



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

BÁRBARA LÚCIA MORAIS DE OLIVEIRA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO COFATOR TRANSCRICIONAL IRF2BP2 NA
HOMEOSTASE E RESPOSTA DE LINFÓCITOS T**

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

BÁRBARA LÚCIA MORAIS DE OLIVEIRA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO COFATOR TRANSCRICIONAL IRF2BP2 NA
HOMEOSTASE E RESPOSTA DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de
Câncer como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola

**RIO DE JANEIRO
2018**

V657c Vieira, Bárbara Lúcia Morais de Oliveira.

Caracterização do papel do cofator transcricional IRF2BP2 na homeostase e resposta de Linfócitos T / Bárbara Lúcia Morais de Oliveira Vieira. – Rio de Janeiro, 2018.

70 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: João Paulo de Biaso Viola.

1. IRF2BP2. 2. Linfócitos T. 3. Linfócitos T CD4-Positivos. 4. Resposta Imune. 5. Homeostase. I. Viola, João Paulo de Biaso (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 572.865



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

BÁRBARA LÚCIA MORAIS DE OLIVEIRA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO COFATOR TRANSCRICIONAL IRF2BP2 NA
HOMEOSTASE E RESPOSTA DE LINFÓCITOS T**

ORIENTADOR : Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Martin Bonamino
Prof. Dr. Fábio Barrozo do Canto
Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida
Prof. Dr. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór - Suplente I
Prof. Dr. André Vale - Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por não me desamparar em nenhum dia da minha vida. Por muitas vezes antes mesmo de pedir algo especial, Ele já me escutar. Por me mostrar todos os dias que Ele está comigo em todos os momentos.

Agradeço a minha mãe por ser minha luz! Obrigada por sempre me incentivar a buscar meus sonhos e tentar todos os dias me ensinar que não importa o que aconteça você estaria do meu lado. Obrigada pelo apoio incondicional, por todo amor, por ser minha melhor amiga.

Agradeço ao meu padrasto “Tião”, por acreditar tanto em mim, de uma forma que eu não consigo acreditar, por me incentivar todos os dias a ir atrás dos meus objetivos. E me ensinar a ser uma pessoa mais altruísta. Obrigada por estar sempre ao meu lado e sempre se preocupar “se eu estava precisando de alguma coisa” e com isso não deixar eu precisar de nada.

Agradeço a minha família por entender que mesmo que a minha presença física não estava em casa nos almoços de domingo, meu coração sempre estava lá. Obrigada aos meus tios e tias, primos e primas. Em especial a minha vó que sempre com grande orgulho dizia para todos os seus amigos e também os desconhecidos que “sua neta estava estudando para ser doutora no INCA”.

Agradeço a minha família de coração, a família do Tião que se tornou a minha família, quem me acolheu no Rio e me fez me sentir em casa. De forma que estar com eles diminuía a saudade de casa e por sempre estar ao meu lado fazendo tudo ficar mais fácil. Em especial “Tia Con” por me acolher em sua casa, por me escutar sempre que eu chegava em casa “agitada” pelo experimento que deu certo ou pelo experimento que deu errado. Agradeço também a Rosana, pois quando eu sabia o que eu queria fazer da vida, e não estava conseguindo, ela com muito jeitinho me deu o incentivo que faltava.

Agradeço ao meu orientador João Viola, por ter confiado em mim mesmo quando eu falei “Eu nunca vi nada disso, que vocês trabalham aqui”. Pela excelente orientação, pela oportunidade de trabalhar com um grupo maravilhoso. Obrigada pela paciência,

dedicação e incentivo a mim e principalmente por confiar e me aceitar em seu laboratório.

Á Cris, por ser muito mais que minha “orientadora” de bancada e ter se tornado uma grande amiga. Obrigada por toda paciência quando eu “fugia” de ter que apresentar para você, por estar sempre ao meu lado nos experimentos e também por ter-me “abandonado” na hora certa, para que eu pudesse aprender que eu conseguia fazer tudo sozinha, e me dar confiança de que daria certo, que eu não precisava ter medo ou chorar por isso.

Aos amigos do laboratório, a vida é bem mais alegre e mais fácil com vocês, ao lado. Agradeço ao “teenbiola” (sem citar nomes pois conheço vocês muito bem para saber que a ordem de citação, mesmo que alfabética poderia gerar atritos) por ter certeza que nossa amizade não é exclusivamente laboratorial, e sim uma amizade para vida.

Aos amigos “Old School” do laboratório, agradeço a boa convivência e pelos laços de amizade construído. Obrigada pelo apoio e por dividirem todo o conhecimento que vocês já possuíam, sempre muito solícitos em esclarecer as minhas muitas dúvidas. Obrigada pelos bons momentos compartilhados na copa, nos barzinhos pela Lapa depois de um dia difícil. E desculpa eu ter “uma palavra” meio fraca e até hoje não ter bebido a tequila prometida! Quem sabe ela não vem para o doutorado?

Aos meus amigos de Leopoldina (metrópole em ascensão), obrigada por não desistirem de mim quando eu abandonava vocês por dias, até sem responder as mensagens de vocês. Obrigada por participarem da minha vida a mais de 20 anos, amo vocês e estou chegando pra gente comemorar esse MESTRADO.

Ao Lucas, que consegue resolver todos os meus problemas (da genotipagem dos camundongos aos problemas pessoais). Lucas, muito obrigada você torna as coisas muito mais fácil na vida laboratorial, que eu tenha metade da sua organização na vida um dia.

Karina, você é um exemplo de pessoa. Que paz, que luz, que alegria que é poder conviver com você todos os dias. Obrigada por compartilhar todo amor que você

coloca no seu trabalho comigo. Sempre serei uma eterna apaixonada pela citometria.

Alexsandra, outro exemplo de pessoas que nos inspiram. Que otimismo, que alegria, como é bom estar perto de você. Sem querer você me ensinou a encarar a vida de uma outra forma, de uma jeitinho mais leve, acreditando que tudo vai ficar bem sempre.

Amanda, você também faz a vida laboratorial ser muito mais fácil. Obrigada por toda colaboração de sempre.

Matheus, agradeço de coração toda sua boa vontade, em ler e reler minha dissertação, meu resumo, e-mails importante...

Léo, Possik e Pat Sávio... obrigada por todas contribuições científicas ao longo desses anos de convivência. Os comentários de vocês são valiosos.

As meninas do biotério em especial, Patricia Reid sempre tão solícita e atenciosa nos momentos em que eu chegava desesperada pedindo “pelo amor de Deus, eu preciso de animais para amanhã” ou “pelo amor de Deus eu preciso de animais, vamos fazer mais casais”.

Agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço as agências de fomento a pesquisa que financiaram esse trabalho permitindo que o mesmo fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!



CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO COFATOR TRANSCRICIONAL IRF2BP2 NA HOMEOSTASE E RESPOSTA DE LINFÓCITOS T

Os mecanismos de ativação e diferenciação de células T CD4 constituem uma complexa rede de sinalização, envolvendo diversas proteínas reguladoras. IRF2BP2 (Interferon Regulatory Factor-2 Binding Protein-2) foi descrito como um repressor transcricional envolvido na regulação da expressão gênica em diferentes contextos biológicos. Recentemente, nosso laboratório demonstrou que a expressão ectópica de IRF2BP2 em linfócitos T CD4 leva a uma diminuição da proliferação celular e uma diminuição da expressão dos marcadores de ativação CD25 e CD69 após a estimulação via TCR. Com o objetivo de compreender o papel do IRF2BP2 na homeostase e na resposta dos linfócitos T CD4 *in vivo*, foram gerados animais transgênicos condicionais para superexpressão de IRF2BP2 em linfócitos T (IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺). Para avaliar o envolvimento da superexpressão de IRF2BP2 na homeostase de células T, realizamos uma caracterização das populações linfocitárias no timo, baço e linfonodos periféricos em animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ *naive*, analisando as populações de células CD3⁺, B220⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD44⁺CD122⁺, CD62L^{high}CD44⁻, CD62L^{high}CD44⁺ e CD62L^{low}CD44⁺. Observamos que os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ apresentaram uma redução no número total de linfócitos e no seu percentual relativo de células T no baço e linfonodos quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻. Também observamos um aumento na população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no baço e nos linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ apresentam um aumento na população de células CD8⁺CD44⁺CD122⁺, quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻. Observamos também uma diminuição da população de células CD62L^{high}CD44⁻ e um aumento das populações de células CD62L^{high}CD44⁺ e CD62L^{low}CD44⁺. Analisamos também a população linfocitária em animais sensibilizados. Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ e selvagens foram sensibilizados na pata traseira por via subcutânea com ovalbumina (OVA) na presença de adjuvante completo de Freund. Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com OVA apresentaram uma redução no número total de células nos linfonodos drenantes e também foi observado uma redução no compartimento CD3⁺ dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, quando comparado aos controles selvagens. Também observamos uma resposta proliferativa diminuída de células T CD4⁺ dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ após estimulação *in vitro* com OVA, quando comparado a células T CD4⁺ dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻. Para avaliar o efeito do IRF2BP2 na diferenciação de células T CD4, utilizamos as culturas de células diferenciadas *in vitro* para Th1, Th2 e Th17. Com relação às citocinas produzidas por cada perfil efetor, podemos observar um aumento na produção de IFN- γ nos diferentes perfis efetores nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Em conjunto, nossos resultados indicam que a superexpressão de IRF2BP2 leva a uma redução no compartimento de linfócitos T em animais *naive*, o que sugere uma ruptura na homeostase dessas células. Além disso, a superexpressão de IRF2BP2 leva a uma redução na proliferação celular em resposta à estimulação TCR e a uma diferenciação preferencial ao perfil Th1, com o aumento da produção de IFN- γ , indicando um papel para IRF2BP2 na resposta efetora de células T.



**CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF TRANSCRIPTIONAL COFACTOR
IRF2BP2 IN HOMEOSTASE AND T LYMPHOCYTES RESPONSE**

CD4 T cells activation and differentiation mechanisms constitute a complex and intricate signaling network involving several regulatory proteins. IRF2BP2 (Interferon Regulatory Factor-2 Binding Protein-2) is a transcriptional repressor involved in the regulation of gene expression in different biological contexts. Recently, our laboratory demonstrated that ectopic expression of IRF2BP2 in CD4 T lymphocytes leads to a decrease in cell proliferation and a reduced expression of CD25 and CD69 upon TCR stimulation. To evaluate the role of IRF2BP2 in the homeostasis and response of CD4 T lymphocytes *in vivo*, we generated a conditional transgenic mice, which overexpress IRF2BP2 in T lymphocytes (IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺). To evaluate the involvement of IRF2BP2 overexpression in T cell homeostasis we characterized the lymphocyte population in the thymus, spleen and peripheral lymph nodes in naive IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ animals, by analyzing the percentages of CD3⁺, B220⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD44⁺CD122⁺, CD62L^{high}CD44⁻, CD62L^{high}CD44⁺ and CD62L^{low}CD44⁺. IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ animals showed a reduction in total cell numbers and in the percentage of T cell population in the spleens and lymph nodes compared to IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ animals. We observed an increase of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ in the spleen and lymph nodes in IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ animals. IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ animals show an increase in CD8⁺CD44⁺CD122⁺ cell population compared to IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ animals. We also observed a decrease in CD62L^{high}CD44⁻ cell population and an increase in CD62L^{high}CD44⁺ and CD62L^{low}CD44⁺ cells populations compared to IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ animals. We also analyzed the lymphocyte population in sensitized animals. Then animals were subcutaneously sensitized with ovalbumin (OVA) in presence of complete Freund's adjuvant in the hind footpad. IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ OVA-sensitized animals presented a reduced total cell number in the draining lymph nodes, which was due to a reduction of the CD3⁺ compartment when compared to IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ animals. Furthermore, we observed a diminished proliferative response of IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ CD4 T cells upon *in vitro* stimulated with OVA when compared to wild-type CD4 T cells. In order to evaluate the effect of IRF2BP2 on CD4 T cell differentiation, we used Th1, Th2 and Th17 *in vitro* skewed cells cultures. Regarding the cytokines production each effector profile, we observed an increased percentage of IFN- γ producing cells in IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ CD4 T cell cultures compared to the controls. Taken together, our results indicate that the *in vivo* overexpression of IRF2BP2 leads a reduction in the T cell compartment in *naïve* animals, which suggests a break in homeostasis of these cells. Furthermore, the overexpression of IRF2BP2 leads to a reduction in cell proliferation in response to TCR stimulation and a preferential Th1 differentiation with increased IFN- γ production indicating a role for IRF2BP2 in T cell effector response.

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD- Morte celular induzida por ativação

AP-1- Proteína ativadora 1

APC- Células apresentadoras de antígenos

BSA- Albumina de soro bovina

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar

cTEC- Células estromais

CTLA-4- Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4

CVID- Imunodeficiência variável comum

DAG- Diacilglicerol

DMEM- Dulbecco's modified eagle's medium

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DC- Células dendríticas

DN- Duplo negativo

DP- Duplo positivo

FasL- Ligante de Fas

FASTKD2- Domínio serina treonina kinase 2 ativada por Fas

Foxp3- Forkhead box P3

GFP- Proteína de fluorescência verde

HPRT- Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase

IFN γ - Interferon gama

IL- Interleucina

IP3- Inositol-(1,4,5) trisfosfato

IRF- Fator regulatório de interferon

IRF2BP2- *Interferon regulatory factor 2 binding -protein 2*

ITAM- Motivos de ativação baseados em tirosina

ITK- Tirosina kinase induzida por IL-2

iTreg- Células T regulatórias induzidas

JAK- Quinases janus

LAT- Ligante para ativação de células T

LCK- Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

MEL- Eritroleucemia murina

MHC- Complexo de histocompatibilidade principal

NFAT- Fator nuclear de células T ativadas

NFκB- Fator nuclear *kappa* B

nTreg- Células T regulatórias naturais

OVA- Ovalbumina

PBS- Solução tamponada de fosfato

PCLy- Fosfolipase Cy

PD-L1- Programmed death ligand

PD-1- Programmed cell death protein 1

PIP2- Fosfatidilinositol- (4,5) bifosfato

PFA- Paraformaldeido

PKC- Proteína kinase C

PMA- Phorbol 12-myristato 13-acetato

RAG- Gene de recombinação da ativação

RAS- Rat sarcoma viral oncogene

RNA- ácido ribonucleico

SFB- Soro fetal bovino

SLP76- Fosfoproteína de leucócitos contendo domínio de homologia src2 de 76kDa

SMAD- Transcriptional activator of TGF-β

SP- Simples positivo

STAT- Transdutor de sinal e ativador da transcrição

TCR- Receptor de células T

TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta

Th- T *helper*

TNF- Fator de necrose tumoral

Treg- Células T regulatórias

VEGFA- Fator de crescimento do endotélio vascular A

ZAP-70- Proteína associada a cadeia zeta de 70kDa

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Lista de anticorpos utilizados no processo de diferenciação e análise das populações de células por citometria de fluxo.....	20
Tabela 4.1 Lista de <i>primers</i> utilizado na genotipagem dos animais.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Esquema geral do desenvolvimento das células T no timo.....	4
Figura 1.2- Sinalização via complexo TCR.....	7
Figura 1.3- Diferenciação de linfócitos T <i>helper</i>	11
Figura 4.2.1- Representação esquemática da construção dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	28
Figura 4.2.2- Análise da presença de GFP nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	29
Figura 4.2.3- Quantificação relativa da expressão de IRF2BP2.....	30
Figura 4.2.4- Análise da localização celular de IRF2BP2 em linfócitos T CD4 ativados.....	31
Figura 4.3.1- Número total de células nos órgãos linfoides dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	32
Figura 4.3.2- Análise macroscópica dos órgãos linfoides periféricos.....	32
Figura 4.4.1- Caracterização das populações linfocitárias nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	33
Figura 4.4.2- Caracterização das subpopulações linfocitárias nos linfonodos e baço dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	34
Figura 4.4.3- Caracterização das subpopulações linfocitárias no timo dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	35

Figura 4.5.1- Análise da população de células T regulatórias (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺) nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	36
Figura 4.6.1- Avaliação da população de células de memória virtual (CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD122 ⁺).....	37
Figura 4.7.1- Avaliação da expressão de marcadores de ativação celular em células T CD4.....	39
Figura 4.7.2- Avaliação da expressão de marcadores de ativação celular em células T CD8.....	41
Figura 4.8.1- Diferenciação <i>in vitro</i> de células T CD4 para células efetoras Th1, Th2 e Th17.....	44
Figura 4.9.1- Diferenciação <i>in vitro</i> de células T CD4 em culturas não-polarizantes.....	46
Figura 4.10.1- Número total de células nos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺ sensibilizados com OVA.....	47
Figura 4.10.2- Caracterização das subpopulações de células T nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺ sensibilizados com OVA.....	49
Figura 4.11.1- Análise da proliferação celular nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺ sensibilizados com OVA.....	50
Figura 4.11.2- Análise do número total de células nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	51

