are good suppression of proliferation inducing in MLR. It was also observed that Treg cells suppressed IFN- γ and TNF- α production in MLR, but did not induce IL-10 secretion. These findings show that Tregs cells are prominent suppression inducers of the activation of CD4⁺ T cells by APCs, being promising for the development of a cellular therapy.

Key-Words: Transplantation, Allore Recognition, Cell Therapy, Treg Cell, Tolerance, Mixed Lymphocyte Reaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ativação de células T depende de três sinais	22
FIGURA 2 - Complexo principal de histocompatibilidade.....	23
FIGURA 3 - Mecanismos de reconhecimento direto, semidireto e indireto	25
FIGURA 4 – Rejeição hiperaguda.....	27
FIGURA 5 – Rejeição aguda e crônica	29
FIGURA 6 - Mecanismo de imunossupressores da célula T reguladora.....	33
FIGURA 7 - Processo de separação da porção células polimorfonucleares do sangue Periférico.....	38
FIGURA 8 – <i>Dont plot</i> representativo da estratégia de sorteamento das células APCs, TCD4 ⁺ e Treg	39
FIGURA 9 - Esquema representativo da cultura mista de linfócitos (MRL) de 7 dias.....	40
FIGURA 10 - <i>Dont plot</i> representativo da estratégia de sorteamento das células APCs, TCD4 ⁺ e Treg	41
FIGURA 11 - Análise da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ em um MLR por citometria de fluxo.....	43
FIGURA 12 - Foto representativa do ensaio de supressão da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ em um MLR	44
FIGURA 13 - Análise do perfil de proliferação de células T CD4 ⁺ no MLR induzido por APCs na presença ou não de células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ alo e/ou auto	45
FIGURA 14 - Quantificação de citocinas IL-10 (A), TNF (B) e IFN γ (C) por ELISA no sobrenadante de MLRs na presença ou ausência de Treg auto e/ou alo.....	47

SUMÁRIO

1	
INTRODUÇÃO	18
1.1 Transplantes	18
1.1.1 Histórico	18
1.1.2 Definição de trasplante	20
2 MECANISMO DE REJEIÇÃO DE TRANSPLANTE	21
2.1 Complexo principal de histocompatibilidade	22
2.2 Vias de aloreconhecimento	23
2.2.1 Via direta de aloreconhecimento de antígeno	23
2.2.2 Via indireta de aloreconhecimento de antígeno	23
2.2.3 Via de aloreconhecimento semidireta	24
3 CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE	25
3.1 Células T	25
3.2 Células apresentadoras de antígenos	26
4 TIPOS DE REJEIÇÕES DE ENXERTO	26
4.1 Rejeição hiperaguda	26
4.2 Rejeição aguda	27
4.3 Rejeição crônica	27
5 TOLERÂNCIA PERIFÉRICA E OPERACIONAL	29
6 MECANISMOS DE SUPRESSÃO MEDIADOS POR CÉLULAS TREGS	30
6.1 Células T reguladoras	30
6.1.1 Modulação da maturação e função das células apresentadoras de antígenos	31
6.1.2 As células T reguladoras também podem regular a função de células T efetoras através da via de conversão de ATP em adenosina	31

6.1.3 Imunossupressão das células T através da secreção ou depleção de citocinas e de mecanismos indutores apoptose.....	32
7 TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS T REGULADORAS.....	34
8 JUSTIFICATIVA.....	36
9 OBJETIVO.....	37
9.1 Objetivos Específicos.....	37
10 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
10.1 Doadores saudáveis.....	38
10.2 Isolamento das células mononucleadas do sangue periférico.....	38
10.3 Purificação dos subconjuntos de células por FACS.....	39
10.4 Reação Mista de Linfócitos <i>in vitro</i>	39
10.5 Análise da proliferação por citometria	40
10.6 Produção de citocinas.....	41
10.7 Análise Estatística.....	41
11 RESULTADOS.....	42
11.1 As células T reguladoras são capazes de imunossuprimir a proliferação de células T CD4 ⁺ em um MLR <i>in vitro</i>	42
11.2 As células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ alogênicas são melhores indutoras de supressão da proliferação em MLR.....	44
11.3 Células Tregs suprimiram a produção de IFN γ e TNF em MLR, mas não induziu secreção de IL-10.....	45
12 DISCUSSÃO.....	48
13 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transplantes

1.1.1 Histórico

No século passado havia um desejo muito grande de tratar falências de órgãos através de transplante. Jaboulay e Carrel estavam entre os cirurgiões que buscavam inovações em técnicas cirúrgicas necessárias para propiciar um implante bem-sucedido dos órgãos. No ano de 1906, Jaboulay e colaboradores desenvolveram e utilizaram a técnica de anastomose vascular em dois xenotransplantes renais (porco e ovelha), onde os vasos renais foram anastomosados aos vasos braquiais do paciente, mas essa primeira tentativa não foi bem-sucedida ambos os transplantes falharam e ambos os pacientes morreram (HUME, *et al.*, 1955; MORRIS, 2004; WATSON & DARK, 2012). Yu Yu Voronoy em 1936, foi o primeiro cirurgião a usar rim humano para transplantação, mas todos os transplantes falharam, devido aos efeitos deletérios da isquemia quente pré-transplante, uma vez que o rim foi recuperado seis horas após a morte do doador (MATEVOSSIAN, *et al.*, 2009). Os transplantes até então eram realizados usando órgãos de animais ou órgãos de humanos mortos, e só na década de 1950 começou-se uma preocupação em evitar lesões isquêmicas excessivas e a usar rins de doadores vivos, alguns provenientes de parentes do destinatário e outros eram pacientes não relacionados (LINDEN, 200; WATSON & DARK, 2012; CAMERON et al, 2018). A técnica cirúrgica foi a primeira grande barreira no transplante que precisava de aprimoramento, pois anastomoses de um rim nos vasos da coxa ou do braço era tecnicamente simples, mas não uma solução viável a longo prazo. Em 1951 surgiu uma técnica cirúrgica onde o rim era implantado extraperitonealmente na fossa ilíaca, o que facilitou o acesso aos vasos ilíacos externos e à bexiga proporcionando melhor anastomoses dos vasos e do ureter do órgão ao receptor (MORRIS, 2004). Logo após essa melhoria da técnica, Murray e seus colaboradores realizaram um transplante de rim bem-sucedido usando um rim proveniente do irmão gêmeo do receptor, e que trouxe repercussão no mundo todo e novamente esperança para o uso da transplantação de órgãos para restabelecimento do estado clínico de pacientes com falência de órgãos (WOODRUF *et al.*, 1961; MORRIS, 2004; WATSON & ROBSON, 2012).

O transplante clínico de fígado demandou maior tempo para alcançar o sucesso desejado, muito devido ao estado clínico do receptor, que geralmente é mais grave quando comparado aos receptores de rim, além de ser um procedimento que necessita de mais tempo para ser realizado quando comparado com o transplante renal. Além disso a técnica cirúrgica é mais delicada e precisa na sua maioria ser realizada na presença de uma coagulopatia significativa (WATSON & DARK, 2012). Vários transplantes foram realizados sem sucesso

devido às dificuldades encontradas na aplicação de imunossupressores e na técnica cirúrgica o que promovia lesão e isquemia, evoluindo, muitas vezes, para insuficiência do órgão ou sepse (COOPER, 2012; DANGOOR *et al.*, 2015). Starzl *et al.*, nas suas tentativas usando animais, identificou a necessidade de resfriar o fígado antes do transplante e manter o retorno venoso ao coração usando derivação veno-venosa para desviar o sangue da veia cava inferior (VCI) e circulação portal para a veia cava superior (STARZL *et al.*, 1963).

Mesmo com essas inovações na técnica cirúrgica foram necessárias outras duas décadas para que o transplante hepático fosse considerado um tratamento bem-sucedido para pacientes com insuficiência hepática, pois precisava ainda de melhorias na seleção de pacientes, manejo pré-operatório e imunossupressão pós-operatória (WATSON & ROBSON, 2012). Com relação a cirurgia cardíaca, o primeiro transplante de coração foi realizado pelo americano Norman Shumway, que realizando experimentos com animais obteve um caminho para elaboração de uma estratégia operatória, que consistia no resfriamento do coração e na retirada de parte dos átrios *in situ* para reduzir o número de anastomoses necessárias (DONG, 1965). Essa experiência estimulou Christiaan Barnard, a realizar o primeiro transplante de coração humano em 1967 (BARNARD, 1968). Outros cirurgiões realizaram transplantes, mas os resultados foram muito ruins, com poucos pacientes sobrevivendo ao transplante. (WATSON & ROBSON, 2012).

No ano de 1964, Hardy realizou o primeiro transplante de pulmão doado após morte circulatória em uma paciente que faleceu devido insuficiência renal (HARDY *et al.*, 1964). Em 1981 Reitz e colaboradores realizaram o primeiro transplante de coração-pulmão que foi bem-sucedido. E um transplante de pulmão unilateral realizado por um grupo de Toronto também obteve sucesso (CAMERON *et al.*, 2018).

Mesmo com o avanço das técnicas cirúrgicas ainda havia um grande problema a ser resolvido em relação aos obstáculos imunológicos que estavam sendo enfrentados. Estudos realizados por Medawar e colaboradores com transplantes de pele mostraram que os enxertos de pele eram destruídos por um complexo mecanismo que tinha características imunológicas contra o enxerto e que em um segundo transplante com o mesmo doador, o receptor reagiria mais violentamente, apontando para uma imunidade adquirida e uma memória montada a partir primeiro tecido (GIBSON & MEDAWAR 1943; CAMERON *et al.*, 2018).

Com o passar do tempo, aumentou-se o interesse da ciência pela imunologia do transplante. Na década de 90, os mecanismos envolvendo a rejeição de enxerto ainda não eram totalmente compreendidos e a aceitação ou não do enxerto não parecia depender somente de boa técnica cirúrgica para evitar danos ao órgão no processo, mas, o grau de compatibilidade do antígeno

leucocitário humano (HLA) de doador e receptor parecia fundamental para tolerância (CALNE, 2005). Com um entendimento mais aprofundado sobre a imunologia do transplante surgiram as estratégias de imunossupressão química que promoviam supressão do sistema imunológico e melhoraram a aceitação do enxerto transplantado. A azatioprina foi o primeiro imunossupressor bem-sucedido, que mostrou ser muito eficaz por permitir a sobrevivência prolongada de transplantes renais feitos em cães (CALNE, 1961; WATSON & DARK, 2012).

O aprimoramento da técnica cirúrgica, a melhora no entendimento da compatibilidade de HLAs e o controle da resposta imune pós-operatório com a descoberta de imunossupressores potentes e com menores efeitos colaterais, promoveram melhorias nas taxas de sobrevida tanto para o enxerto quanto para o receptor do transplante de órgãos sólidos. Esses avanços fizeram do transplante o tratamento preferido para muitas doenças devastadoras, incluindo a insuficiência renal, cardíaca, hepática, pulmonar e pancreática. Em alguns tipos de transplantes é reportado que esta sobrevida está acima de 95%, como é o caso de transplantes renais (FAN *et al.*, 2011). Entretanto os pacientes em uso de imunossupressores ainda sofrem com os inúmeros efeitos colaterais indesejáveis da imunossupressão inespecífica, que provocam desde hiperplasia gengival e hipertricose a infecções potencialmente fatais, aumento da incidência de malignidades e doenças cardiovasculares (SAGOO *et al.*, 2011).

A imunossupressão é necessária para controlar a vigorosa resposta imune desencadeada pelos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade alogênico (MHC) do tecido doador, que representam o principal obstáculo para a obtenção da tolerância ao transplante. Embora a imunossupressão possa gerenciar efetivamente a rejeição aguda, ela é incapaz de impedir a geração de aloreatividade antidoador ao longo do tempo. Como consequência, muitos pacientes sucumbem à rejeição crônica do aloenxerto ou às toxicidades e efeitos colaterais da imunossupressão a longo prazo (LAMB *et al.*, 2011; SAGOO *et al.*, 2011).

1.1.2 DEFINIÇÃO DE TRASPLANTE

Por definição, um transplante pode ser denominado como o processo pelo qual células, tecidos ou órgãos são retirados de um indivíduo (doador) e inserido em um indivíduo diferente (receptor) e tem como objetivo tratar pacientes com falência funcional de órgãos (SAGOO *et al.*, 2011; INGULLI *et al.*, 2010).

Quando o órgão é inserido em um local anatômico, o transplante é denominado de ortotópico, quando inserido em um local diferente chama-se heterotópico (ABBAS *et al.*, 2011). Os enxertos podem ser classificados de acordo com a relação entre o doador e o receptor: autoenxerto (enxerto do próprio indivíduo), isoenxerto (enxerto de indivíduos

idênticos), aloenxerto (enxerto de indivíduos geneticamente díspares) e xenoenxerto (enxerto entre espécies diferentes) (WOOD *et al.*, 2013).

2 MECANISMO DE REJEIÇÃO DE TRANSPLANTE

A rejeição de células e tecidos transplantados entre indivíduos geneticamente distintos tem sido o principal obstáculo para o sucesso de transplantes clínicos. O insucesso resulta das respostas aloimunes mediadas por células T, através do reconhecimento de aloantígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) do doador ou do receptor (LIU, *et al.*, 2013). As células T são selecionadas no timo para assegurar que seu TCR tenha baixa afinidade pelo o MHC próprio carregando peptídeo próprio garantindo assim a exclusão de células T autorreativas. Entretanto, a troca do peptídeo do MHC por um peptídeo estranho, como ocorre em infecções, pode alterar a afinidade do TCR pelo MHC e o aumento da afinidade induz a ativação do linfócito T (INGULLI *et al.*, 2010). Nesse caso, diz-se que o TCR “reconheceu” o peptídeo estranho sendo assim específico para o mesmo.

O reconhecimento de um antígeno via TCR (também chamado de primeiro sinal) é muito importante para gerar o estímulo necessário para uma resposta imune efetora, mas esse sinal sozinho é insuficiente para promover a ativação linfocitária. A ativação de um linfócito é um processo rigidamente regulado que precisa de pelo menos dois sinais distintos. O segundo é gerado pela interação entre o receptor CD28 das células T com seus ligantes co-estimuladores (B7-1 e B7-2) na superfície das APCs ativadas. (GREENWALD *et al.*, 2001; WELLS *et al.*, 2001). Outros sinais podem participar e instruir a ativação dos linfócitos T, mas também vão depender da ativação das células apresentadoras. Num transplante, o processo de isquemia e manipulação do órgão a ser transplantado seriam suficientes para ativar as células dendríticas a expressar as moléculas co-estimuladoras presentes nesse órgão e, eventualmente. Já o primeiro sinal pode ser disparado pelo reconhecimento alogênico pelo TCR do MHC.