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Resposta Imune Adaptativa.....	1
1.2- Timo e desenvolvimento de linfócitos T.....	2
1.3- Ativação de células T.....	4
1.4- Células T CD8.....	7
1.5- Perfis efetores dos linfócitos T CD4.....	9
1.6- Células T regulatórias.....	11
1.7- A família de fatores de transcrição NFAT.....	13
1.8- A proteína IRF2BP2.....	14
2- OBJETIVOS.....	18
2.1- Objetivo Principal.....	18
2.2- Objetivos específicos.....	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1-Animais.....	19
3.2- Cultura de células.....	19
3.3- Anticorpos e citocinas recombinantes.....	19
3.4- Contagem celular.....	21
3.5- Purificação de células T CD4.....	21
3.6- Análise de expressão gênica por PCR em tempo real.....	21
3.7- Imunofluorescência.....	22
3.8- Diferenciação <i>in vitro</i> de linfócitos T CD4 em culturas Th1, Th2 e Th17.....	23
3.9- Imunofenotipagem.....	23
3.9.1- Marcação intracelular para citocinas.....	24
3.9.2- Marcação intracelular para o fator de transcrição Foxp3.....	24
3.10- Sensibilização dos animais com Ovalbumina.....	25
3.10.1- Ensaio de proliferação celular.....	25
3.11- Análise estatística.....	26
4- RESULTADOS	
4.1 Modelo de estudo.....	27
4.1.1 Construções dos animais transgênicos condicionais para superexpressão de IRF2BP2.....	27
4.2- Caracterização da superexpressão da IRF2BP2 nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	28
4.3- Análise dos órgãos linfoides dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	31
4.4- Caracterização das populações linfocitárias nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	33
4.5- Caracterização da população de células T regulatórias (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺) nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺	35
4.6- Análise da população de células T CD8 semelhantes a memória CD44 ⁺ CD122 ⁺	36
4.7- Avaliação da expressão de marcadores de ativação em células T.....	37
4.8- Diferenciação das culturas de linfócitos T CD4 para os perfis efetores Th1, Th2 e Th17.....	42
4.9- Diferenciação das culturas de linfócitos T CD4 sem indução da polarização.....	45

4.10- Análise das subpopulações linfocitárias dos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺ em resposta ao desafio antigênico.....	46
4.11- Análise da proliferação celular nos animais IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁻ e IRF2BP2 ^{fl/fl} Lck-cre ⁺ desafiados com antígeno específico.....	49
5-DISSCUSSÃO.....	52
6- CONCLUSÕES.....	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8- ANEXO	70

1- INTRODUÇÃO

1.1- Resposta imune adaptativa

A resposta imune pode ser dividida em resposta imune inata e resposta imune adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra microrganismos, caracterizada pela sua rapidez de atuação, iniciando a resposta protetora imediatamente após o contato com o patógeno invasor (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; TURVEY & BROIDE, 2010).

A resposta imune adaptativa é a resposta mediada por linfócitos B e linfócitos T. Essa resposta tem como características especificidade, capacidade de distinguir o *self* do *non-self* e geração de memória imunológica, através de exposições repetidas ao mesmo antígeno. Respondendo mais intensamente a exposições repetidas do mesmo antígeno. A resposta mediada pelos linfócitos B é chamada de resposta imune humoral e aquela mediada por células T é denominada resposta imune celular.

As células T são classificadas em linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8, possuindo funções efetoras distintas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Os linfócitos T são essenciais no combate a patógenos intracelulares e extracelulares, seja com a função citotóxica ou auxiliando a ativação de outras células imunes. Linfócitos T CD8 e T CD4 reconhecem os antígenos, que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) principalmente as células dendríticas (DCs), na forma de peptídeos, via MHC (*Major histocompatibility complex*) de classe I e classe II, presentes na superfície das APCs.

Os linfócitos T CD4, também chamados de linfócitos T *helper* (Th), são os primeiros a serem ativados e assumem diferentes perfis de respostas, dependendo dos sinais recebidos pelas APCs.

Os linfócitos T CD8, também conhecidos como linfócitos T citotóxicos, são importantes no combate à infecção com organismos intracelulares, infecção viral e câncer. Estes são especializados em, ao identificar seus alvos, combatê-los através da indução da morte celular programada. O combate pode ser realizado por duas vias: produção e liberação de proteínas efetoras e aumento da produção de FasL.

Para que se tenha uma ação T citotóxica eficiente, é necessário uma resposta T CD4 adequada, pois citocinas produzidas por células T CD4 irão auxiliar na ativação dos linfócitos T CD8.

Os linfócitos B são os responsáveis pela imunidade humoral, através da produção e secreção de anticorpos. A resposta de células B também é auxiliada por uma ativação células T CD4 de maneira eficaz, o que confere a estas células um papel fundamental na resposta imune adaptativa.

1.2- Timo e desenvolvimento de linfócitos T

A partir das células tronco hematopoiéticas, são gerados na medula óssea os precursores dos linfócitos T. Estes migram para o timo para que possam se desenvolver. O timo é um órgão linfóide primário responsável pelo estabelecimento inicial de um repertório funcional de células T. Durante a ontogenia dos linfócitos T no timo ocorre a migração, proliferação, diferenciação e seleção dos linfócitos T em desenvolvimento, de forma que estes possam sair do timo para os órgãos linfoides periféricos T (SAVINO, 2006).

Para que ocorra a maturação dos timócitos no timo, estes passam pelo rearranjo e expressão de genes do receptor de células T (TCR) e dos co-receptores CD4 e CD8, proliferação, seleção negativa e positiva.

Os progenitores imaturos sofrem diferenciação, que é dividida em seis estágios de maturação antes de a célula expressar altos níveis de CD4 ou CD8. No primeiro estágio as células são duplo-negativas (DN), não expressando os co-receptores CD4 e CD8. A população DN ainda pode ser dividida em quatro sub estágios de acordo com a expressão de CD117 (cKit), CD44 (molécula de adesão) e CD25 (cadeia α do receptor de IL-2), expressando diferentes combinações destas ao longo da diferenciação tímica (GODFREY *et al.*, 1993). Células no estágio DN1 são definidas fenotipicamente como CD117⁺CD44⁺CD25⁻, no estágio DN2 são definidas fenotipicamente como CD117⁺CD44⁺CD25⁺, DN3 são definidas fenotipicamente como CD117⁻CD44⁻CD25⁺ e no estágio DN4 são definidas fenotipicamente como CD117⁻CD44⁻CD25⁻. No quinto estágio, os timócitos são denominados duplo-positivos, expressando CD4 e CD8 e, então, no último estágio, são as células simples-positivas (SP), expressando CD4 ou CD8 (GODFREY *et al.*, 1993; GERMAIN, 2002; CIOFANI & ZÚNIGA-PFLÜCKER, 2006).

Timócitos imaturos ainda não expressam as cadeias α e β do TCR, as cadeias CD3 e a cadeia ζ ou os co-receptores CD4 e CD8 (RAMIALISSON, 2002). Os rearranjos do TCR se iniciam no estágio DN3 da maturação, com o auxílio das RAG 1 e RAG2 (*Recombinase-activating gene 1 e 2*). Ainda no estágio DN3, começa a

expressão da cadeia pré-TCR, emitindo sinais de proliferação e também estimulando a recombinação da cadeia α do TCR (SHAH & ZÚÑIGA-PFLÜCKER; 2014).

Para que ocorra rearranjo do TCR nos timócitos, as células que não expressam CD44, mas, expressam CD25 passam por um processo denominado seleção β (SHAH & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2014). No estágio DN4, ocorre expressão das proteínas RAG1 e RAG2 que são importantes para o rearranjo das cadeias VDJ do TCR, inicialmente as células T apresentam um TCR não funcional, os rearranjos dessas cadeias, ocasionam em um TCR funcional. A recombinação do TCR ocorre pela ativação dos genes das recombinases RAG1 e RAG2, com o objetivo de aumentar a heterogeneidade das células T (ANDERSON *et al*, 2006).

A seleção positiva ocorre com os timócitos DP. Estes, interagem com os complexos peptídeo-MHC que são expressos pelas células epiteliais tímicas corticais (cTEC) através do seu TCR. Uma interação de baixa avides do TCR com o complexo peptídeo-MHC ocasiona em sinais de sobrevivência e diferenciação em linfócitos SP. A seleção positiva aumenta o número de linfócitos que são reativos somente a antígenos estranhos. No entanto, a seleção com alta avides, causa a morte destes linfócitos (YANG *et al.*, 2005).

Na seleção negativa, ocorre o reconhecimento da capacidade dos linfócitos em reagir contra auto-antígenos. A apresentação de antígenos ocorre via APCs, assim linfócitos com alta avides contra auto-antígenos, sofrem apoptose, desta forma, evitando a autoimunidade, sendo caracterizado como desenvolvimento de tolerância central. Aproximadamente 95% dos linfócitos sofrem apoptose durante o processo de seleção negativa e positiva (REZZANI, BONOMINI, RODELLA, 2008; MATHIS & BENOIST, 2009).

Timócitos que reagem com afinidade adequada sobrevivem e fazem parte do *pool* de linfócitos T periféricos maduros e *naive* simples positivos para CD4 ou CD8, que circulam na periferia. Estes linfócitos circulantes, ao encontrar um antígeno estranho apresentado pelas APCs via MHC em órgãos linfoides secundários, são ativados e diferenciados. Tal processo será discutido no tópico seguinte.

Um esquema geral do desenvolvimento das células T no timo está representado na Figura 1.1.

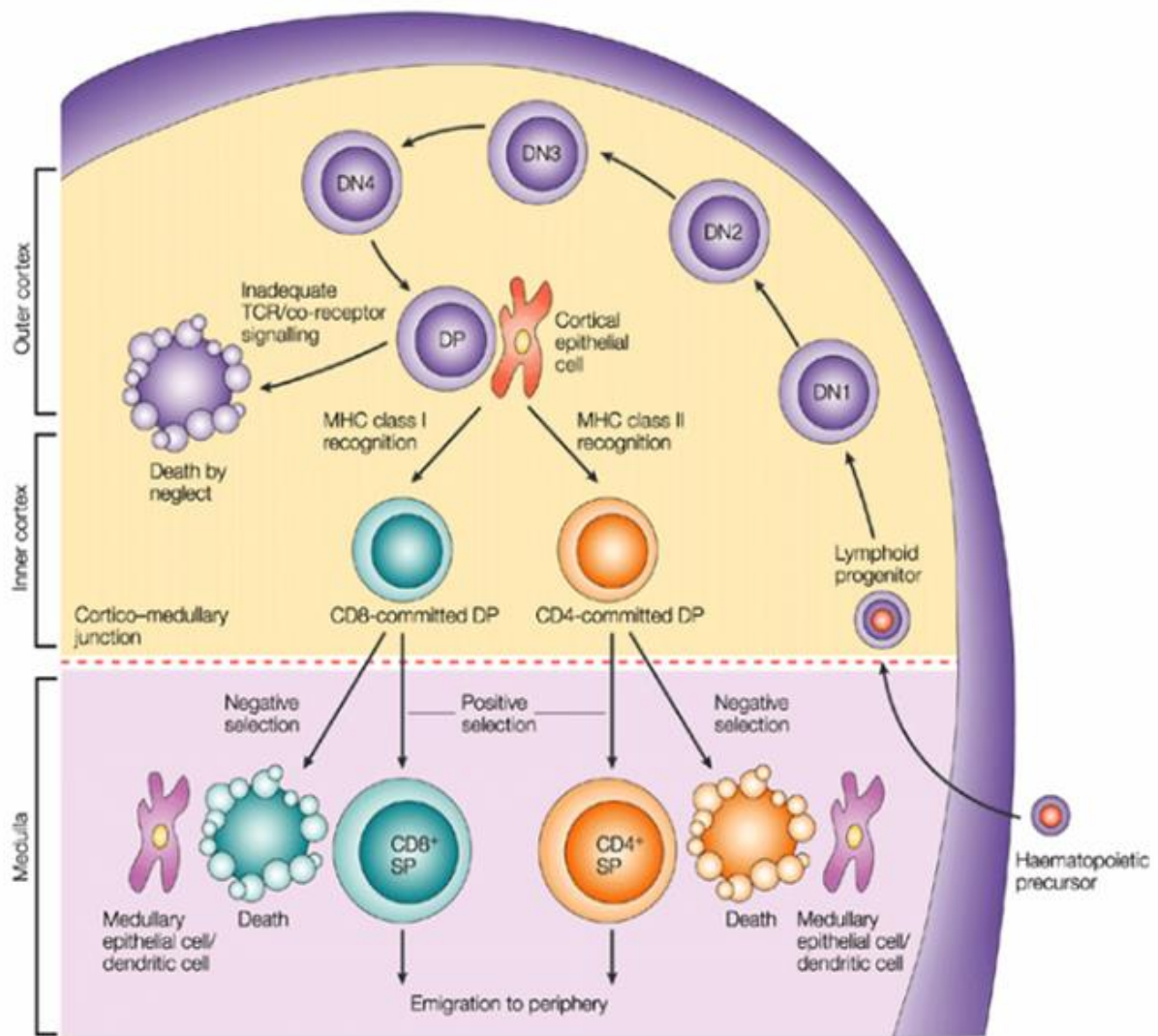


Figura 1.1- Esquema geral do desenvolvimento das células T no timo. Os progenitores mielóides se originam na medula e migram para o timo, para que por processos de maturação possam migrar para periferia como linfócitos T maduros. Esse processo é caracterizado por quatro estágios: Estágio duplo-negativo, estágio duplo-positivo, seleção positiva e seleção negativa (GERMAIN, 2002).

1.3- Ativação de células T

Linfócitos T *naive* localizados nos órgãos linfoides secundários são ativados mediante a apresentação de antígenos pelas APCs via moléculas de MHC. MHC de classe I para ativação de células T CD8 e MHC de classe II para células T CD4.

Esta ativação ocorre em 3 etapas: a primeira denominada primeiro sinal de ativação, ocorre a partir da interação do TCR com o complexo peptídeo-MHC. Para que o primeiro sinal ocorra de forma eficaz, o TCR é associado a proteínas transmembrana denominadas CD3. Estas possuem a função de traduzirem o sinal de ligação do complexo peptídeo-MHC em sinais intracelulares. Os domínios

intracelulares das cadeias CD3 possuem motivos de ativação baseados em tirosinas e domínios citoplasmáticos denominados ITAM (*Immuno receptor tyrosin-based activation motif*) (KUHNS, DAVIS, GARCIA, 2006). Ainda para que a sinalização ocorra de forma adequada, é necessária a atividade das quinases da família Src, Fyn (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) e Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), sendo esta última a principal. A Lck se associa às caudas citoplasmáticas de CD4 ou CD8 e se localiza próxima aos ITAMs nas cadeias CD3 ζ , fosforilando os resíduos das tirosinas nas ITAMs das cadeias CD3. Após a fosforilação dos resíduos de ITAM na porção citoplasmática do complexo TCR, ocorre o recrutamento da proteína quinase ZAP-70 (*ζ associated protein of 70kDa*) (KUHNS, DAVIS, GARCIA, 2006).

ZAP-70 fosforila suas moléculas alvo, como a proteína adaptadora LAT (*Linker for the activation of T cells*) e SLP-76 (*Src homology 2 domain containing leucocyte phosphoprotein of 76k Da*). Após sua fosforilação, recrutam diferentes proteínas sinalizadoras ativando vias de sinalização que regulam a maioria das repostas via TCR (SAMELSON, 2002)

Uma importante via de sinalização é a de PCL γ 1 (*Phospholipase C γ 1*); LAT se liga a PCL γ 1 e a ativação de PCL γ é dependente de ITK, (Tirosina Kinase induzida por IL-2), que por sua vez é dependente de LCK, Zap-70, LAT, SLP-76. Sua ativação ocasiona a hidrólise de PIP2 (Fosfatidilinositol-(4,5) bifosfato), produzindo os mensageiros IP3 (*Inositol trisphosphate*) e DAG (*Diacylglycerol*), que são essenciais para funções das células T. A ativação de DAG ativa duas vias importantes, são elas: RAS (*Rat sarcoma viral oncogene*) e PKC θ (*Protein kinase C theta*). A via de RAS está envolvida na ativação de importantes fatores de transcrição de células T como o complexo de transcrição AP-1 (*Activator protein 1*) (SMITHI-GARVIN, KORETZKY, JORDAN, 2009).