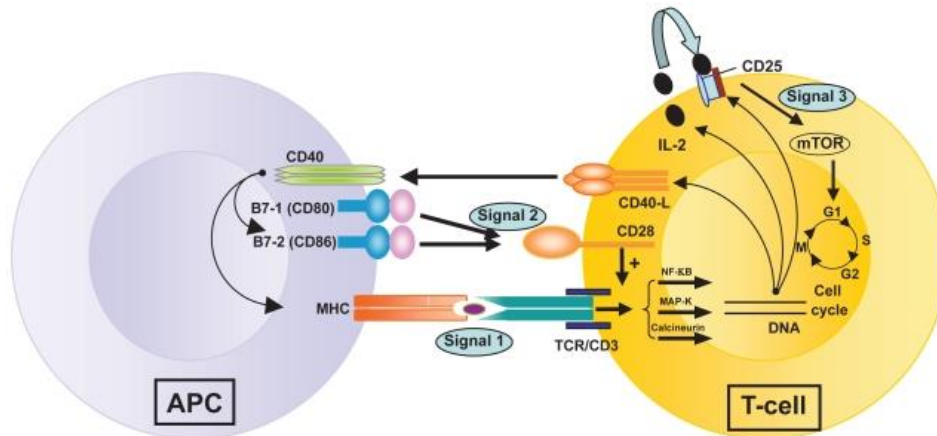


Figura 1: Ativação de células T depende de três sinais. O primeiro sinal é dado com a interação do receptor de células T (TCR) com as moléculas de MHC na APCs. O segundo sinal de co-estimulação é induzido com interação B7-1/CD80 e B7-2/CD86 das APCs com CD28 em células T. O terceiro sinal é a somatória desses dois sinais que resulta na produção de IL-2 e sua ligação ao seu receptor (CD25) resultando na proliferação clonal das células T (SNANOUDJ *et al.*, 2007).

2.1 Complexo principal de histocompatibilidade

Após a transplantação do órgão, o sistema imune do receptor começa a reconhecer os aloantígenos, isto é, os antígenos de histocompatibilidade maiores e menores. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizado no cromossomo 6 em seres humanos, codifica os antígenos leucocitários humanos (HLA), que são muito polimórficos e responsáveis pela ativação das respostas imunes contra os aloenxertos. Os antígenos leucocitários humanos são classificados como MHC de classe I (HLA-A, -B, -C) e MHC de classe II (HLA-DR, -DP, -DQ). As moléculas de MHC estão localizados na superfície das células apresentadoras de antígenos e tem um papel fundamental no curso da rejeição, porque elas interagem com o receptor de célula T (TCR) apresentando o peptídeo que estão alojados em seu sulco (Figura 2) (BARKER *et al.*, 1968; BRAUN *et al.*, 1993; JAMESON *et al.*, 1995; STARR *et al.*, 2003; INGULLI *et al.*, 2010; HASKOVA *et al.*, 2003;).

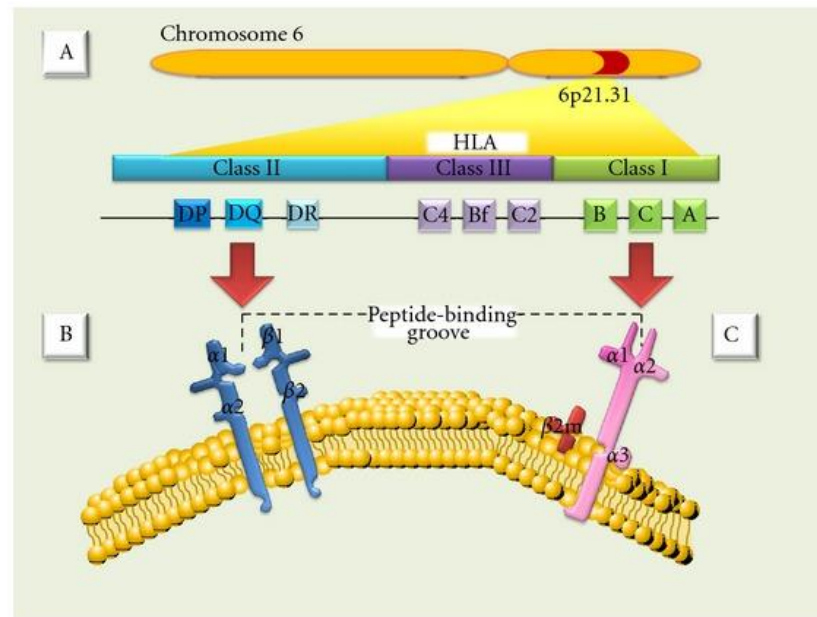


Figura 2: Complexo principal de histocompatibilidade: (A) MHC (complexo principal de histocompatibilidade). (B) Antígenos de Classe II. (C) Os antígenos MHC de classe I (AYALA GARCÍA et al., 2012).

2.2 Vias de aloreconhecimento

O reconhecimento de antígenos alogênicos pelo sistema imunológico é o processo principal que induz a rejeição que depende da ativação dos linfócitos T. Esses linfócitos T através do seu TCR detectam polimorfismos de aminoácidos em moléculas de MHC e/ou nos peptídeos ligados a eles. As características de especificidade e memória da resposta de rejeição ao doador está definida pela interação MHC-TCR (LAKKIS *et al.*, 2018). Considera-se três vias de reconhecimento alogênico: direta, indireta e semi-direta.

2.2.1 Via direta de aloreconhecimento de antígeno

Na via direta de aloreconhecimento as células T reconhecem as moléculas de MHC I ou II intactas presentes na superfície das APCs do doador (Figura 3). As APCs presentes no enxerto, ao receberem sinais inflamatórios como estímulos via Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o estímulo do CD40, migram para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam os aloantígenos para as células T virgens do receptor, e são capazes de provocar uma resposta robusta contra o aloenxerto resultando em rejeição (JAMESON *et al.*, 1995; BARKER *et al.*, 1968, BRAUN *et al.*, 1993,

GRANDJEAN *et al.*, 2003; STARR *et al.*, 2003; HASKOVA *et al.*, 2003; INGULLI *et al.*, 2010; SAGOO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2016).

Com o tempo estas células APCs do doador se esgotam e as APCs receptoras que migram para o enxerto captam os aloantígenos e começam a apresentar às células T por via indireta (INABA *et al.*, 1998; STEINMAN *et al.*, 1997; INGULLI *et al.*, 2010).

2.2.2 Via indireta de aloreconhecimento de antígeno

A via indireta de reconhecimento inicia com ativação das células T através do reconhecimento dos aloantígenos processados e associados às moléculas de próprias de MHC nas APCs (Figura 3). Postula-se que existam três mecanismos envolvidos nessa via: os aloantígenos podem, através da corrente sanguínea, chegar aos tecidos linfóides secundários e ser englobados e processados pelas APCs do receptor; as células do doador também podem migrar para os tecidos linfóides e ser capturadas e processadas pela as APCs do receptor ou ainda as APCs do receptor podem migrar para o enxerto, fagocitar os aloantígenos e os apresentar para as células T e ativá-las. (LOMBARDI *et al.*, 1991; INGULLI *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2017).

Esta via de aloreconhecimento é oligoclonal e dependente de um conjunto restrito de células T que exibem um repertório específico de TCRs e desempenha um papel importante na rejeição tardia e crônica. Acredita-se que a frequência de células T indiretas contra um dado alopeptídeo é semelhante a qualquer peptídeo nominal apresentado pela via canônica em uma porção $< 1/100\ 000$ (ALEGRE *et al.*, 2016; YANG & SARWAL; 2017).

2.2.3 Via de aloreconhecimento semidireta

No aloreconhecimento semidireto, as APCs do receptor adquirem moléculas de MHC classe I e/ou classe II do doador intactas e apresentam às células T (Figura 3) (MARKEY, *et al.*, 2014; MARINO *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2017; MORELLI *et al.*, 2017). Vários estudos já mostraram que os leucócitos trocam moléculas, como RNA e proteínas, incluindo proteínas de membrana, por contato célula-célula (trogocitose) (QURESHI *et al.*, 2011, FERRER *et al.*, 2014; MARINO *et al.*, 2016), nanotubos (MARINO *et al.*, 2016), ou pela liberação de exossomos (vesículas extracelulares) (THÉRY *et al.*, 2002; MARINO *et al.*, 2016). Quando a troca envolve o MHC, esse fenômeno é referido como cross-dressing (MARINO *et al.*, 2016; GONZALEZ-NOLASCO *et al.*, 2018). Herrera e colaboradores 2004, demonstraram que células dendríticas do receptor pode exibir moléculas de MHC do doador podendo, assim, ativar células T aloespecíficas (HERRERA *et al.*, 2004).

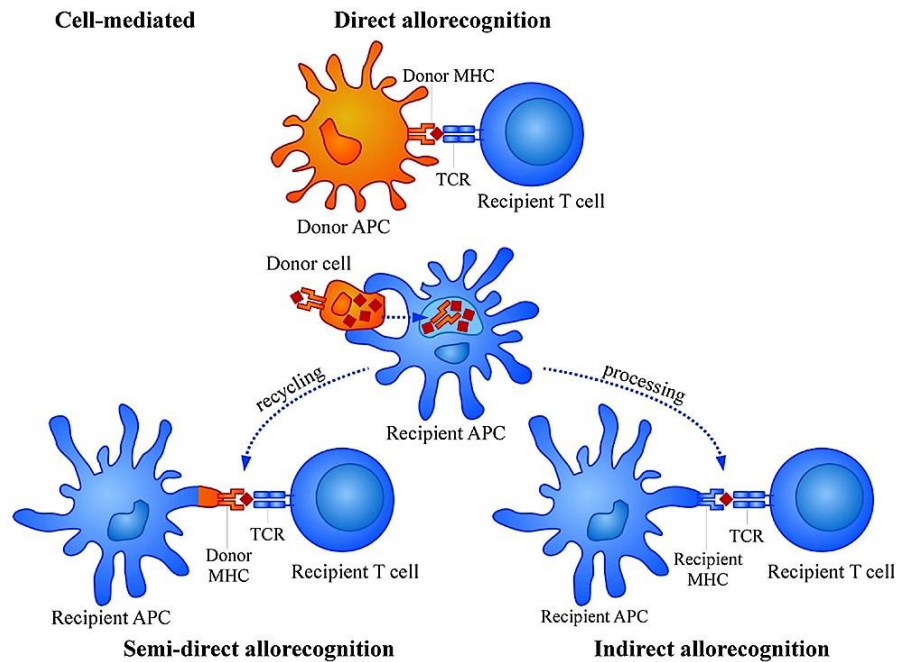


Figura 3: Mecanismos de alorechecimento direto, semidireto e indireto. Direto: as células T reconhecem moléculas do MHC doadoras intactas na superfície das APCs do doador. **Indireta:** as moléculas de MHC doadoras são processadas e apresentadas como peptídeos por moléculas de MHC receptoras. **Semi-direto:** as moléculas de MHC doadoras intactas, são transferidas para as APCs receptoras e apresentadas as células T receptoras (MONGUIÓ-TORTAJADA *et al.*, 2014).

3 CÉLULAS ENVOLVIDAS NA IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE

3.1 Células T

Células T aloreativas são as células que reconhecem moléculas de MHC doadoras intactas na superfície de células doadora, peptídeos derivados das moléculas do MHC alogênico ou ainda de proteínas de MHC ou não-MHC polimórficas apresentadas por moléculas de MHC própria (HERRERA *et al.*, 2004; ALEGRE *et al.*, 2016). A quantidade de clones de células T que reagem a aloantígenos em um determinado receptor, depende da variedade das disparidades nos alelos de MHC entre o doador e o receptor reconhecidas pelas células T do receptor. (BAXTER-LOWE *et al.*, 2009 ALEGRE *et al.*, 2016)

As células T CD4⁺ executam funções importantes na proteção imunológica através de sua capacidade de auxiliar as células B a produzirem anticorpos, induzir macrófagos a aumentar a atividade microbicida, recrutar neutrófilos, eosinófilos e basófilos para locais de infecção e inflamação e, através de sua produção de citocinas e quimiocinas, orquestrar um arsenal de respostas imunes efetoras (ZHU, *et al.*, 2008). Compreender melhor os subconjuntos de células T CD4⁺ que estão envolvidos nas respostas de rejeição ao aloenxerto é extremamente importante para o desenvolvimento de terapias eficazes para a indução da tolerância ao transplante clínico (LIU, *et al.*, 2013).

3.2 Células apresentadoras de antígenos

As células dendríticas são células apresentadoras profissionais de antígeno responsáveis pela ativação das células T. Elas apresentam peptídeos antigênicos através das moléculas de MHC ao receptor de células T (TCR) e fornecem sinais co-estimulatórios necessários para induzir a proliferação e diferenciação de células T (LIU & NUSSENZWEIG, 2010; ZHUANG *et al.*, 2016; (GEISSMANN *et al.*, 2010; MORELLI; 2014; ALEGRE *et al.*, 2016 OCHANDO *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2016).

Em uma fase posterior, as células dendríticas originadas dos monócitos do sangue (mono-DCs), participam reapresentando o aloantígeno do doador e induzindo assim a expansão das células T efetoras dentro do aloenxerto e as DCs plasmocitóides têm sido implicadas na tolerância ao transplante (ZHUANG *et al.*, 2016; OCHANDO *et al.*, 2016). Uma única célula dendríticas do receptor é capaz de apresentar simultaneamente alopeptídeos do doador acoplados em moléculas de MHC próprias para células T CD4⁺ (via indireta), e moléculas de MHC intactas do doador para ativar as células T CD8⁺ ou células T CD4⁺ aloreativas através da via direta (ALEGRE *et al.*, 2016).

4 TIPOS DE REJEIÇÕES DE ENXERTO

A rejeição do enxerto é classificada com base em achados histopatológicos ou de acordo com o tempo de transplante:

4.1 Rejeição hiperaguda

A rejeição hiperaguda é o tipo clássico e exuberante de rejeição mediada por anticorpos, tendo início minutos ou horas depois da transplantação, logo após o órgão ou tecido estabelecer uma conexão vascular com o receptor. Uma característica dessa rejeição é oclusão trombocítica minutos ou horas após a anastomose entre os vasos sanguíneo do enxerto e do receptor. A resposta imune aos vasos sanguíneos é mediada por grandes quantidades de anticorpos preexistente no receptor contra o sistema ABO ou MHC que tem capacidade de se ligarem aos antígenos endoteliais do doador, ativarem o sistema complemento e juntos induzirem inúmeras alterações no endotélio levando a trombose intravascular (ROCHA *et al.*, 2003).

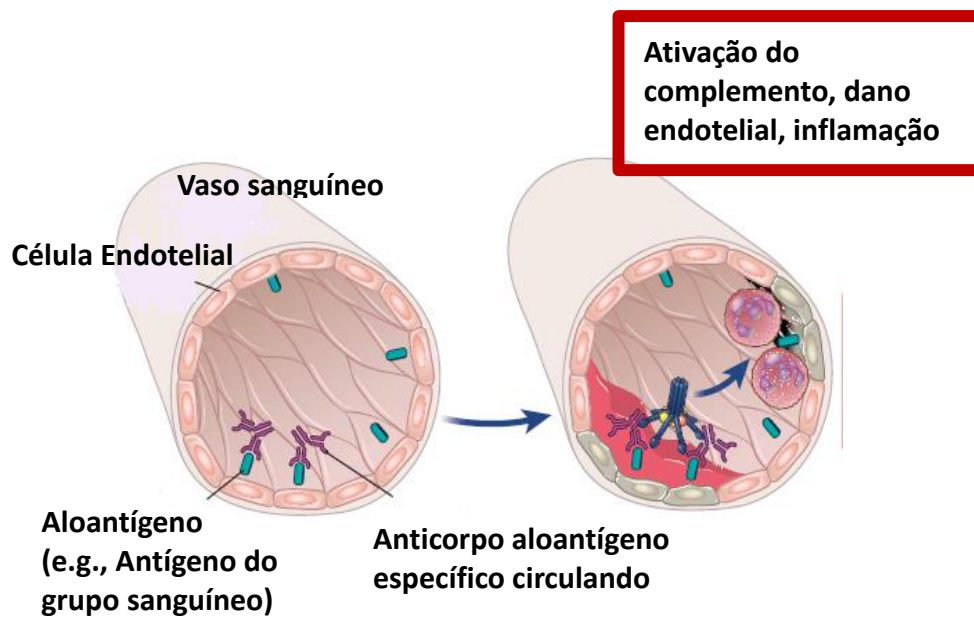


Figura 4: Rejeição hiperaguda: o complemento é ativado por anticorpos pré-formados reativos ao endotélio vascular. Promoção de trombose intravascular rápida e necrose da parede do vaso (ABBAS 2018).

4.2 Rejeição aguda

A rejeição aguda é vista como um processo mediado por células T respondedoras (ROCHA *et al.*, 2003). Após ativação das células T virgens pelas APCs do doador, elas se diferenciam em células T efetoras e migram para o enxerto e começam a mediar inflamação local através da secreção de citocina ou secreção de quimiocinas ou mesmo lise celular pela ação de linfócitos T CD8+, o que pode levar a necrose do enxerto. As células T também podem estimular as células B a iniciar a rejeição aguda humoral, e ativar outras células, como macrófagos ou neutrófilos (Figura 5) (STEELE *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2011).

4.3 Rejeição crônica

Este subtipo de rejeição tem sido considerado atualmente a principal causa de falha de enxerto, apresentando aglomerado de células como fibroblasto, células endoteliais ou proliferação de células epiteliais e deposição de colágeno no enxerto e nos vasos sanguíneos, resultando em fibrose intersticial, isquemia e perda da função do enxerto (RACUSEN *et al.*, 2002; INGULLI *et al.*, 2010). Várias alterações patológicas podem ser reconhecidas no aloenxerto no curso da rejeição crônica, incluindo o espessamento da íntima arterial com duplicação da elastina interna e hialinose arteriolar (RACUSEN *et al.*, 2002; SOLEZ, K. *et al.*, 2007, OLSON, 1998). A rejeição crônica se inicia quando as células APCs do doador presentes no enxerto começam a ser substituídas pelas APCs do receptor ativando uma resposta

adaptativa especialmente pela via indireta de reconhecimento (Figura 5) (AUCHINCLOSS *et al.*, 1993; SUCIU-FOCA. *et al.*, 1995; VELLA *et al.*, 1997). Nesta etapa as células T do receptor que foram ativadas pelas células APCs do doador não podem danificar diretamente as células parenquimatosas do enxerto, mas penetram no enxerto e causam danos produzindo citocinas do tipo Th1 (IFN γ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) ou outros mediadores solúveis (CHAN *et al.*, 1995; SHIRWAN *et al.*, 1998).

Para evitar a rejeição do enxerto, estratégias profiláticas e terapêuticas são aplicadas usando terapia imunossupressora. O uso de drogas imunossupressoras é muito importante para controlar ou evitar a rejeição (SAGOO *et al.*, 2011; SAGOO *et al.*, 2012; MEIER-KRIESCHE *et al.*, 2004, LODHI *et al.*, 2011). Entretanto, embora a imunossupressão reduza a incidência de rejeição aguda do enxerto, ela infelizmente não impede que processos imunológicos de rejeição crônica (aloeatividade contra o enxerto), sejam ativados e que ocorra falência do aloenxerto (DE SERRES *et al.*, 2009). Ademais, o uso contínuo de imunossupressores gera diversas consequências como toxicidades (WOOD & SAKAGUCHI, 2003; WELLS *et al.*, 2001), aumento da susceptibilidade a infecções, reincidência ou aparecimento primário de tumores, disfunção renal e cardíaca, além de distúrbios metabólicos (MEIER-KRIESCHE *et al.*, 2004; SAGOO *et al.*, 2012; SCOTTÀ *et al.*, 2016; TODO *et al.*, 2016).

Para o tratamento da rejeição crônica, o retransplante ainda é o tratamento padrão, mas a escassez de órgãos tem induzido pesquisas de novas terapias para promover tolerância nos receptores melhorando a recuperação do estado clínico e evitando a rejeição do enxerto. Um grande desafio no transplante para evitar a rejeição é encontrar uma maneira de induzir tolerância específica ao aloenxerto em receptores, promovendo a função do enxerto de forma estável a longo prazo, na ausência de imunossupressores.

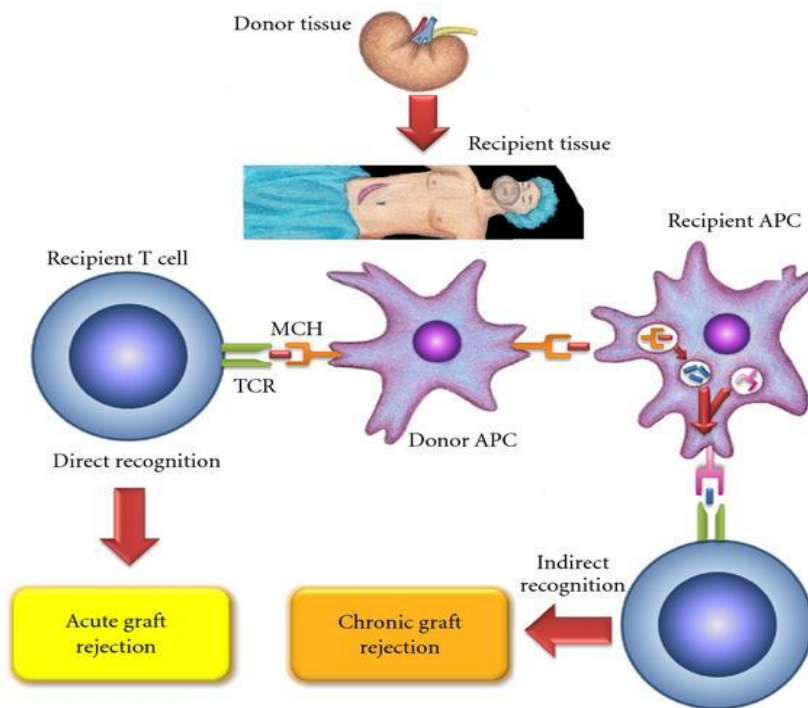


Figura 5: Rejeição Aguda e Crônica: Rejeição aguda mediada aloreconhecimento direto e rejeição crônica mediada por aloreconhecimento indireto (AYALA GARCÍA et al., 2012)

5 TOLERÂNCIA PERIFÉRICA E OPERACIONAL

A tolerância ao transplante pode ser definida como a ausência de uma resposta imune prejudicial específica ao antígeno (alo) sem a necessidade de imunossupressão exógena e com uma resposta intata a outros antígenos (FAN, et al., 2011).

Na tolerância periférica, as células T maduras que reconhecem antígenos próprios dos tecidos periféricos tornam-se incapazes de responder a esses antígenos através de mecanismos como processos de deleção por morte celular apoptótica, anergia (não responsividade funcional), sequestro de antígenos ou ignorância imunológica e processos de regulação ativa mediados por linfócitos T reguladores (Tregs) (LIU *et al.*, 2006; VIGNALI *et al.*, 2008; SAGOO *et al.*, 2012, HIPPER *et al.*, 2011, LOMBARDI *et al.*, 2011).

A tolerância operacional clínica é definida como função estável e aceitável do enxerto sem imunossupressão por anos. Este estado de falta de resposta imune ao enxerto é induzido no indivíduo transplantado através da regulação negativa ou desvio da resposta pró-inflamatória promovendo a manutenção da função estável do aloenxerto após transplante mesmo na ausência de imunossupressores. Acredita-se que deleção, anergia e regulação através da supressão sejam os principais mecanismos associados à tolerância operacional no alotransplante e células T reguladoras que propiciam uma maior indução e manutenção da tolerância, constituindo alvo

importante de estudo para terapia associada a indução de tolerância operacional. (ROUSSEY-KESLER *et al.*, 2006; BRAZA *et al.*, 2015).

6 MECANISMOS DE SUPRESSÃO MEDIADOS POR CÉLULAS TREGS

6.1 Células T reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) constituem 1 a 5% do total das células T CD4⁺ e são identificadas em humanos pela expressão de marcadores de superfícies como CD25^{hi}, CD127^{low} e FoxP3⁺ (Forkhead box P3) (VIGNALI *et al.*, 2008; SAGOO *et al.*, 2011). Como o nome sugere, as células Tregs suprimem a resposta imune e exercem essa sua função através de produção de citocinas supressoras, supressão direta de células efetoras e modulação da maturação e função das células apresentadoras de antígenos. Podem ser classificadas de acordo com a sua origem como células T reguladoras naturais (nTregs) e induzidas (iTregs). As T reguladoras naturais (nTregs) sofrem diferenciação e amadurecimento no timo após apresentação de auto-antígeno por células epiteliais do timo. As Tregs induzidas (iTregs) são geradas na periferia após encontrar antígeno autônomo ou estrangeiro (DE SERRES *et al.*, 2009; WORKMAN *et al.*, 2009). Além da expressão de FoxP3, células Tregs expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da interleucina-2 (CD25) em um muito nível elevado (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

Durante a fase tardia da resposta inflamatória, as células Tregs são ativadas, proliferam, migram e se acumulam no local da inflamação, para promover a restauração da homeostase imunológica nos tecidos acometidos. Para isso ela se utiliza de um conjunto de mecanismos efetoras potentes, que inclui receptores inibitórios (e.g. CTLA-4, GITR, LAG-3, CD200, PD-1, etc), citocinas imunossupressoras (IL-10, IL-35, TGF- β), ATPases de superfície celular, granzimas que induzem apoptose de células apresentadoras de antígeno, dentre outros que serão detalhados à frente. Na promoção da tolerância no transplante, as células T reguladoras são essenciais e possuem uma eficácia terapêutica bem estabelecidas em modelos animais (TANG & BLUESTONE, 2013).

A modulação imunológica pelas células Tregs ocorre através de múltiplos mecanismos: elas promovem a inibição da função ou maturação das células apresentadoras de antígenos (APCs) através das suas moléculas de superfície CTLA-4 que se ligam às moléculas de CD80/CD86 nas APCs impedindo sua função co-estimuladora (GREGORI *et al.*, 2012); destroem células T CD4⁺ por apoptose através da privação de triptofano por estimular aIDO nas APCs (COBBOLD *et al.*, 2009); provoca desordens no metabolismo das células Teff através da via de conversão de ATP em adenosina via CD39/CD73 (DEAGLIO *et al.*, 2007);

secretam citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (MARIE *et al.*, 2005); depletam IL-2 do microambiente, citocina importante para induzir proliferação, diferenciação e sobrevivência das células Teff (figura 5) (BOPP *et al.*, 2007; SAKAGUCHI *et al.*, 2009; QURESHI *et al.*, 2011; HÖFER *et al.*, 2012; PALLOTTA *et al.*, 2011; TAI, *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016).

6.1.1 Modulação da maturação e função das células apresentadoras de antígenos (APCs).

Além de agir nas células T efectoras, as células Tregs promovem também inibição da função e maturação das células apresentadoras de antígenos (APCs) (GREGORI *et al.*, 2012). Além disso, o CTLA-4 pode promover a transendocitose de seus ligantes CD80/CD86 (Figura 2) expressos em APCs diminuindo seus níveis na superfície das APCs (FERRER *et al.*, 2014). A trogocitose é outro mecanismo no qual as Tregs podem remover as moléculas de superfície através da sinapse imunológica com as células apresentadoras de antígenos, regulando negativamente a expressão de CD80 e CD86 (QURESHI *et al.*, 2011; FERRER *et al.*, 2014; SHEVACH, 2009). A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) possui propriedades imunológicas reguladoras através do catabolismo do aminoácido triptofano que é essencial para divisão celular e ativação das células T efectoras (PALLOTTA *et al.*, 2011; JEFFERY *et al.*, 2016). O catabolismo do triptofano em quinurenina desencadeia processos de inibição e apoptose que resultam na supressão da proliferação das células T (Figura 5) (MUNN *et al.*, 2004; COBBOLD *et al.*, 2009; GROHMANN *et al.*, 2010; WING & SAKAGUCH, 2010).

As células Treg também podem inibir a maturação das APCs através do gene de ativação de linfócitos-3 (LAG3 ou CD223), uma proteína transmembranar relacionada com o receptor CD4 expresso em células T reguladoras que se liga à MHC II em APCs (SHEVACH, 2009). Liang e colaboradores (2008), mostraram em seu estudo que durante as interações Treg:DC, a ligação de LAG-3 com o MHC de classe II inibe a ativação da DC, induzindo um sinal inibitório, que promove supressão da capacidade de co-estimulação e maturação das APCs (LIANG, *et al.*, 2008; SHEVACH, 2009).

6.1.2 As células T reguladoras também podem regular a função de células T efectoras através da via de conversão de ATP em adenosina

A conversão de trifosfato de adenosina (ATP) ou difosfato de adenosina ADP em monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina, respectivamente, pela ação das ATPases CD39 e CD73 contribuem de forma importante para a inibição da resposta inflamatória no enxerto (Figura 5) (BORSELLINO *et al.*). CD39 é a ectoenzima expressa por células B, DCs e

especialmente Tregs (BOURS *et al.*, 2006; BORSELLINO *et al.*, 2007). Esse receptor age juntamente com CD73 para produzir adenosina que induz efeitos inibitórios e antiproliferativos, removendo estímulos pró-inflamatórios como o ATP e ADP extracelulares (MIZUMOTO *et al.*, 2002; BORSELLINO *et al.*, 2007; SHEVACH, 2009)

6.1.3 Imunossupressão das células T através da secreção ou depleção de citocinas e de mecanismos indutores apoptose.

As citocinas TGF- β , IL-35 e IL-10 são responsáveis pela manutenção da expressão de FoxP3, função reguladora, homeostase periférica e suprimem as células Teff impedindo sua proliferação. O TGF- β é uma citocina imunossupressora com funções pleiotrópicas, amplamente expressa por várias células. A Repetições Predominantes Glicoproteína A (GARP) transporta e ancora o TGF- β latente na superfície de Tregs. A liberação do TGF- β do complexo TGF- β /GARP pela atividade da integrina, promovendo assim alta concentração de TGF- β que atua nas células alvo e aumentar a função supressora das Tregs (Figura 5) (YAMAGUCHI *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2016).