PKC θ possui importante função na ativação de NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), ativando genes envolvidos na atividade, sobrevivência e homeostase das células T.

O IP3 gerado pela atividade de PCL γ 1 tem como função principal estimular os receptores de abertura dos canais de cálcio, ocasionando o aumento de cálcio citoplasmático. O aumento de cálcio via TCR resulta na ativação de fatores de transcrição dependentes de cálcio e calmodulina. Dentre esses podemos citar o NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) que sofre defosforilação, a partir da calcineurina ativada. Sua defosforilação ocasiona a translocação para o núcleo,

onde ocorre a formação de diferentes complexos de transcrição em associação de NFAT. Dentre estes podemos citar a interação de NFAT com AP-1, que resulta na produção de IL-2, entre outras citocinas, com funções relacionadas à proliferação e ativação de linfócitos (VAN DER MERWE & DUSHEK, 2011).

O segundo sinal que é fornecido por moléculas co-estimulatórias. Ele ocorre a partir da interação das moléculas CD28 presente nos linfócitos T com as moléculas CD80/CD86 presentes na superfície das APCs, o que permite iniciar a proliferação das células T que reconhecem o antígeno apresentado. Este sinal tem como função amplificar o processo de sinalização intracelular desencadeado pelo primeiro sinal (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

O terceiro sinal ocorre através da produção de citocinas. Ao receber o primeiro e o segundo sinal, a célula T inicia a proliferação. Então, estas células começam a secretar IL-2, uma citocina importante que age por *feedback* positivo induzindo a célula T a proliferar mais. A ligação de IL-2 ao seu receptor ativa vias de sinalização, que induz a expressão de genes que induzem a célula T a proliferar mais, agindo como um fator de crescimento e diferenciação das células T.

Após a ativação das células T, é desencadeada a sua proliferação e expansão, na qual células T *naive* encontram com o antígeno em órgãos linfoides, geram clones e diferenciam-se em células T efetoras, secretando diferentes tipos de citocinas. Tema esse que será discutido detalhadamente na próxima seção.

Entretanto, após a eliminação do antígeno, linfócitos T efetores iniciam um processo de morte celular por apoptose, que pode ser causado pela ausência de estímulos ativadores ou pela morte celular induzida por ativação (AICD). Evento este, mediado pela ligação entre FAS e FASL (GREEN, 2008).

Porém, uma pequena população desses linfócitos que respondem aos antígenos específicos sobrevive no sistema imune e são denominados linfócitos T de memória. Tais células são responsáveis por uma resposta mais rápida e eficaz em um posterior contato com o mesmo antígeno (KUROSAKI, KOMENTANI, & ISE, 2005).

Um esquema da ativação via complexo TCR está representado na Figura 1.2.

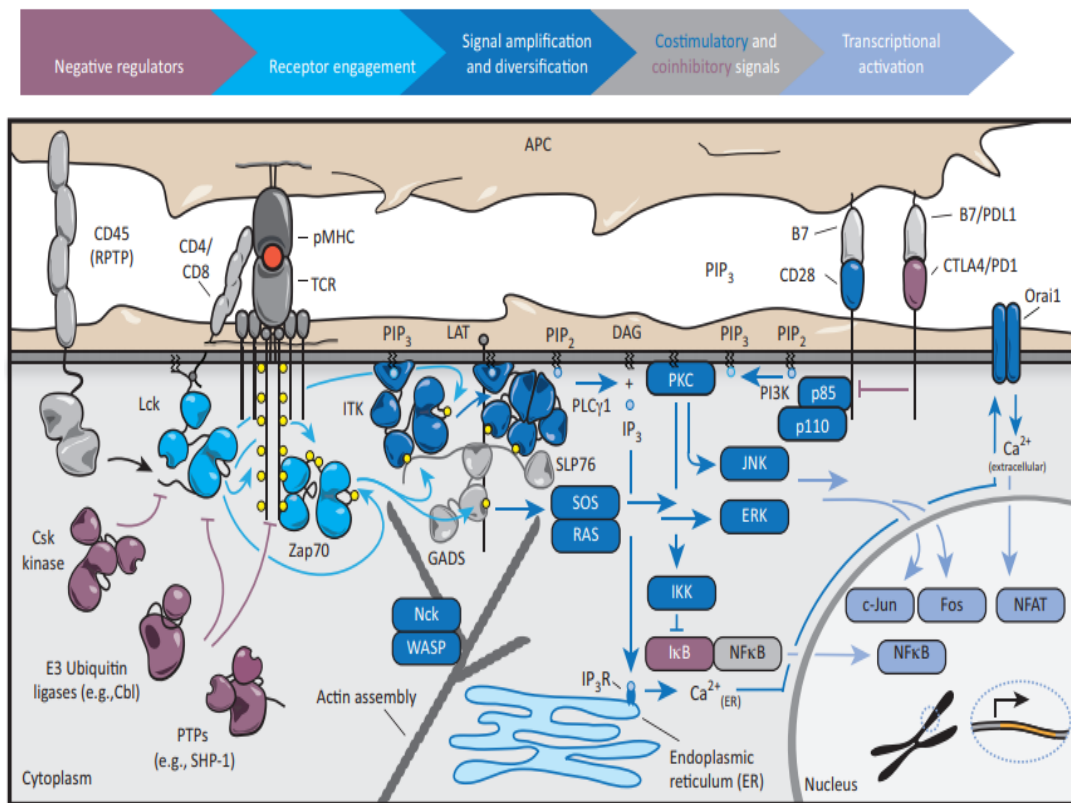


Figura 1.2- Sinalização via complexo TCR. Representação esquemática das vias de sinalização iniciadas após a ativação do complexo TCR. Figura extraída de (COURTNEY, LO, WEISS, 2018)

1.4- Células T CD8

Os linfócitos T CD8 ou T citotóxico desempenham atividades efetoras importantes para eliminação de patógenos intracelulares (SHRESTA *et al.*, 1998). São capazes de reconhecer a sinalização via MHC I e desempenham suas funções efetoras através de dois mecanismos. Um mecanismo é caracterizado pela secreção de perforina, uma proteína capaz de gerar canais transmembranares na célula-alvo e secreção de granzima B, que penetra nas células a partir dos poros formados. Esta citotoxina ativa a cascata proteolítica das caspases que levam à apoptose da célula alvo (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008). O segundo mecanismo efetor das células T CD8, ocorre mediado por Fas/FasL. A estimulação via TCR pode induzir a expressão de FasL nas células ativadas, este interage com Fas, presente nas células alvo. Essa interação provoca a ativação de caspases nas células alvo, ocasionando apoptose nestas. As células efetoras também possuem a capacidade não só de eliminar as células-alvo, mas, também participam da proteção do organismo através da produção de citocinas incluindo, IFN- γ e o fator de necrose

tumoral (TNF) que promovem a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos (RUSSEL & TIMOTHY, 2002).

Após a eliminação do antígeno, uma pequena população de células efetoras, aproximadamente 5 a 10% de células sobrevivem, e estas são as células que formam a memória imunológica. As células de memória possuem vida longa e são geradas a partir de uma resposta imune antígeno específica, durante a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos em resposta a uma estimulação (AHMED & GRAY, 1961).

Os linfócitos de memória proporcionam uma resposta mais eficaz e robusta, quando comparados aos linfócitos T *naive*, em resposta a um segundo contato com o mesmo antígeno (AHMED & GRAY, 1961). Estas células também se diferem das células T *naive* por possuírem a capacidade de serem ativadas por uma quantidade menor de antígeno (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2001). As células T de memória podem se dividir em três populações: células T de memória efetora, células T de memória central e células T de memória residente.

As células T de memória central se caracterizam pela alta expressão de CD62L. Esta é uma selectina responsável pela interação dos linfócitos com o endotélio das vênulas endoteliais altas. Residindo principalmente em órgãos linfoides periféricos, auxiliando na geração das células T efetoras, uma vez que não são capazes de penetrar em tecidos linfoides. Já as células T de memória efetora são caracterizadas pela alta expressão de CD62L e atuam nos órgãos e nos locais de possível contato com o antígeno, para que em um segundo contato com o mesmo antígeno, estas possam responder de forma mais rápida e eficaz (CAMPBELL, 1998; MAcLEOD, 2009). Outra molécula importante neste contexto é o CD44 que é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, e está presente em células T ativadas ou que já foram ativadas, como é o caso das células de memória (KAECH & CUI, 2012).