Assim, o TGF- β da superfície celular está presente em alta concentração nas Tregs e contribui para a atividade supressora. O TGF- β tem um papel vital na indução e manutenção da expressão de Foxp3, diferenciação de células T virgens em células Foxp3⁺ na periferia e potencialização da função supressora dessas células (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

As células Tregs expressam constitutivamente CD25, que é o receptor de alta afinidade de IL-2, e através desse mecanismo prejudicam a ativação e expressão das células T por depletarem IL-2 do microambiente (BUSSE *et al.*, 2010; YAMAGUCHI *et al.*, 2011). As células Tregs também podem induzir diretamente a apoptose de células T através da produção de granzimas (A e B) e perforina (GONDEK *et al.*, 2005), do ligando indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) da via do ligante Fas/Fas (VERMIJLEN *et al.*, 2001), da via da galectina-9/imunoglobulina de células T e do domínio de mucina-3 (TIM-3) (SILVA *et al.*, 2017), ou com a produção de galectina-1 produzir efeitos apoptóticos nas células T (Figura 5) (SAFINIA *et al.*, 2015).

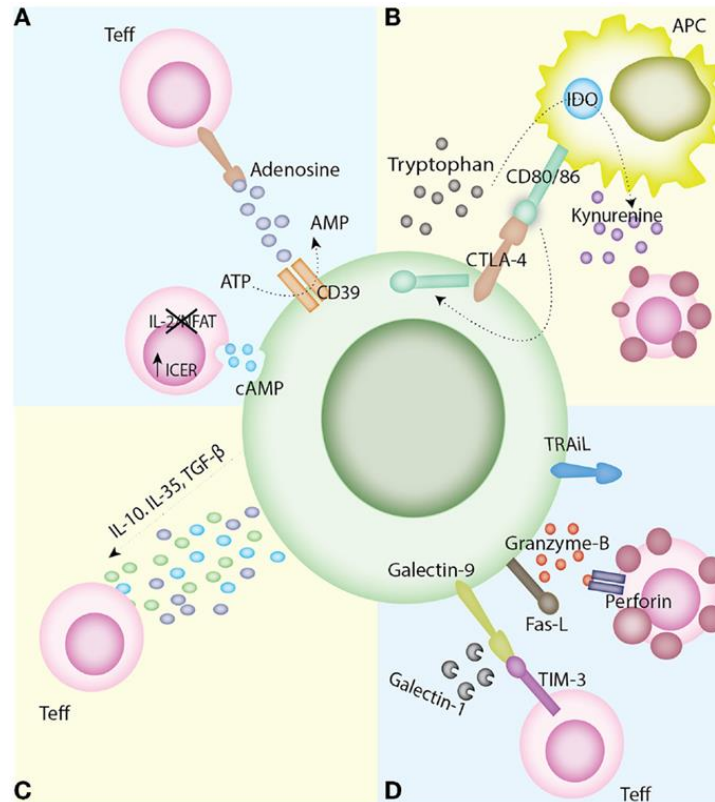


Figura 6: Mecanismo de imunossupressores da célula T reguladora. A) inibição das vias metabólicas através de CD39 e CD73. (B) Modulação da maturação e função da APC. (C) produção de citocinas anti-inflamatórias. (D) Indução de apoptose. (SAFINIA *et al.*, 2015).

Verificou-se também que as Treg expressam níveis elevados de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intracelular, que pode ser transferido para células T efetoras através de junções comunicantes levando a regulação positiva de repressor precoce de cAMP indutível (ICER) e, por sua vez, à inibição da transcrição do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e IL-2, que pode culminar com apoptose pela privação de IL-2 (Figura 6) (SAFINIA *et al.*, 2015).

Células T reguladoras também expressam um receptor de semaforinas de classe II e coreceptor para fator de crescimento endotelial denominado neuropilina (Nrp1). A Nrp-1 quando expressada, promove interações duradouras entre as células Treg e as DCs imaturas, promovendo a supressão da proliferação das células Teffs (SHEVACH, 2009).

Todos os mecanismos citados anteriormente podem levar a deleção, a anergia e a regulação das células T efetora alo-específicas e estão associados à tolerância operacional no transplante (ROUSSEY-KESLER *et al.*, 2006; BRAZA *et al.*, 2015). Estudos com paciente tolerantes operacionais, revelaram que nestes pacientes há um aumento na frequência de células T reguladoras que estão envolvidas com a indução e manutenção da tolerância, sendo assim um alvo importante de estudo para terapia associada a indução de tolerância operacional (BRAZA

et al., 2015). O desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs) como novas terapias é, portanto, baseado na necessidade de uma alternativa ao atual tratamento clínico de receptores de transplantes (SAGOO et al., 2011). Hoje sabe-se que as células T reguladoras humanas podem ser identificadas, isoladas e expandidas em culturas *ex vivo* a curto prazo, possibilitando assim o desenvolvimento de produto terapêutico eficaz, seguro e em doses relevantes (TANG & BLUESTONE, 2013).

7 TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS T REGULADORAS

Uma terapia celular que usa transferência adotiva de células T reguladora (Treg) CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{low} FoxP3⁺ como estratégia de indução de tolerância operacional tem sido alvo de estudos em vários modelos de transplantes (TODO *et al.*, 2016). Uma análise da regulação da aloreatividade da via direta em receptores de transplantes de fígado tolerantes sugeriu que a função da Treg específica ao aloantígeno do doador em conjunto com outros mecanismos pode favorecer a sobrevivência do enxerto de fígado (YOSHIZAWA *ET AL.*, 2005). Acredita-se que o uso da terapia com Treg, como evidenciado por estudos clínicos e experimentais, pode ser uma promessa para a indução de tolerância operacional (SAGOO et al., 2012). Porém, os mecanismos imunorreguladores desempenhados pelas diferentes populações de células Tregs ainda necessitam ser elucidados para biossegurança do paciente e potencialização dos efeitos.

O uso de drogas imunossupressoras é muito importante para controlar ou evitar a rejeição (SAGOO et al., 2011; SAGOO et al., 2012; MEIER-KRIESCHE et al., 2004, LODHI et al., 2011; SCOTTÀ *et al.*, 2016). Entretanto, vários estudos já foram realizados mostrando que alguns imunossupressores promovem uma ação negativa sobre a função das Tregs (SCOTTÀ *et al.*, 2016) e outros potencializam a sua função supressora e aumentam a sua frequência no sangue do receptor (DE SERRES *et al.*, 2009). Por exemplo, os inibidores da calcineurina (CNI) em camundongo inibem completamente a conversão *de novo* de Tregs específicas aos aloantígenos e em humanos inibem significativamente a expressão de mRNA de FoxP3 e diminuem os níveis de Tregs circulantes (BAAN *et al.*, 2005; SAN SEGUNDO *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2007; PASCUAL *et al.*, 2008; LEVITSKY *et al.*, 2009; DE SERRES *et al.*, 2009; SCOTTÀ *et al.*, 2016). Lim et al., 2007, em seu estudo com o Micofenolato de Mofetila, observaram que não houve expansão de células Tregs em ratos *in vitro*. Por outro lado, outros imunossupressores como a Rampamicina, Globulina anti-timócitos, Alemtuzumab e anti-IL-2R, mostraram ser indutores da expansão e potencializadores da função supressora das células Tregs (BATTAGLIA *et al.*, 2005; LOPEZ et al., 2006; COENEN *et al.*, 2006; DE

SERRES *et al.*, 2009; SCOTTÀ *et al.*, 2016). Assim, é de extrema importância o estudo detalhado do efeito dos agentes imunossupressores sobre a frequência e a função das Tregs em receptores de transplantes, e a escolha da combinação, tempo de uso e dosagem dos fármacos para o uso das células Tregs como terapia.

Uma abordagem detalhada da função das células T reguladoras neste contexto, permitirá atingir um entendimento amplo dos mecanismos moleculares na promoção de tolerância operacional e contribuir para o sucesso terapêutico. Portanto, o estudo funcional de células T reguladoras em uma reação mista de linfócitos (MLR, do inglês Mixed Lymphocyte Reaction) pode trazer informações importantes para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos na obtenção da tolerância operacional e no desenvolvimento de uma terapia celular promissora que seja eficaz e segura, a fim de evitar rejeição crônica de órgãos. Também é necessário determinar se a presença de drogas imunossupressoras afeta a capacidade supressora e a expansão das células T reguladoras.

8 JUSTIFICATIVA

O estudo sobre a imunologia de transplante poderá trazer grandes contribuições para o conhecimento dos mecanismos imunológicos que estão envolvidos na rejeição e tolerância de transplante. Uma abordagem detalhada da função das células T reguladoras neste contexto, permitirá atingir um entendimento amplo dos mecanismos moleculares na promoção de tolerância operacional e permitir o sucesso terapêutico. Portanto, o estudo funcional de células T reguladoras alogênicas (ou heterotípicas) e autólogas (ou homotípicas) durante a MLR pode trazer informações importantes para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos da rejeição e de desenvolvimento de uma terapia celular promissora que seja eficaz e segura, a fim de evitar rejeição crônica de órgãos.

9 OBJETIVO

Avaliar o potencial imunossupressor das células T reguladoras homotípicas ou heterotípicas em relação a célula apresentadora de antígeno (APC) sobre as células T efetoras em uma MLR.

9.1 Objetivos Específicos

1. Estabelecer um modelo in vitro para investigar a capacidade de células Tregs homotípicas ou heterotípicas à APCs em suprimir MLR.
2. Avaliar o efeito imunossupressor das células T reguladoras ativadas em várias proporções de número de células para a escolha da melhor condição a ser usada.
3. Verificar como as células T reguladoras homotípicas e heterotípicas alteram a produção de citocinas como Interferon- γ , IL-10, TNF- α no MLR.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 Doadores saudáveis

Para a realização deste estudo as PBMCs foram obtidas de 20 doadores saudáveis disparees recrutados na comunidade. Os critérios de inclusão para este estudo foram doadores acima de 18 anos que não tenham nenhum tipo de doença inflamatória que possa influenciar nos resultados obtidos e que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ver ANEXO). Esse projeto foi aprovado pelo CEP do Hospital Felício Rocho (CAAE: 77877417.9.0000.5125).

10.2 Isolamento das células mononucleadas do sangue periférico

As células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de 90 ml de sangue total heparinizado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque. Basicamente, foram usados tubos de prolipropileno de 50 ml, onde 20 mL de Ficoll-Paque foram utilizados para cada 30 ml de sangue total. Em seguida, foram centrifugados a 1100 por 40 minutos a 10-15° C, sem freios (Figura 3). Após centrifugação o plasma foi descartado e a camada referente a PBMCs foi coletada com cuidado e transferida para um segundo tubo de polipropileno, estéril, contendo 5-7 ml de PBS 1x e o volume foi completado para 50 ml e novamente as células foram centrifugadas à 1400 rpm por 10 minutos. As PBMCs foram lavadas mais duas vezes com meio RPMI completo. Ao final das lavagens, as células foram ressuspendidas em 1mL de RPMI completo para contagem de células vivas em câmara de Neubauer, utilizando azul de trypan 0,1% em PBS. As células foram acondicionadas em geladeira para separação das subpopulações como descritas no próximo item.

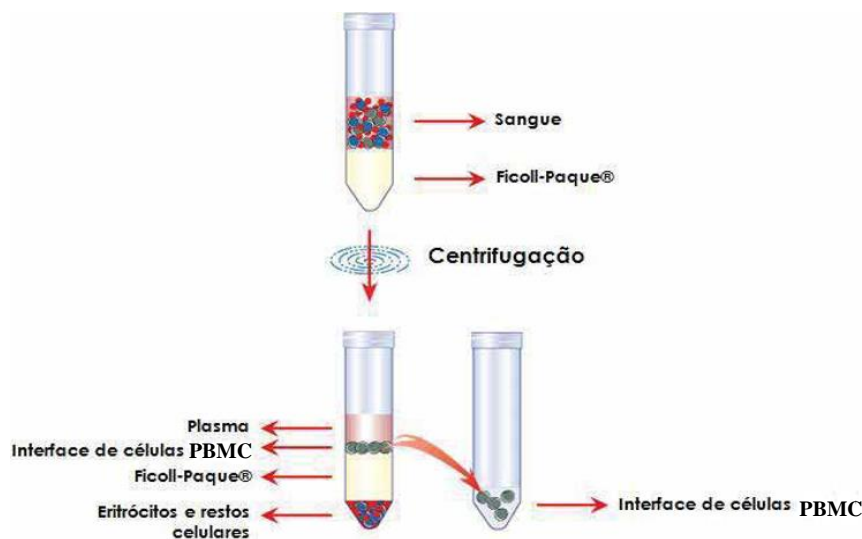


Figura 7: Processo de separação da porção células polimorfonucleares do sangue periférico. http://www.stemcell.com/product_catalog/rosettesep.asp

10.3 Purificação dos subconjuntos de células por FACS

A purificação das células T $CD4^+CD25^-$, células T reguladoras e células apresentadoras de antígenos foi realizada a partir de preparações de PBMCs de doadores díspares saudáveis (dois voluntários por vez), através da separação (Sorting) no citômetro FACS Aria II (BD) na Plataforma de Citometria do Instituto de Pesquisas René Rachou (FioCruz, Belo-Horizonte, MG). A marcação foi realizada *ex vivo* para células T $CD4$ (CD4 PercP), APCs (CD11c APC, CD14 APC) e Treg (CD4 PercP, CD25 PE, CD127 APC-Cy7), no gelo por 30 minutos e as células foram separadas conforme apresentado na **figura 7**. (Detalhes dos anticorpos ver ANEXO 4).