Além das células T CD8 descritas anteriormente, existe uma população de células T CD8 que adquirem funções em virtude do seu processo de maturação e não através da ativação antigênica. Recentemente foi descrito uma subpopulação de células T CD8 que possuem características de células de memória como a expressão de CD44 e CD122 e também compartilham características de células inatas, uma vez que possuem a capacidade de secretar IFN- γ rapidamente (KAMBAYASHI *et al.*, 2003). Estas possuem o fenótipo de células T CD8 de memória, entretanto, possuem função de células inatas. Essas células são

denominadas células de memória inata quando originadas do timo ou memória virtual, quando originadas na periferia (JAMESON *et al.*, 2009). Outra característica importante dessa população de células T CD8 inatas é possuir todas essas características sem o contato prévio via TCR com o MHC:antígeno (PRINCE *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2017).

1.5- Perfis efetores dos linfócitos T CD4

Células T CD4, desempenham um papel fundamental na resposta imune adaptativa. Estas células *naïve*, nos tecidos linfoides periféricos, são ativadas por antígenos via MHC II. Após a ativação, estas células sofrem expansão clonal e se diferenciam em diversos perfis efetores. Essa expansão é mediada pela produção de IL-2 produzidas pelas próprias células T CD4. Os sinais recebidos na ativação dos linfócitos ativam diferentes vias de sinalização intracelular, que ocasionam a ativação de fatores de transcrição, promovendo a diferenciação destas células para os perfis efetores.

As sinalizações através de receptores de citocinas ativam principalmente as vias de sinalização das proteínas transdutoras de sinal JAK (*Janus Kinase*) e dos fatores de transcrição da família STAT (*Signal transducers and activators of transcription*) (IHLE, 1995).

As STATs constituem uma importante família de fatores de transcrição que participam no processo de diferenciação dos perfis efetores das células T CD4. As STATs se localizam no citoplasma da célula e são fosforiladas pela família JAK de tirosina-cinases. Ao serem fosforiladas as STATs se dimerizam e translocam para o núcleo, onde regulam a expressão gênica de diferentes tipos celulares envolvidos na diferenciação das células T (KAPLAN, 1996).

As células T CD4, também chamadas de células T *helper*, possuem como função auxiliar as células B a produzirem anticorpos, aumentar a resposta das células T CD8, regular as funções dos macrófagos e também podem assumir um perfil regulatório importante na proteção contra doenças auto imunes. Dentre estes perfis os estudados neste trabalho são os perfis efetores Th1, Th2 e Th17 (SMITH-GARVIN, KORETZYSKY, JORDAN, 2009).

O perfil Th1 produz principalmente a citocina IFN- γ , e é caracterizado pela expressão do fator de transcrição T-bet. A resposta Th1 é importante contra patógenos intracelulares. Células Th1 produzem altos níveis de IFN- γ , que é

importante para a ativação de células T CD8 e também auxilia na atividade microbicida dos macrófagos. O IFN- γ secretado pelas células Th1 promove um *feedback* positivo nessas células induzindo a diferenciação Th1 e inibindo a diferenciação Th2 (ZHU, YAMANE, PAUL, 2009). No perfil Th1, a STAT1 é descrita como um potencializador dessa resposta. STAT1 é ativada por IFN- γ , que induz T-bet regulando a produção de IFN- γ , dessa forma aumentando a resposta Th1. STAT1 também induz a expressão do receptor de IL-12 nas células Th1 (AFKARIAN *et al.*, 2002). A IL-12 produzida pelas APCs ativa STAT4 que colabora com STAT1 na indução de IFN- γ e T-bet, reforçando o aumento da resposta Th1 (ZHU & PAUL, 2008).

A resposta Th2 participa das respostas imunes contra helmintos e alergias. Células Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4 e indução do fator de transcrição GATA-3. A sinalização via receptor de IL-4 ativa a via do fator de transcrição STAT6, que juntamente com os fatores NFAT, AP-1 e NF- κ B induz a transcrição do gene de IL-4 aumentando a resposta Th2 (CHUVPILO *et al.*, 1993; MACIAN *et al.*, 2000). Além disso, STAT6 é o principal transdutor de sinal envolvido na indução da expressão do fator de transcrição GATA-3, que promove a diferenciação para as células Th2 e inibe a diferenciação de células para o perfil Th1. Foi demonstrado que a deleção de GATA-3 diminui a diferenciação para o perfil Th2 (ZHU *et al.*, 2004).

O perfil Th17 tem como produção principalmente a citocina IL-17, que é considerada um potente mediador inflamatório e está envolvida na defesa extracelular contra bactérias ou fungos, e é associada a condições inflamatórias. A diferenciação para o perfil Th17 é caracterizada pela expressão do fator de transcrição ROR γ T, sendo induzido principalmente por TGF- β e IL-6. Células Th17 são frequentemente associadas como potencializadoras da inflamação, devido à produção de IL-17 (MANGNAN, 2006). A ativação de STAT3 é mediada por IL-6, IL-21 e IL-23, citocinas envolvidas na diferenciação para o perfil Th17. STAT3 induz a transcrição de ROR γ T que é determinante para a diferenciação Th17 (ZHU & PAUL, 2008).

Os processos de diferenciação de linfócitos T descritos acima são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imunológica, entretanto, mecanismos de controle são indispensáveis para um perfeito funcionamento do sistema imune. Um dos mecanismos de controle é caracterizado pela ação da célula T regulatória, que será discutida em mais detalhe no item a seguir. Um esquema

representativo dos principais estímulos e fatores envolvidos na diferenciação T *helper* estão representado na Figura 1.3.

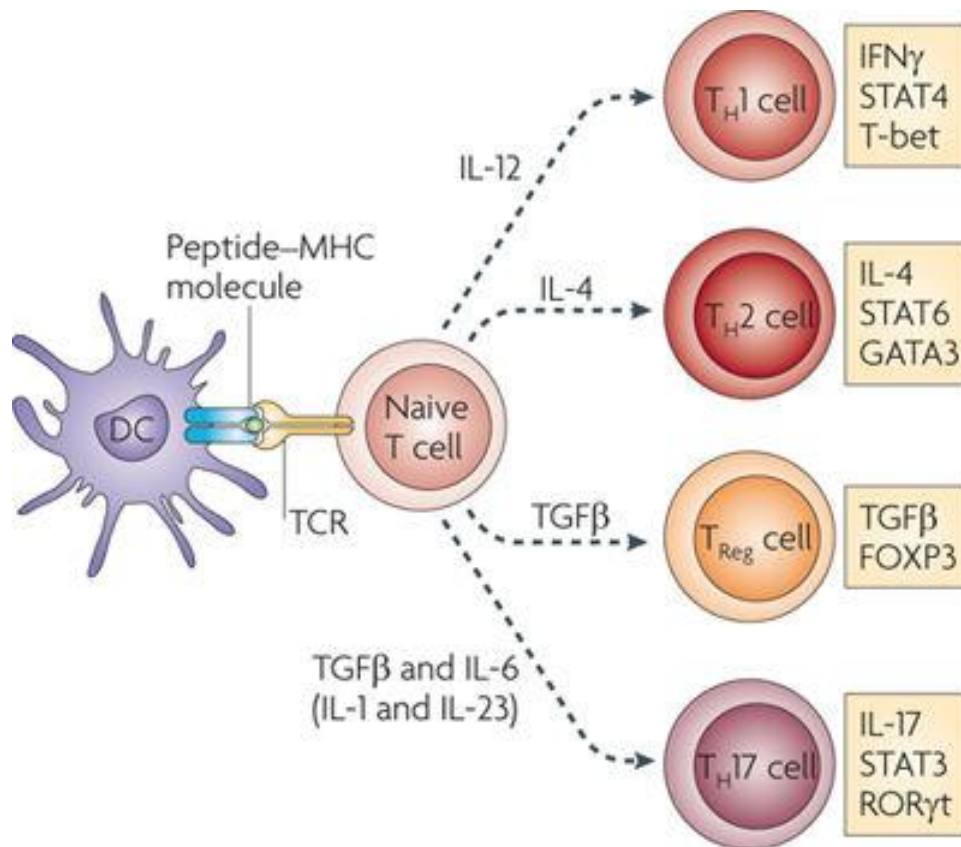


Figura 1.3-Diferenciação de linfócitos T *helper*- Representação esquemática da diferenciação de células T helper a partir de uma célula naiva. A caracterização de cada perfil efetor é determinada pela ativação de diferentes fatores de transcrição e citocinas produzidas sendo estes representado no quadro a direita. As setas à esquerda demonstram as principais citocinas necessárias para a diferenciação para cada perfil efetor. Figura de (ZOU & RESTIFO, 2011).