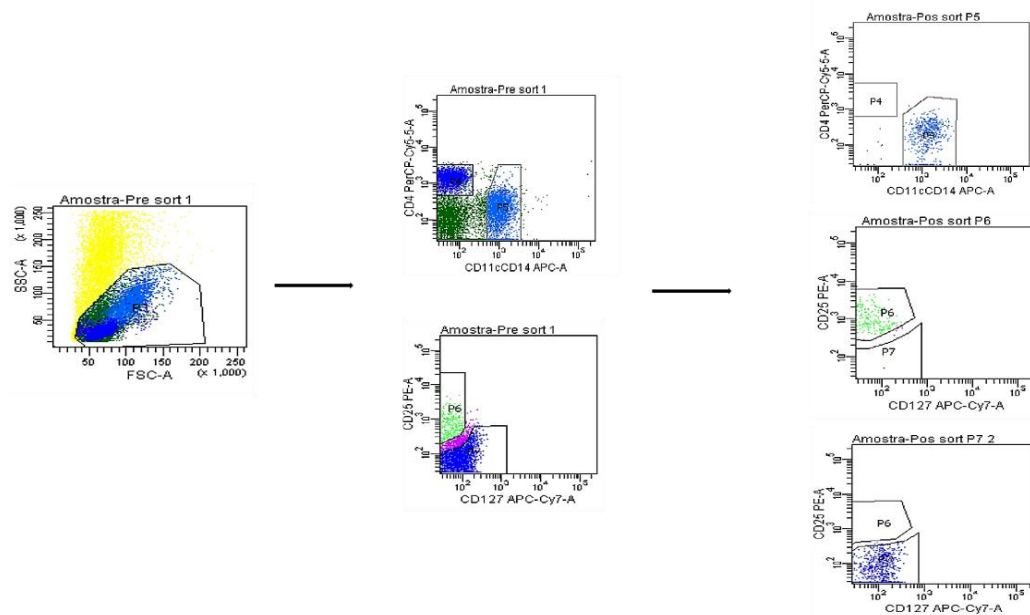


Figura 8: *Dot plot* representativo da estratégia de sorteamento das células APCs, T $CD4^+$ e Treg.

10.4 Reação Mista de Linfócitos *in vitro*

Para o MLR, $2,5 \times 10^4$ de células APCs (estimuladoras) do doador 1 foram incubadas com $1,0 \times 10^5$ células T $CD4^+$ marcadas com CFSE (respondedoras) do doador 2 (ou vice-versa) e células Tregs do doador 1 e 2, em diferentes proporções, foram adicionadas ou não a essas culturas, em placas de 96 wells com fundo em U (Figura 9). As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SBS (Soro Fetal Bovino) e 1% de penicilina e streptomicina e deixadas em cultura por 7 dias em estufa à 37°C , 5% CO_2 . A proliferação das células T $CD4^+$ foi avaliada pela diluição do CFSE por citometria de Fluxo no citômetro FORTESSA no Instituto René Rachou (Fio Cruz MG), Belo Horizonte.

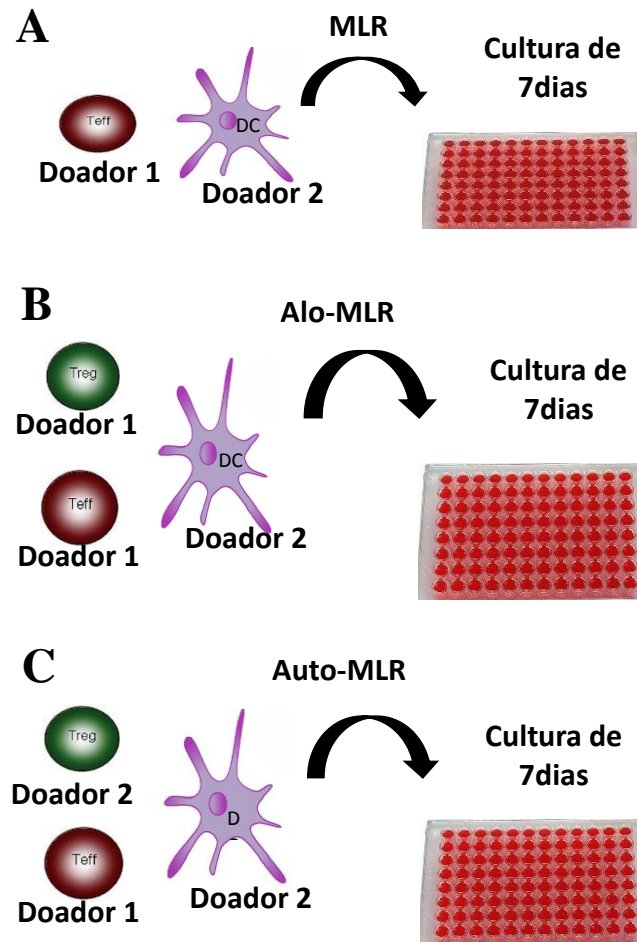


Figura 9: Esquema representativo da cultura mista de linfócitos (MRL) de 7 dias: A) MLR sem Treg. B) MLR com Treg alogênica. C) MLR com Treg autóloga.

10.5 Análise da proliferação por citometria

Após cultura por 4-7 dias, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para futuras dosagem de citocinas em ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram marcadas com anticorpos de superfície (CD3 PeCy7, CD4 AmCyAm) e intracelular (FoxP3) e a aquisição foi realizada no FORTESSA na Fio Cruz MG (Instituto René Rachu), Belo Horizonte. Nesta etapa verificou-se o índice de proliferação das Teff de acordo com a intensidade de fluorescência do CFSE. Células negativas para CFSE foram excluídas das análises por ser difícil diferenciar entre células que proliferaram ou Tregs não marcadas. Os dados de citometria de fluxo foram analisados pelo software FlowJo™ (**figura 10**).

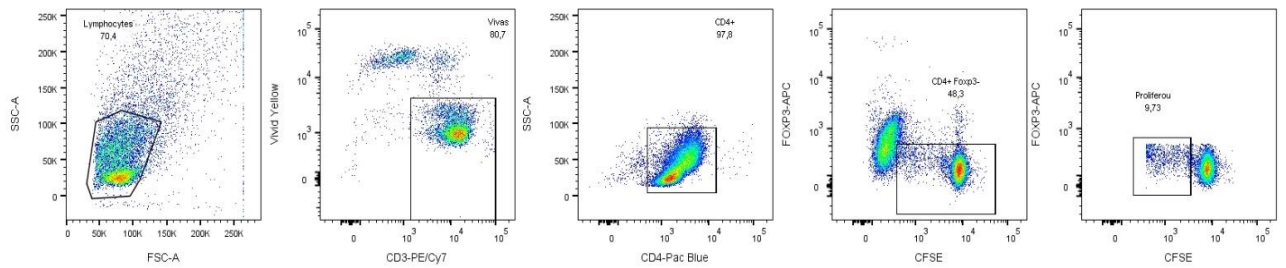


Figura 10: *Dot plot* representativo da estratégia de análise da proliferação de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ realizada no software FlowJo™. Detalhes explicados no texto.

10.6 Produção de Citocinas

A produção de citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF foi avaliada no sobrenadante das culturas celulares através de kits de ELISA comerciais (todos da Biolegend) conforme instruções do fabricante.

10.7 Análise Estatística

Os dados obtidos com os experimentos foram analisados pelo programa GraphPrism 6.0, considerando * indica $P < 0.05$ pelo Teste Wilcoxon pareado.

11 RESULTADOS

11.1 As células T reguladoras são capazes de imunossuprimir a proliferação de células T CD4⁺ em um MLR *in vitro*

As células T reguladoras inicialmente foram rastreadas para atividade supressora em MLRs. Após 7 dias de cultura, a proliferação de células T efetoras foi avaliada por citometria de fluxo. A estratégia de análise está descrita na figura 7, e basicamente, foi delimitação dos *singlets*, delimitação de linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade, análise apenas em células CD3⁺ CD4⁺ vivas. A proliferação celular foi realizada através da diluição de CFSE.

Nas figuras 11 e 12 está a representação gráfica do ensaio de proliferação de linfócitos T autólogas ou alogênicas à APC, em diferentes proporções de células T reguladoras (1:4:4; 1:4:2; 1:4:1; 1:4:0,5; 1:4:0,25; 1:4:0,012; 1:4:0,05 respectivamente). Pode-se observar que, ao adicionar as populações de Tregs alo e auto, observou-se a supressão da proliferação das células respondedoras.

A supressão das células respondedoras pode ser visualizada pela diminuição da fluorescência de CFSE nas análises dos resultados da citometria de fluxo (**figura 11**). Os focos de proliferação nas diferentes condições, inclusive na ausência de Tregs, podem ser visualizados na **figura 12**. Na **figura 12A** está representado a MLR na ausência de célula Treg, onde observou-se um alto grau de proliferação celular na cultura. No MLR na presença de célula Treg alogênica (**figura 12B**) e autóloga (**figura 12C**) pode-se observar uma diminuição da proliferação das células T CD4⁺. E ainda comparando MLR com Treg alo (**figura 12B**) com MLR com Treg auto (**figura 12C**), parece sugerir que as células Treg alogênicas possuem uma maior capacidade imunossupressora em um MRL *in vitro*.

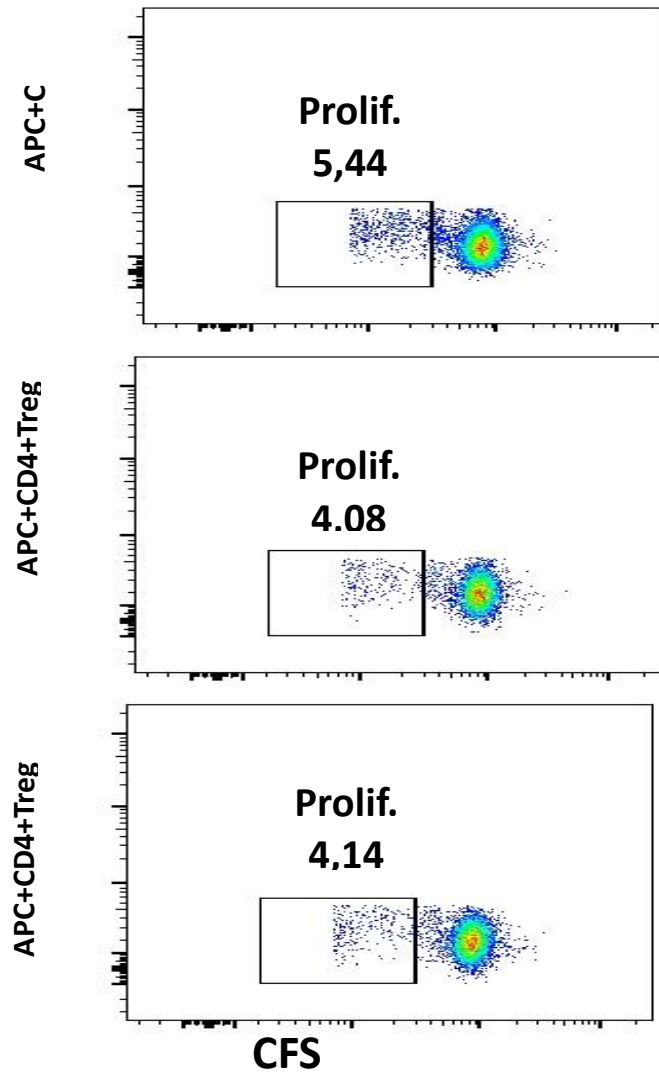


Figura 11: Análise da proliferação de linfócitos T CD4⁺ em um MLR por citometria de fluxo. *Dot plots* representativos da estratégia de análise utilizada. Após a delimitação dos *Singlets*, delimitação da população de linfócitos por tamanho e granulosidade, análise de linfócitos vivos (CD3⁺VIVID⁻), distinção de linfócitos CD4⁺, sequencialmente dentro dessa população usando o marcador intracelular FoxP3 e CFSE, pode-se delimitar células T CD4⁺FoxP3⁻ e dentro dessa subpopulação avaliar a proliferação das células T CD4⁺CFSE^{low}. A perda da fluorescência de CFSE foi considerada células proliferativas. A) MLR sem Tregs. B) MLR na presença de Treg alogênica. C) MLR na presença de Treg autóloga. A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.0 (Tree Stars Inc.).

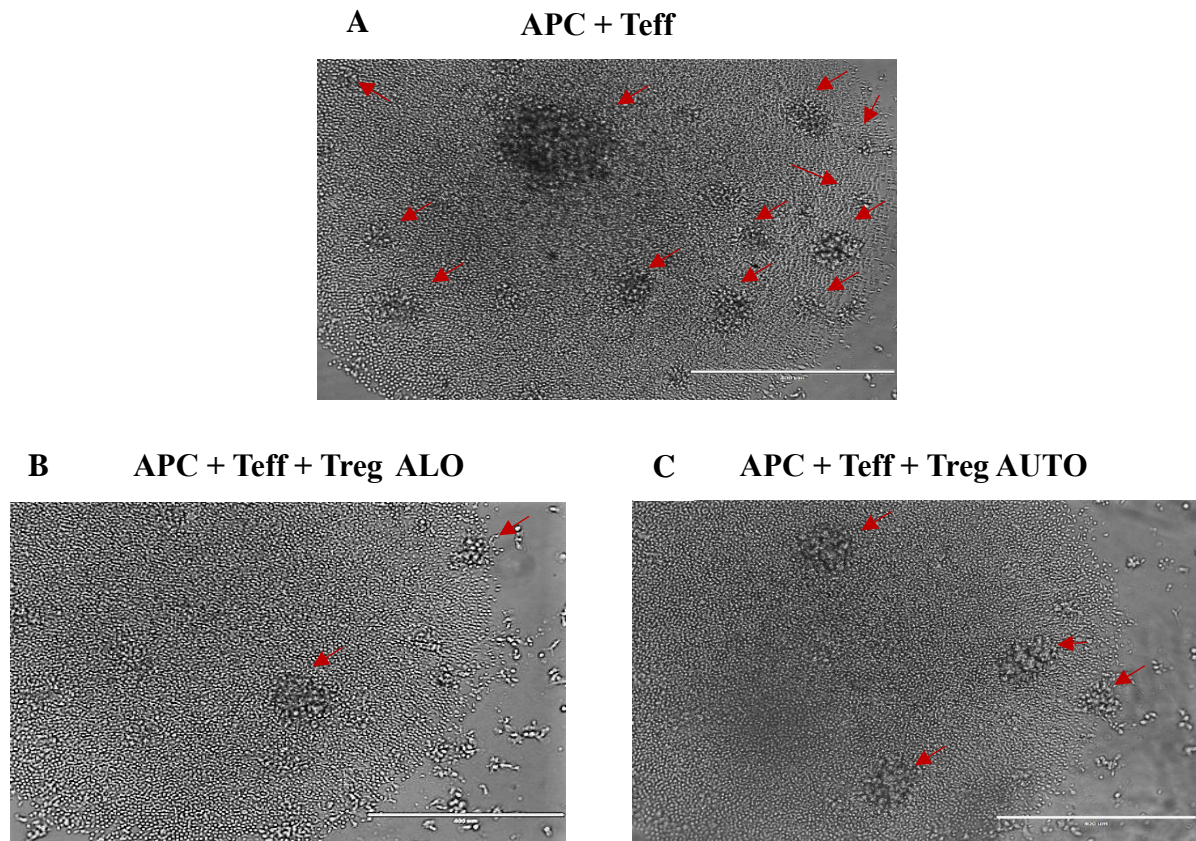


Figura 12: Foto representativa do ensaio de supressão da proliferação de linfócitos T CD4⁺ em um MLR. Os focos de proliferação estão indicados pelas setas vermelhas. A) Proliferação de células T CD4⁺ na ausência de células Tregs. B) Diminuição da proliferação células T CD4⁺ na presença de células Tregs alogênicas. C) Diminuição da proliferação células T CD4⁺ na presença de células Tregs autólogas. Foto adquirida no microscópio Thermo Fisher Scientific EVOS XL do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais UFMG.

11.2 As células T CD4⁺FoxP3⁺ alogênicas são melhores indutoras de supressão da proliferação em MLR.

Quando quantificamos a proliferação na ausência e presença de Tregs, observamos a capacidade supressora das células T CD4⁺FoxP3⁺ na proliferação das células T CD4⁺ no MLR (**Fig 13A**) comprovando a eficiência das células Tregs (CD4⁺CD127^{Low}CD25^{hi}) em suprimir a ativação da célula T CD4⁺ no MLR. Observou-se também que à medida que se diminui a concentração de células Tregs em relação às estimuladoras e respondedoras a porcentagem de proliferação aumentou. Por fim, não observamos que as Treg alo apresentaram melhor desempenho em inibir a proliferação das células T CD4⁺ quando comparado a Tregs auto na proporção 1:4:2 (APC:Teff:Treg) (**Fig 13 A e B**, p=0,06).

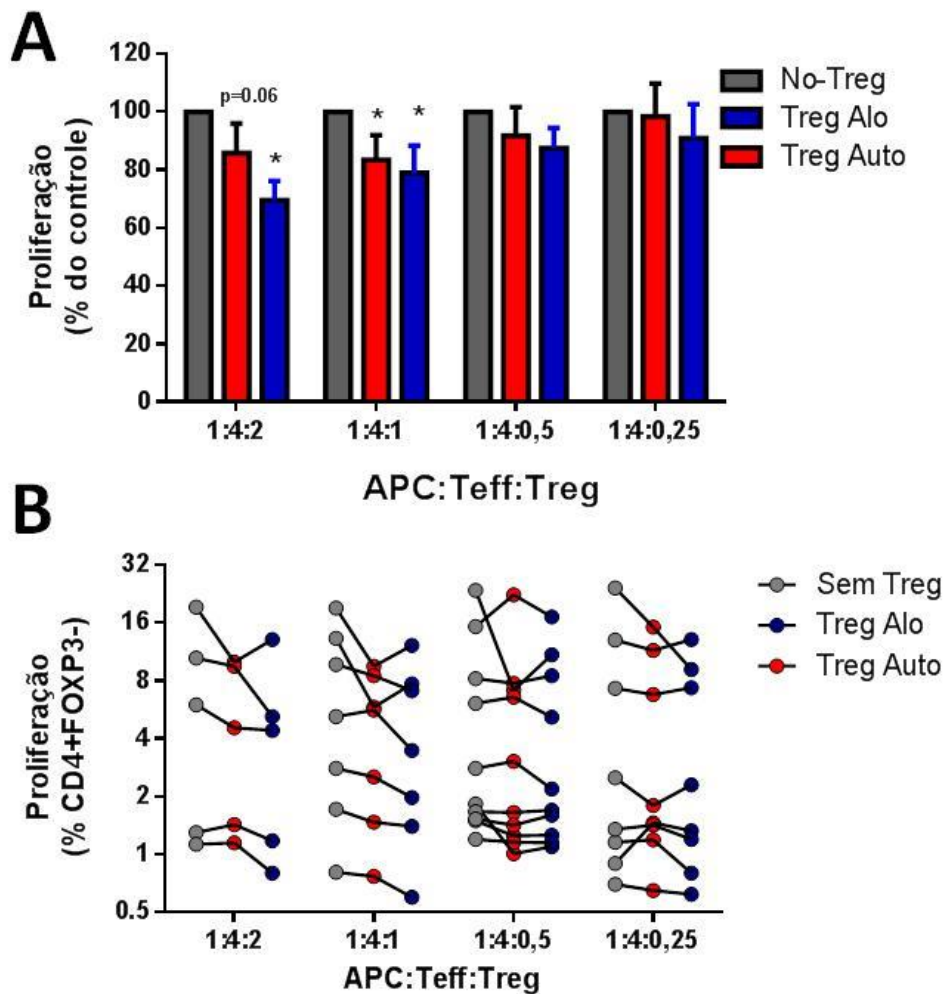


Figura 13: Análise do perfil de proliferação de células T CD4⁺ no MLR induzido por APCs na presença ou não de células T CD4⁺FoxP3⁺ alo e/ou auto. (A) Análise do percentual de células T CD4⁺ na co-cultura; (B) porcentagem de células CD4⁺FoxP3⁻ que proliferaram N= 5-8. * representa P<0,05 pelo Teste Wilcoxon pareado.

11.3 Células Tregs suprimiram a produção de IFN γ e TNF em MLR, mas não induziu secreção de IL-10

A secreção das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α e foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir de sobrenadantes coletados no 7^o dia de cultura (**Fig 14A**). Na figura A tem-se a representação da concentração de IL-10 produzida em cada grupo analisado e não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de IL-10. O mesmo resultado é visto quando comparamos a produção de IL-10 entre os grupos de Tregs alogênicas com as Tregs autólogas. Este resultado é consistente com o que foi visto Godfrey *et al.*, 2004, quando em seus experimentos avaliaram o mecanismo supressor efetivado pelas Tregs em um MLR (GODFREY *et al.*, 2004).

Observou-se na **Fig 13B** que a presença de Tregs, tanto autólogas como alogênicas, inibiram a produção de TNF na cultura quando em maiores proporções no MLR. À medida que se dilui a concentração das Tregs, elas perdem eficiência nessa regulação, embora a Treg alogênica apresente melhor desempenho em inibir a produção de TNF especialmente na proporção de 1:4:2 (APC:Teff:Treg) (**Fig 13B**).

Essa tendência torna-se ainda mais clara na dosagem de IFN- γ . Observa-se uma diminuição da concentração de IFN- γ no sobrenadante do MLR onde foram adicionadas células Treg alo e auto em comparação com o controle sem Treg (**Fig 13C**). Pode-se observar que as células Tregs alogênicas são mais eficientes do que as células Tregs autólogas em suprimir a produção de IFN- γ no MLR (**Figura 13C**). Essa redução significativa de IFN- γ é justificada pela diminuição da ativação e proliferação de células T CD4⁺ devido à presença das células Treg que promove mecanismos de supressão que modulam a interação entre APCs e células T CD4⁺.

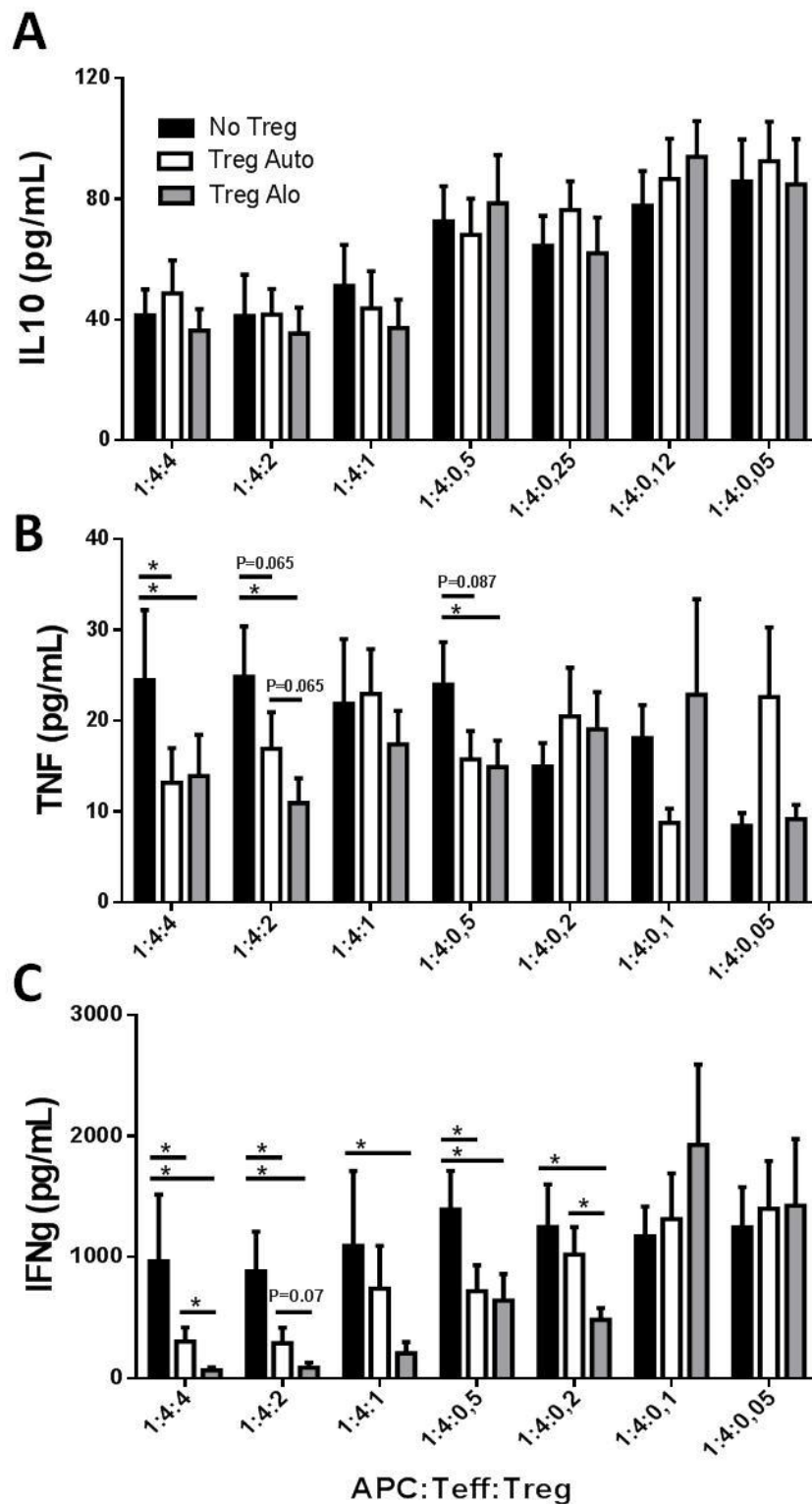


Figura 13 - Quantificação de citocinas IL-10 (A), TNF (B) e IFN- γ (C) por ELISA no sobrenadante de MLRs na presença ou ausência de Treg auto ou alo. APCs e células TCD4⁺ de doadores diferentes foram incubadas por 7 dias conforme descrito em M&M na presença de diferentes proporções de Tregs Auto (homotípicas às APCs) ou Alo (heterotípicas às APCs). O sobrenadante foi recolhido e usado para ELISA. N=8-20 por condição. * indica P<0.05 pelo Teste Wilcoxon pareado.

12 DISCUSSÃO

A rejeição de aloenxertos se inicia quando as células T receptoras reconhecem antígenos derivados do doador que, uma vez ativadas, passam por expansão clonal, diferenciam-se em células efetoras e migram para o enxerto, onde promovem a destruição do tecido (INGULLI, 2010). As APCs são potentes estimuladores das células T virgens através da apresentação de antígenos através do MHC classe I e classe II e de moléculas co-estimuladoras. Em um contexto de rejeição de transplantes, os aloantígenos são apresentados por APCs do doador ou receptor para as células T virgens que uma vez ativadas iniciam uma resposta aloimune que costuma ser excepcionalmente robusta, em parte devido à alta frequência de células T aloreativas. Estudos têm demonstrado que as células T $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}FOXP3^+$ estão envolvidas na tolerância específica ao enxerto após transplante de órgão sólido. Há dados que sugerem que Tregs específicas do enxerto são potencialmente mais imunossupressoras do que as Tregs poliespecíficas (WOOD *et al.*, 2012; FERRER *et al.*, 2014; TODO *et al.*, 2016). Essa constatação sugere que a indução de um grande número de Tregs aloespecíficas de grau clínico pode ser interessante do ponto de vista de tolerância.

Para analisar a função supressora de células T $CD4^+CD25^+$, um ensaio *in vitro* simples foi estabelecido em que células T $CD4^+CD25^+$ foram cultivadas com células T $CD4^+CD25^-$ e o grau de supressão foi avaliado medindo-se a proliferação de células culturas após estimulação antigênica na presença de APCs.

A reação mista linfocitária (MLR) é um processo complexo que envolve a participação de células com diferentes atividades funcionais e possui uma configuração confiável permitindo que o papel de cada célula individual seja facilmente determinado, incluindo o tipo de ativação, número de células e grau de proliferação. Com a compreensão de como ocorre o reconhecimento do complexo MHC-antígeno pelo receptor de célula T (TCR), confirmou-se que a base da aloreatividade de células T na MLR era essencialmente parecida com o reconhecimento dos epítomos peptídicos nominais apresentados por moléculas de MHC próprias (MANGI *et al.*, 1975). O princípio básico de uma MLR é que as células T de um doador proliferam na presença de células apresentadoras de antígeno (APCs) alogênicas. Esta proliferação é provocada pelo reconhecimento de diferenças entre o antígeno leucocitário humano (HLA) de dois doadores não relacionados. Vários ensaios de MLR são realizados cultivando linfócitos respondedores (MANGI *et al.*, 1975) ou com as APCs irradiadas ou tratadas com mitomicina-C (GODFREY *et al.*, 2004). Neste trabalho as células APCs não sofreram nenhum tipo de tratamento, além da separação baseada em citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). Na MLR a resposta imunológica é específica aos

antígenos do HLA alogênico, e não requer sensibilização prévia a esses antígenos (MANGI *et al.*, 1975). A investigação de interações reguladoras na MLR é uma abordagem interessante para responder sobre os mecanismos de regulação de células T auto-reativas e o papel que as APCs desempenham nas interações reguladoras entre as células T (DOZMOROV *et al.*, 1995).

Neste estudo, padronizamos uma MLR para testar a capacidade de supressão da proliferação das células T CD4⁺Foxp3⁻ por populações de células Tregs autólogas ou alogênicas à APC. Observamos que na MLR ocorreu um alto grau de proliferação das células T CD4⁺, o que já é esperado devido a interação entre o complexo MHC-antígeno nas APCs com o receptor de célula T (TCR). Ao adicionar-se as populações de Tregs alo e auto ao MLR verificou-se uma diminuição global da capacidade de indução da proliferação, pelas células T CD4⁺, comprovando a eficiência das células Tregs (CD4⁺CD127^{Low}CD25^{hi}) em suprimir a ativação da célula T CD4⁺ no MLR. Observou-se também que à medida que se diminui a concentração de células Tregs em relação às estimuladoras e respondedoras, a porcentagem de proliferação aumentou. Por fim, observamos que não houve diferenças significativas na capacidade de inibição da proliferação das células T CD4⁺ no MLR pela presença das células T CD4⁺FoxP3⁺ alogênicas em comparação com as autólogas.