1.6- Células T regulatórias

Linfócitos T regulatórios são essenciais para a manutenção da homeostase do sistema imune, sendo fundamental na limitação da resposta imune efetora, na manutenção da tolerância periférica, na prevenção de doenças autoimunes e na contenção de doenças inflamatórias crônicas (TANG & BLUESTONE, 2008). Embora descrita em muitos trabalhos como células benéficas na prevenção de algumas doenças, entretanto, células T regulatórias também possuem um perfil deletério na fisiopatologia do câncer, facilitando que alguns tumores escapem da resposta imune antitumoral (CAO, 2010).

Desde a década de 70, havia evidências da existência de uma população de células T que seria capaz de reprimir a resposta imunológica (GERSHON & KONDO, 1970). Entretanto, em 1990 foi descrita uma nova população de células T CD4, que demonstrava uma pequena população de células apresentando em sua superfície altos níveis da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) em sua membrana. Esta população foi associada a um fenótipo supressor e, a partir de então, estas células foram denominadas células T regulatórias (Tregs) (SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

Células T regulatórias têm como característica principal a expressão do fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead box P3*), sendo este caracterizado como fundamental para o desenvolvimento, manutenção e funcionalidade regulatória das células CD4. Foxp3 é descrito como o principal fator de transcrição expresso em células T reg (FONTENOT, GAVIN, RUDENSKY, 2003). Além disso, Foxp3 e CD25 são descritos como essenciais para geração e manutenção destas células. TGF- β e IL-2 aumentam a expressão de Foxp3 através da fosforilação do complexo SMAD e STAT5, respectivamente (ZHOU *et al.*, 2009).

Mutações nesse gene podem levar à perda da capacidade supressora dessas células. Foi demonstrado que camundongos com mutação em Foxp3 não apresentam células Treg naturais e desenvolvem doenças autoimunes (BRUNKOW *et al.*, 2001; FONTENOT, GAVIN, RUDENSKY, 2003). Este fenótipo evidencia uma importante função das células Tregs FoxP3⁺ na manutenção da tolerância *in vivo*.

Células T regulatórias podem ser divididas em duas subpopulações: células T regulatórias tímicas e periféricas. As células T reg naturais (tTreg) são de origem tímica, se originando a partir de diferenciação de linfócitos T CD4 autoreativos. A sub população de células nTreg constitui de 5 a 10% dos linfócitos T CD4 circulantes. As células T reg periféricas (pTreg) são células que se originam na periferia a partir da diferenciação de linfócitos T maduros ao fenótipo Foxp3⁺ na presença de IL-2 e TGF- β (SAKAGUCHI, 2005; CHATILA, 2009; BILATE & LAFAILLE, 2012).

Diversos mecanismos de supressão são descritos para as células Treg, dentre eles: secreção de citocinas anti-inflamatórias e expressão de receptores inibitórios. Um dos principais mecanismos de supressão das células Treg se dá via secreção de citocinas, que as sub-classificam em mais duas subpopulações, produtoras principalmente de por IL-10, mais conhecidas como Tr1 e TGF- β , conhecidas como iTreg (VIGNALI, COLLISON, WORKMAN, 2008; LAFAILLE & LAFAILLE, 2009). IL-35 foi recentemente descrita como uma citocina inibitória,

expressa por células Treg e necessária para que ocorra a supressão completa da atividade imune (COLLISON *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de supressão mediado pelas células T reg, é o contato célula-célula, a partir da alta expressão de CTLA-4, que permite o contato das células T regulatórias com as APCs, se ligando as moléculas CD80/CD86 e inibindo a ativação dos linfócitos T (VIGNALI, COLLISON, WORKMAN, 2008). O CTLA-4 possui maior afinidade às moléculas CD80/CD86, quando comparado ao CD28 expresso pelas células T, assim ocasionando a supressão dessas células (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001).

Além disso, foi demonstrado que as células T reg também podem realizar supressão das células T auxiliares, através da inibição do acesso das células T auxiliares às DCs, diminuindo a capacidade das DCs em ativar as células T efetoras. A ligação das células T regulatórias às DCs, ocasiona na redução da proliferação e diferenciação das células T auxiliares (TANG & KURUMMEL, 2006).

Células Treg também contribuem para supressão da resposta imune através da competição com fatores de crescimento, como a IL-2, dificultando a ativação e proliferação das células T CD4 (TANG & BLUESTONE, 2008). Foi demonstrado que as células Treg privam as células T CD4 efetoras de sinais de crescimento, causando a morte por apoptose destas (LA ROSA *et al.*, 2004). Esse mecanismo a partir da privação de IL-2 ocorre em virtude de as células Treg possuírem uma alta expressão do CD25, consumindo a IL-2 presente no microambiente imune (CHINEN *et al.*, 2016).

No processo regulatório, IL-2 foi descrita como um importante indutor de Foxp3. A IL-2 se liga ao seu receptor, IL-2R, ativando as vias de JAK1-3/STAT5, que se desloca para o núcleo e induz a expressão de Foxp3 (CHINEN *et al.*, 2016).

As células Treg possuem função fundamental na manutenção da homeostase celular e são fundamentais na regulação da tolerância imune. A deficiência ou ausência de células Treg está associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

1.7- A família de fatores de transcrição NFAT

Após a ativação das células T, mecanismos distintos são ativados e promovem a translocação de diferentes fatores de transcrição para o núcleo, dentre eles o NFAT. A proteína NFAT, é expressa na maioria das células do sistema imune,

porém, já foi demonstrado sua expressão em outros tipos celulares (MACIAN, LOPÉZ-RODRIGUES, RAO, 2001).

A proteína NFAT faz parte de uma família de fatores de transcrição formada por cinco membros, NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 e NFAT5. NFAT1-4 é ativado por vias de cálcio (RAO, LUO, HOGAN, 1997), já NFAT5 é ativado por estresse hiperosmótico (LOPEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 1999).

Na ativação das células T, a via de $PLC\gamma 1$ tem função importante no aumento de cálcio citoplasmático. O aumento deste ativa uma serina-treonina fosfatase chamada calcineurina, que tem como função defosforilar NFAT, o que resulta em sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, NFAT interage com diferentes parceiros para a regulação da expressão gênica em diversas vias de diferenciação, proliferação e ativação celular.

NFAT interage com diferentes fatores de transcrição envolvidos na resposta de células T, dentre eles o principal é o AP-1. O AP-1 é um fator de transcrição envolvido na proliferação, transformação e morte celular. Outros fatores de transcrição envolvidos na ativação e diferenciação de células T como GATA-3 e Foxp3 são capazes de interagir com NFAT (MACIAN, LOPÉZ-RODRIGUES, RAO, 2001). Além disso, foi demonstrado sítios de ligação ao NFAT em regiões promotoras de diferentes citocinas, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ , dentre outras. Todas essas envolvidas na ativação e diferenciação de linfócitos (RAO, LUO, HOGAN, 1997).

Nosso grupo demonstrou diferentes funções para NFAT1 e NFAT2. Em células NIH3T3 foi observada uma função de gene supressor tumoral para NFAT1, enquanto que para NFAT2 foi observada uma função de oncogene (ROBBS *et al.*, 2008). Uma vez que foram demonstradas diferentes funções para isoformas de NFAT, nosso grupo investigou possíveis parceiros de interação desta proteína. Em um ensaio de duplo-híbrido em leveduras, utilizando a região C-terminal de NFAT1 como isca, foi demonstrado que 50% dos 35 clones identificados, mostrava a interação a proteína IRF2BP2. Estudos subsequentes do nosso grupo demonstraram a interação de IRF2BP2 (*Interferon regulatory factor-2 binding protein-2*) com NFAT1, que será descrito detalhadamente no item seguinte (CARNEIRO *et al.*, 2011).

1.8- A proteína IRF2BP2

Originalmente, a proteína IRF2BP2 foi descrita como uma proteína nuclear, co-repressora da atividade transcricional do fator IRF-2 (*Interferon regulatory factor 2*). A família da proteína IRF2BP2 é constituída pelas proteínas IRF2BP1 e IRF2BP2, sendo IRF2BP2 com duas isoformas em humanos, IRF2BP2A e IRF2BP2B (CHILDS *et al.*, 2003). Neste mesmo trabalho foi descrito que este mecanismo de co-repressão parece ser independente da acetilação de histonas, podendo ser resultado da prevenção da formação do complexo de iniciação da transcrição.