Além disso, observamos que a presença de células Tregs inibiram a produção de citocinas na MLR. Avaliamos a produção das citocinas IL-10, TNF- α e IFN- γ . Embora não tenhamos observado diferenças significativas nas concentrações de IL-10 nos grupos avaliados, observamos que a presença de Tregs, tanto autólogas como alogênicas, inibiram a produção de TNF- α e IFN- γ na cultura quando em maiores proporções no MLR. À medida que se diluiu a concentração das Tregs, elas perderam eficiência nessa regulação, embora a Treg alogênia apresente melhor desempenho em inibir a produção destas citocinas em diluições maiores. A presença das células T reguladoras bloqueou a proliferação e ativação, medida pela produção de citocinas, das células T efetoras no MLR provavelmente por um mecanismo que independente de IL-10 e serão necessários estudos posteriores para melhor elucidação deste mecanismo.

As células Tregs tem sido estudada como mecanismo de tolerância em transplantes já há algum tempo com bons resultados. Entretanto, uma grande dificuldade é a obtenção de quantidades de células Tregs suficientes para se atingir grau clínico de uso. Godfrey 2004, avaliou se Tregs expandidas *in vitro* manteriam a capacidade de supressão em cultura e para isso testou a imunossupressão de células T em MLR. Foi observado que a proliferação foi quase completamente inibida em MLRs suprimidas pela linhagem de células Tregs que eles expandiram em relação ao controle Teff:APC (GODFREY *et al.*, 2004) e que houve uma

profunda supressão do acúmulo de citocinas IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-6 nos sobrenadantes (GODFREY *et al.*, 2004). Em nossos resultados, a supressão da MLR não foi tão dramática, embora os resultados sejam coerentes, e acreditamos que diferenças metodológicas, como o uso de APCs ativadas com PAMPs e uma razão diferente de APC:Teff:Treg (GODFREY *et al.*, 2004), possam justificar as diferenças de magnitude.

Neste trabalho viu-se que as células Tregs alogênicas parecem ser mais eficientes do que as células Tregs autólogas em suprimir a produção de IFN- γ no MLR. Essa redução significativa de IFN- γ pode ser justificada pela diminuição da ativação e proliferação de células T CD4⁺ devido a presença das células Tregs que promovem mecanismos de supressão que modulam a interação entre APCs e células T CD4⁺. O IFN γ induz o aumento da expressão de MHC, ativa mecanismos efetores tanto na imunidade inata quanto na adaptativa e ainda fornece um forte sinal para proliferação de linfócitos Th1, amplificando mecanismos de imunidade adaptativa. Vários trabalhos concordam que IFN- γ possui um papel central na rejeição (LIU *et al.*, 2013). Por exemplo, células T produtoras de IFN- γ são encontradas em pacientes transplantados sofrendo processos de rejeição aguda e, acredita-se que sua capacidade de induzir hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), ativar a produção de anticorpos e induzir a atividade de células T CD8⁺ contribuam em vários aspectos dos mecanismos de rejeição de transplante alogênico (LIU *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que o IFN- γ pode atuar como um fator tardio de crescimento para células T CD4⁺CD25⁺ mediadoras da tolerância específica e que pode ter um papel importante para a indução e manutenção da tolerância (WOOD & SAWITZKI 2006). Outro estudo mostrou que a expressão do fator de transcrição Th1 T - bet foi regulada positivamente em Tregs após exposição a IFN- γ em ambiente inflamatório controlando sua migração, homeostase e função supressora. (KOCH *et al.*, 2009; FERRER *et al.*, 2014).

Também já foi relatado que Tregs ativadas por aloantígenos são induzidas a expressar receptores IFNGR para IFN- γ . Em culturas com células T estimuladas com aloantígenos, o IFN- γ pode aumentar a conversão de células T em Tregs específicas de aloantígeno que suprimem a resposta imune efetora e promover a expansão destas células para evitar a destruição do aloenxerto e manter a tolerância (NOMURA *et al.*, 2017).

No contexto aqui estudado, foi possível visualizar no MLR padronizado que as células T CD4⁺CD25⁺ suprimiram a proliferação de células T CD4⁺CD25⁻ ativadas e a produção de citocinas associadas ao processo de rejeição, como IFN- γ e TNF, quando foram co-cultivadas *in vitro*. Neste trabalho, não investigamos mecanismos que possam estar associados a esses processos, mas especulamos que possam ser mecanismos comuns envolvidos na supressão da

proliferação das células T efetoras, como a depleção de citocina proliferativa, como IL-2, ou mesmo a produção de outras citocinas anti-proliferativa como o TGF- β , como observado nos estudos de GODFREY *et al.*, 2004. Os receptores CTLA-4, GITR, CD39, CD73, LAP, GARP, LAG3 expressos pelas células Tregs também podem ter um papel e serão estudados posteriormente para que outros mecanismos de interação com APCs e células T para a promoção da supressão seja compreendidos. Análises sobre células Tregs expandidas também trarão enriquecimento para o entendimento de mecanismos efetores da supressão, já que para uma terapia Treg é necessária uma quantidade grande de células que não são encontradas na corrente sanguínea para a infusão no indivíduo.

13 CONCLUSÃO

O estudo dos mecanismos efetores da supressão induzidos pelas células T reguladoras na reação mista de linfócitos trouxe informações importantes para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos na obtenção da tolerância operacional. Muitos detalhes ainda precisam ser elucidados, já que muitos outros mecanismos estão envolvidos no processo de tolerância. Os resultados mostram um ensaio adequado para o estudo do comportamento das células Tregs, APCs e células TCD4+, no que diz respeito à co-estimulação, interação entre TCR e MHC e a produção de citocinas. Viu-se através das análises das citocinas e da proliferação, que as células Tregs foram capazes de suprimir a proliferação das células T CD4⁺ e a produção de citocinas relevantes para a rejeição

Este estudo é relevante, pois procura responder qual a origem da Treg mais relevante para a indução de tolerância operacional, Treg do próprio receptor ou do doador. A resposta adequada a essa pergunta permitirá a canalização de esforços adequados para o desenvolvimento de uma terapia celular mais promissora.

REFERÊNCIAS

- 1- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier. 9th Edition, 2018, pg 378.
- 2- ALEGRE, Maria-Luisa; LAKKIS, Fadi G.; MORELLI, Adrian E. Antigen presentation in transplantation. **Trends in immunology**, v. 37, n. 12, p. 831-843, 2016.
- 3- AUCHINCLOSS, Hugh et al. The role of " indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3373-3377, 1993.
- 4- AYALA GARCÍA, Marco Antonio et al. The major histocompatibility complex in transplantation. **Journal of transplantation**, v. 2012, 2012.
- 5- BAAN, Carla C. et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. **Transplantation**, v. 80, n. 1, p. 110-117, 2005.
- 6- BACH, Jean François. Regulatory T cells under scrutiny. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 3, p. 189-198, 2003.
- 7- BARKER, Clyde F.; BILLINGHAM, R. E. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, n. 1, p. 197-221, 1968.
- 8- BARNARD, Christiaan N. Human cardiac transplantation: an evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. **American Journal of Cardiology**, v. 22, n. 4, p. 584-596, 1968.
- 9- BATTAGLIA, Manuela; STABILINI, Angela; RONCAROLO, Maria-Grazia. Rapamycin selectively expands CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4743-4748, 2005.
- 10- BESSEDE, Alban et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. 184, 2014
- 11- BOPP, Tobias et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1303-1310, 2007.
- 12- BORSELLINO, Giovanna et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225-1232, 2007.

- 13- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
- 14- BRAUN, Michel Y. et al. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. **Transplantation**, v. 55, n. 1, p. 177-181, 1993.
- 15- BRAZA, Faouzi et al. Central Role of CD45RA⁺ Foxp3^{hi} Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. ASN. 2014050480, 2015.
- 16- CALNE, Roy Yorke. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 28, n. 4, p. 445-460, 1961.
- 17- CALNE, Roy. Clinical transplantation: current problems, possible solutions. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1461, p. 1797-1801, 2005.
- 18- CAMERON, J. Stewart; BANK, Elm; CUMBRIA, Melmerby. The Prehistory of Transplantation: up to the 1950s. **Giornale italiano di nefrologia: organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia**, v. 35, n. Suppl 70, p. 69-79, 2018.
- 19- CHAN, Sherri Y. et al. In vivo depletion of CD8⁺ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. **Transplantation**, v. 59, n. 8, p. 1155-1161, 1995.
- 20- CHEN, Xin et al. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 154-161, 2007.
- 21- CHEN, Xin et al. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood. **European journal of immunology**, v. 40, n. 4, p. 1099-1106, 2010.
- 22- CHEN, Xin et al. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1076-1084, 2013.

- 23- COBBOLD, Stephen P. et al. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 29, p. 12055-12060, 2009
- 24- COENEN, Jeroen JA et al. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1018-1023, 2006.
- 25- COOPER, David KC. A brief history of cross-species organ transplantation. In: **Baylor University Medical Center Proceedings**. Taylor & Francis, 2012. p. 49-57.
- 26- DANGOOR, Joseph Yoav et al. Transplantation: a brief history. **Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2015.
- 27- DA SILVA, Marina Burgos et al. Old game, new players: Linking classical theories to new trends in transplant immunology. **World journal of transplantation**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.
- 28- DEAGLIO, Silvia et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.
- 29- DE SERRES, Sacha A.; SAYEGH, Mohamed H.; NAJAFIAN, Nader. Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation!. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 10, p. 1661-1669, 2009.
- 30- DONG, Eugene et al. Transplantation of the heart. **Diseases of the Chest**, v. 48, n. 5, p. 455-457, 1965.
- 31- DOZMOROV, Igor et al. Regulatory cellular interactions in the primary mixed lymphocyte reaction. **Immunology letters**, v. 46, n. 1-2, p. 43-48, 1995.
- 32- FAN, Huimin et al. Regulatory T cell therapy for the induction of clinical organ transplantation tolerance. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2011. p. 453-461.
- 33- FERRER, Ivana R. et al. Induction of transplantation tolerance through regulatory cells: from mice to men. **Immunological reviews**, v. 258, n. 1, p. 102-116, 2014.

- 34- GAO, Wenda et al. Contrasting Effects of Cyclosporine and Rapamycin in De Novo Generation of Alloantigen-Specific Regulatory T Cells. **American journal of transplantation**, v. 7, n. 7, p. 1722-1732, 2007.
- 35- GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.
- 36- GIBSON, Thomas; MEDAWAR, Peter B. The fate of skin homografts in man. **Journal of Anatomy**, v. 77, n. Pt 4, p. 299, 1943.
- 37- GONDEK, David C. et al. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 1783-1786, 2005.
- 38- GONZALEZ-NOLASCO, Bruno et al. Emerging role of exosomes in allorecognition and allograft rejection. **Current opinion in organ transplantation**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2018.
- 39- GRANDJEAN, Isabelle et al. Are major histocompatibility complex molecules involved in the survival of naive CD4⁺ T cells?. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 1089-1102, 2003.
- 40- GREENWALD, Rebecca J. et al. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. **Immunity**, v. 14, n. 2, p. 145-155, 2001.
- 41- GREGORI, Silvia; GOUDY, Kevin S.; RONCAROLO, Maria Grazia. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. **Frontiers in immunology**, v. 3, 2012.
- 42- GODFREY, Wayne R. et al. In vitro-expanded human CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 453-461, 2004.
- 43- HARDY, James D. et al. Lung homotransplantation in man: report of the initial case. **Jama**, v. 186, n. 12, p. 1065-1074, 1963.
- 44- HARDY, James D. et al. Lung homotransplantation in man. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 811, 1964.
- 45- HASKOVA, Zdenka et al. An immunodominant minor histocompatibility alloantigen that initiates corneal allograft rejection1. **Transplantation**, v. 75, n. 8, p. 1368-1374, 2003.

- 46- HERRERA, Osquel Barroso et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 8, p. 4828-4837, 2004.
- 47- HIPPEN, Keli L. *et al.* Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, 2011. p. 462-468.
- 48- HOUSLEY, William J. et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF- α signaling for in vivo function. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 6779-6787, 2011.
- 49- HÖFER, Thomas; KRICHEVSKY, Oleg; ALTAN-BONNET, Grégoire. Competition for IL-2 between regulatory and effector T cells to chisel immune responses. **Frontiers in immunology**, v. 3, 2012.
- 50- HUME, David M. et al. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. **The Journal of clinical investigation**, v. 34, n. 2, p. 327-382, 1955.
- 51- INABA, Kayo et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 11, p. 2163-2173, 1998
- 52- INGULLI, Elizabeth et al. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 12, p. 2133-2141, 1997.
- 53- INGULLI, Elizabeth. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatric nephrology**, v. 25, n. 1, p. 61, 2010.
- 54- JAMESON, Stephen C.; HOGQUIST, Kristin A.; BEVAN, Michael J. Positive selection of thymocytes. **Annual review of immunology**, v. 13, n. 1, p. 93-126, 1995.
- 55- JEFFERY, Hannah C. et al. Clinical potential of regulatory T cell therapy in liver diseases: An overview and current perspectives. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.
- 56- KOCH, Meghan A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nature immunology**, v. 10, n. 6, p. 595, 2009.
- 57- LAKKIS, Fadi G.; LI, Xian C. Innate allorecognition by monocytic cells and its role in graft rejection. **American Journal of Transplantation**, v. 18, n. 2, p. 289-292, 2018.

- 58- LAMB, K. E.; LODHI, S.; MEIER-KRIESCHE, H.-U. Long-term renal allograft survival in the United States: A critical reappraisal. **American journal of transplantation**, v. 11, n. 3, p. 450-462, 2011
- 59- LARSEN, Christian P. et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 5, p. 1483-1493, 1990.
- 60- LEVITSKY, Josh et al. Immunoregulatory profiles in liver transplant recipients on different immunosuppressive agents. **Human immunology**, v. 70, n. 3, p. 146-150, 2009.
- 61- LIM, Dong-Gyun et al. Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. **Transplant immunology**, v. 18, n. 2, p. 94-100, 2007.
- 62- LIN, Christine M.; GILL, Ronald G. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. **Current opinion in organ transplantation**, v. 21, n. 1, p. 40, 2016.
- 63- LINDEN, Peter K. History of solid organ transplantation and organ donation. **Critical care clinics**, v. 25, n. 1, p. 165-184, 2009.
- 64- LINTERMAN, Michelle A.; LISTON, Adrian; VINUESA, Carola G. T-follicular helper cell differentiation and the co-option of this pathway by non-helper cells. **Immunological reviews**, v. 247, n. 1, p. 143-159, 2012.
- 65- LIU, Weihong *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701-1711, 2006.
- 66- LIU, Kang; NUSSENZWEIG, Michel C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological reviews**, v. 234, n. 1, p. 45-54, 2010.
- 67- LIU, Zhongmin; FAN, Huimin; JIANG, Shuiping. CD4+ T-cell subsets in transplantation. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 183-191, 2013.
- 68- LIU, Quan et al. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 8, p. 2805-2820, 2016.
- 69- LODHI, S. A.; LAMB, K. E.; MEIER-KRIESCHE, H. U. Solid Organ Allograft Survival Improvement in the United States: The Long-Term Does Not Mirror the Dramatic Short-Term Success. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 6, p. 1226-1235, 2011.

- 70- LOMBARDI, Giovanna et al. The specificity of alloreactive T cells is determined by MHC polymorphisms which contact the T cell receptor and which influence peptide binding. **International immunology**, v. 3, n. 8, p. 769-775, 1991.
- 71- LOMBARDI, G., Sagoo, P., Scotta, C., Fazekasova, H., Smyth, L., Tsang, J., Afzali, B., and Lechler, R. (2011). Cell therapy to promote transplantation tolerance: a winning strategy? **Immunotherapy** 3, 28–31.
- 72- LOPEZ, Marta et al. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 10, p. 2844-2853, 2006
- 73- KINNEAR, Gillian; JONES, Nick D.; WOOD, Kathryn J. Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy. **Transplantation**, v. 95, n. 4, p. 527, 2013.
- 74- MANGI, RICHARD J.; KANTOR, FRED S. The multiple mixed lymphocyte reaction: variables important in the test as a measure of lymphocyte competence in man. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 48, n. 3, p. 217, 1975..
- 75- MARINO, Jose; PASTER, Joshua; BENICHO, Gilles. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 582, 2016.
- 76- MARINO, Jose et al. Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive T cell responses after transplantation. **Science immunology**, v. 1, n. 1, 2016.
- 77- MARIE, Julien C. et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1061-1067, 2005.
- 78- MARKEY, Kate A. et al. Cross-dressing by donor dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation contributes to formation of the immunological synapse and maximizes responses to indirectly presented antigen. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 5426-5433, 2014.
- 79- MATEVOSSIAN, Edouard et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895–1961)—a pioneer in the history of clinical transplantation: in memoriam at the 75th anniversary of the first human kidney transplantation. **Transplant International**, v. 22, n. 12, p. 1132-1139, 2009.
- 80- MCMURCHY, Alicia N.; LEVINGS, Megan K. Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. **European journal of immunology**, v. 42, n. 1, p. 27-34, 2012.

- 81- MEIER-KRIESCHE, Herwig-Ulf et al. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. **American journal of transplantation**, v. 4, n. 3, p. 378-383, 2004.
- 82- MEIRELLES JÚNIOR, Roberto Ferreira et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. **Einstein** (Sao Paulo), v. 13, n. 1, p. 149-152, 2015.
- 83- MIZUMOTO, Norikatsu et al. CD39 is the dominant Langerhans cell–associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature medicine**, v. 8, n. 4, p. 358, 2002.
- 84- MONDANELLI, Giada et al. A relay pathway between arginine and tryptophan metabolism confers immunosuppressive properties on dendritic cells. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 233-244, 2017.
- 85- MONGUIÓ-TORTAJADA, Marta; LAUZURICA-VALDEMOROS, Ricardo; BORRÀS, Francesc E. Tolerance in organ transplantation: from conventional immunosuppression to extracellular vesicles. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 416, 2014.
- 86- MOREAU, Aurélie et al. Effector mechanisms of rejection. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 11, p. a015461, 2013.).
- 87- MORELLI, Adrian E. Dendritic cells of myeloid lineage: the masterminds behind acute allograft rejection. **Current opinion in organ transplantation**, v. 19, n. 1, p. 20-27, 2014.
- 88- MORELLI, Adrian E.; BRACAMONTE-BARAN, William; BURLINGHAM, William J. Donor-derived exosomes: the trick behind the semidirect pathway of allorecognition. **Current opinion in organ transplantation**, v. 22, n. 1, p. 46-54, 2017.
- 89- MORRIS, Peter J. Transplantation—a medical miracle of the 20th century. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2678-2680, 2004.
- 90- NOMURA, Masaru et al. Cytokines affecting CD4+ T regulatory cells in transplant tolerance. II. Interferon gamma (IFN- γ) promotes survival of alloantigen-specific CD4+ T regulatory cells. **Transplant immunology**, v. 42, p. 24-33, 2017.
- 91- OCHANDO, Jordi et al. The mononuclear phagocyte system in organ transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 4, p. 1053-1069, 2016.
- 92- OLSON JL. Hypertension: Essential and secondary forms.

In: JennetteJC, OlsonJL, SchwartzMM, SilvaFG, eds. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, 5th Ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1998; 943–1002.

- 93- PALLOTTA, Maria T. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, n. 9, p. 870-878, 2011.
- 94- PALLOTTA, Maria Teresa et al. Forced IDO1 expression in dendritic cells restores immunoregulatory signalling in autoimmune diabetes. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 18, n. 10, p. 2082-2091, 2014.
- 95- PASCUAL, J. et al. Calcineurin Inhibitor Withdrawal After Renal Transplantation with Alemtuzumab: Clinical Outcomes and Effect on T-Regulatory Cells. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 7, p. 1529-1536, 2008.
- 96- PILAT, Nina; SAYEGH, Mohamed H.; WEKERLE, Thomas. Costimulatory pathways in transplantation. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2011. p. 293-303.
- 97- QURESHI, Omar S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600-603, 2011.
- 98- RACUSEN, Lorraine C.; SOLEZ, Kim; COLVIN, Robert. Fibrosis and atrophy in the renal allograft: interim report and new directions. **American Journal of Transplantation**, v. 2, n. 3, p. 203-206, 2002.
- 99- ROCHA, Paulo N. et al. Effector mechanisms in transplant rejection. **Immunological reviews**, v. 196, n. 1, p. 51-64, 2003.
- 100- ROUSSEY-KESLER, G. *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. **American journal of transplantation**, v. 6, n. 4, p. 736-746, 2006.
- 101- SAFINIA, Niloufar et al. Regulatory T cells: serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 438, 2015.
- 102- SAGOO, Pervinder et al. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. **Science translational medicine**, v. 3, n. 83, p. 83ra42-83ra42, 2011.

- 103- SAGOO, Pervinder; LOMBARDI, Giovanna; LECHLER, Robert I. Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ Transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 3, 2012.
- 104- SAKAGUCHI, Shimon et al. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?. **International immunology**, v. 21, n. 10, p. 1105-1111, 2009
- 105- SAN SEGUNDO, David et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 82, n. 4, p. 550-557, 2006.
- 106- SCOTTÀ, Cristiano et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. **haematologica**, v. 101, n. 1, p. 91-100, 2016.
- 107- SHEVACH, Ethan M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636-645, 2009.
- 108- SHIRWAN, Haval; BARWARI, Luqman; KHAN, Nasreen Sattar. Predominant expression of t helper 2 cytokines and altered expression of t helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class i major histocompatibility complex peptides1, 2. **Transplantation**, V. 66, N. 12, P. 1802-1809, 1998.
- 109- SILVA, Isabel Gonçalves et al. The tim-3-galectin-9 secretory pathway is involved in the immune escape of human acute myeloid leukemia cells. **EBioMedicine**, v. 22, p. 44-57, 2017.
- 110- SMIGIEL, Kate S. et al. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. **Immunological reviews**, v. 259, n. 1, p. 40-59, 2014.
- 111- SNANOUDJ, Renaud et al. The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept. **Biologics: targets & therapy**, v. 1, n. 3, p. 203, 2007.
- 112- SOLEZ, K. et al. Banff'05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). **American Journal of Transplantation**, v. 7, n. 3, p. 518-526, 2007.
- 113- STARZL, Th E. et al. Homotransplantation of the liver in humans. **Surgery, gynecology & obstetrics**, v. 117, p. 659, 1963.

- 114- STARR, Timothy K.; JAMESON, Stephen C.; HOGQUIST, Kristin A. Positive and negative selection of T cells. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 139-176, 2003.
- 115- STEINMAN, Ralph M.; PACK, Maggie; INABA, Kato. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. **Immunological reviews**, v. 156, n. 1, p. 25-37, 1997.
- 116- STEELE, D. J. et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 2, p. 699-703, 1996.
- 117- SUCIU-FOCA, N. et al. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection. In: Transplantation proceedings. **Elsevier**, 1999. p. 100-101.
- 118- SUN, Liping; JIN, Hao; LI, Hui. GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- β releasing. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42826, 2016.
- 119- TAI, Xuguang et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. **Blood**, v. 119, n. 22, p. 5155-5163, 2012.
- 120- TANG, Qizhi et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3348-3352, 2003.
- 121- TANG, Qizhi; BLUESTONE, Jeffrey A. Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 11, p. a015552, 2013
- 122- THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569, 2002.
- 123- TODO, Satoru et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. **Hepatology**, v. 64, n. 2, p. 632-643, 2016.
- 124- VELLA, John P. et al. Indirect Allorecognition Of Major Histocompatibility Complex Allopeptides In Human Renal Transplant Recipients With Chronic Graft Dysfunction1. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 795-800, 1997.

- 125- VERMIJLEN, David et al. Perforin and granzyme B induce apoptosis in FasL-resistant colon carcinoma cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 50, n. 4, p. 212-217, 2001.
- 126- VIGNALI, Dario AA; COLLISON, Lauren W.; WORKMAN, Creg J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008.
- 127- WATSON, C. J. E.; DARK, J. H. Organ transplantation: historical perspective and current practice. **British journal of anaesthesia**, v. 108, p. i29-i42, 2012.
- 128- WATTS, Tania H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 23-68, 2005.
- 129- WELCH, C. S. Liver graft. **Maroc médical**, v. 34, n. 359, p. 514, 1955.
- 130- WELLS, Andrew D. et al. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1409, p. 617-623, 2001.
- 131- WING, Kajsja; SAKAGUCHI, Shimon. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2010.
- 132- WOOD, Kathryn J. et al. Alloantigen-induced specific immunological unresponsiveness. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1409, p. 665-680, 2001.
- 133- WOOD, Kathryn J.; SAKAGUCHI, Shimon. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 3, p. 199-210, 2003.
- 134- WOOD, Kathryn J.; SAWITZKI, Birgit. Interferon γ : a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. **Trends in immunology**, v. 27, n. 4, p. 183-187, 2006.
- 135- WOOD, Kathryn J.; BUSHELL, Andrew; HESTER, Joanna. Regulatory immune cells in transplantation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 6, p. 417, 2012.
- 136- WOODRUFF, M. F. A.; ROBSON, J. S. Transplantation of a kidney from an identical twin. **The Lancet**, v. 277, n. 7191, p. 1411, 1961.

- 137- WORKMAN, Creg J. et al. The development and function of regulatory T cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 16, p. 2603, 2009.
- 138- YANG, Joshua YC; SARWAL, Minnie M. Transplant genetics and genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 5, p. 309, 2017.
- 139- YAMAGUCHI, Tomoyuki; WING, James B.; SAKAGUCHI, Shimon. Two modes of immune suppression by Foxp3⁺ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2011. p. 424-430.
- 140- YOSHIZAWA, A. et al. The roles of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2005. p. 37-39.
- 141- ZAITSU, Masaaki et al. Selective blockade of CD28 on human T cells facilitates regulation of alloimmune responses. **JCI insight**, v. 2, n. 19, 2017.
- 142- ZHU, Jinfang; PAUL, William E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, 2008.
- 143- ZHUANG, Quan et al. Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection. **Nature communications**, v. 7, p. 12623, 2016.

ANEXO

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Adultos)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assinie ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações que iremos coletar de você. Quando apresentarmos os resultados dessa pesquisa, garantimos que sua identidade não será relevada. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Salientamos que sua participação (ou não-participação) nesse projeto não poderá acarretar em qualquer prejuízo seja para você, seja financeiro ou qualquer outro tipo de prejuízo. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo se tiver concordado previamente. Solicitamos que caso sinta-se prejudicado de alguma forma, tenha alguma dúvida ética ou deseje qualquer informação extra, comunique-se à equipe do projeto ou ao CEP (telefones abaixo).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Estudo das alterações do sistema imunológico em transplante de órgãos sólidos.

Pesquisador Responsável: Cristiano Xavier Lima

Endereço e telefone do responsável pelo estudo

- Av. do Contorno, 9530
- Telefone: 31 992963578 ou 31 35147000

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Hospital Felício Rocho:

- Av. do Contorno, 9530 Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, MG
- TeleFax: (31) 3514 7000

O objetivo desse estudo é buscar um melhor entendimento sobre a forma como o sistema imunológico do corpo humano responde à ao transplante de órgãos e ao uso de medicamentos imunossupressores. Os medicamentos para evitar a rejeição do órgão transplantado alteram o sistema imunológico do paciente. Estas alterações, além de proteger contra a rejeição podem mudar a forma como o organismo atua na defesa contra infecções. Os pacientes transplantados em uso de medicamentos imunossupressores apresentam maior risco de infecções do que o paciente não transplantado. Sabe-se pouco sobre a forma como o sistema de defesa do corpo humano (sistema imunológico) do paciente transplantado responde à infecção. O objetivo desse estudo é investigar como o sistema imunológico do paciente transplantado reage ao uso de medicamentos imunossupressores e como podemos evitar a rejeição sem aumentar o risco da infecção.. Assim, pretendemos recrutar voluntários saudáveis e pacientes em lista de espera para transplante de fígado ou rim, adultos para participarem do estudo. Se você aceitar participar desse estudo, vamos colher até 60 mL de sangue antes do seu transplante, 30 dias após o transplante, para a realização de exames e testes de laboratório para verificar como seu organismo está lidando com os medicamentos imunossupressores. A coleta do sangue será realizada usando tubos pequenos através de uma punção na veia do membro superior da sua preferência durante a coleta dos exames pré transplantes de rotina.. Dependendo de como você evoluir, poderemos te convidar para coletas futuras entre 1-6 meses em caso de rejeição ou infecção.. É importante lembrar que a coleta de sangue pode causar desconforto e hematoma no local de introdução da agulha. Em raros casos, algumas pessoas desmaiam por verem o seu próprio sangue. Seu sangue será utilizado para os exames e suas células poderão ser congeladas para estudos posteriores com novas tecnologias. Também pedimos autorização para avaliar sua ficha médica a fim de caracterizar seu caso. Informamos que sua participação neste estudo não envolve qualquer remuneração.

1/2

Rubrica participante _____

Rubrica pesquisado _____

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

◆ **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**

Eu, _____, idade____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos." como voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Nome: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Data _____

Assinatura do participante

◆ Nome e Assinatura do pesquisador:

2/2

Rubrica participante _____

Rubrica pesquisado _____