A proteína IRF2BP2 possui duas regiões conservadas, um dedo de zinco e um domínio RING, ambos descritos como importantes na capacidade de mediar a interação entre o DNA e outras proteínas (McCARTY *et al.*, 2003; VAQUERIZAS *et al.*, 2009).

A IRF-2 é um membro da família IRF (*Interferon regulatory factor*), que possui importante função da regulação da resposta de interferons do tipo I. Foi descrito que IRF-2 suprime a função de IRF-1 se ligando às mesmas sequências de ligação do DNA desta proteína, assim bloqueando sua função (HARADA *et al.*, 1989).

A função repressora de IRF2BP2, também foi descrita no contexto tumoral. IRF2BP2 atua como um gene alvo de p53, sendo capaz de impedir a transativação mediada por esta proteína de genes como p21 e Bax, promovendo um arresto do ciclo celular e diminuindo a indução da apoptose em situações de estresse celular (KOEPEL *et al.*, 2009).

No trabalho de YEUNG e colaboradores (2011), é demonstrado que o complexo proteico DIF-1, formado pela isoforma A da IRF2BP2 juntamente com IRF2BP1 e EAP-1, é capaz de proteger a indução da morte celular por apoptose em células de câncer de mama (YEUNG *et al.*, 2011)

Além disto, foi descrito que a depleção de IRF2BP2 em linhagens de eritroleucemia murina (MEL) leva a uma alteração na expressão de 2526 genes, dentre os quais destacam-se vários genes relacionados à diferenciação eritrocitária e genes relacionados à ativação de células sanguíneas e à proliferação de células T (STADHOUDERS *et al.*, 2015).

Embora a maior parte dos trabalhos demonstre a IRF2BP2 com função repressora, TENG e colaboradores demonstraram a IRF2BP2 como um co-ativador essencial para VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*) em células musculares.

Também foram demonstrados níveis aumentados da proteína em casos de isquemia, sugerindo um papel de IRF2BP2 como um co-ativador de VEGFA (TENG *et al.*, 2010).

Um trabalho do nosso grupo identificou a IRF2BP2 como parceira de NFAT1. Neste estudo foi mostrado que a interação da IRF2BP2 é específica com o fator de transcrição NFAT1, dentre os membros da família NFAT. Além disso, a superexpressão da IRF2BP2 em células T CD4 da linhagem Jurkat foi capaz de reprimir a transativação mediada por NFAT1 dos promotores dos genes de IL-2 e IL-4, o que também foi visto em linfócitos primários (CARNEIRO *et al.*, 2011).

Dados obtidos em outro trabalho do nosso laboratório demonstraram que a superexpressão de IRF2BP2 em células T CD4 leva a uma diminuição da proliferação celular após a ativação *in vitro* e uma redução da expressão de moléculas marcadoras de ativação CD25 e CD69 (SECCA *et al.*, 2016).

Na resposta imune mediada por células B, foi demonstrado que uma mutação em IRF2BP2 em pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID), causa uma diminuição na produção de plasmoblastos *in vitro*. Este dado sugere um possível papel de IRF2BP2 sobre a diferenciação de células B (KELLER *et al.*, 2016).

Foi descrito por CHEN e colaboradores (2015) a associação de IRF2BP2 com macrófagos, associando a proteína ao perfil M2 e promovendo a expressão de genes anti-inflamatórios. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que ausência de IRF2BP2 em camundongos leva a um agravamento da aterosclerose (CHEN *et al.*, 2015). Em um trabalho recente do mesmo grupo, foi demonstrado que a perda de IRF2BP2 na microglia leva ao aumento de citocinas inflamatórias. Também foi demonstrado que a expressão de IRF2BP2 em macrófagos tem função importante para redução da inflamação, assim limitando o acidente vascular cerebral mediado pelo efeito positivo de IFN- β (CRUZ *et al.*, 2017).

Na resposta imune anti-tumoral foi proposto que o aumento de IRF2BP2 reprime a transcrição de PD-L1 (*Programmed death-ligand*) após a estimulação via IFN- γ . PD-L1 é o principal ligante de PD-1. O aumento de PD-1 é associado à perda da função de células T. O bloqueio de PD-L1 ocasiona uma restauração das funções efetoras das células T, melhorando a resposta imune (BHADRA *et al.*, 2011). IRF2BP2 ocasionando uma diminuição de PD-L1 sugere que altos níveis desta proteína podem estar relacionados a uma melhor ação efetora de células T, na resposta imune anti-tumoral (DORAND *et al.*, 2016). Além disso, em outro trabalho

foi descrito que a baixa expressão de IRF2BP2 está associada a um aumento do PD-L1 em linhagens de célula de câncer de mama (SOLIMAN, KHALIL, ANTONIA, 2014).

A IRF2BP2 já foi descrita em diversos contextos biológicos, entretanto, ainda possui poucos estudos no contexto imunológico, tornando a caracterização do seu envolvimento na resposta imune pouco compreendida. Particularmente, são necessários novos estudos sobre a associação da IRF2BP2 a um contexto regulatório e o seu envolvimento em diferentes etapas da resposta imune. O presente trabalho propõe avaliar os possíveis efeitos desempenhados pela proteína IRF2BP2, *in vivo*, para que possamos compreender melhor, o seu papel na resposta imune associada a esta proteína. Para isso, ao longo do presente trabalho, utilizaremos animais transgênicos condicionais para a superexpressão de IRF2BP2 em linfócitos T com o objetivo de entender quais os efeitos dessa proteína em uma resposta imune eficiente. Seguindo esta linha de raciocínio, o presente trabalho propôs-se a realizar uma caracterização dos animais transgênicos para analisar os possíveis papéis de IRF2BP2 desempenhados na ativação, diferenciação e resposta de células T.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar os papéis da proteína IRF2BP2 na resposta imune *in vivo*.

2.2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1- Caracterizar as populações linfocitárias em órgãos linfoides centrais e periféricos nos animais transgênicos que supereexpressão a proteína IRF2BP2 em linfócitos T.

2.2.2- Avaliar o envolvimento da IRF2BP2 na ativação e diferenciação de linfócitos T.

2.2.3- Caracterizar a resposta imune *in vivo* dos animais transgênicos para IRF2BP2 em resposta a antígeno específico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados para todos os experimentos os camundongos IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ entre 8 e 12 semanas. A nomenclatura dos animais transgênicos está descrita no item 4.1. Os animais foram mantidos no biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), conforme as normas de ética estabelecidas pelo governo brasileiro. Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais para experimentação foram aprovados pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INCA sob o protocolo nº 004/13. A cópia da carta de aprovação pelo CEUA se encontra no ANEXO 1.

3.2- Cultura de células

Para as culturas de células T CD4, utilizamos meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1x vitaminas MEM, 1x L-glutamina, 1x aminoácidos MEM essenciais e não essenciais, HEPES (10mM), β-mercaptoetanol (55μM), 1x penicilina (100.000 u/L) e estreptomicina (10 u/L), todos Gibco. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3- Anticorpos e citocinas recombinantes

Na Tabela 3.1 estão listados os anticorpos utilizados nas marcações para citometria de fluxo com suas especificidades, clones e empresas fornecedoras.

Tabela 3.1 – Lista de anticorpos utilizados

Anticorpo	Clone	Empresa
Anti-CD3	17A2	eBioscience
Anti-B220	RA3-6B2	BD Pharmigen
Anti-CD4	L3T4/GK1.5	BD Pharmigen
Anti-CD8	53-6.7	eBioscience
Anti-IFN γ	XMG 1.2	BD Pharmigen
Anti-IL-4	11B11	Invitrogen
Anti-IL-17	eBio 11B7	eBioscience
Anti-CD25	PC61.5	eBioscience
Anti-Foxp3	FJK16s	eBioscience
Anti- CD62L	MEL.14	eBioscience
Anti-CD44	IM7	eBioscience
Anti-CD69	H1.2F3	eBioscience
Anti-CD122	5H4	eBioscience
Anti-CD28	37.51	BD Pharmigen
Anti-CD3	145-2C11	BD Pharmigen
Anti Ki67	SolA15	eBioscience

Todas as marcações foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. Os anticorpos neutralizantes anti-IFN- γ (XMG1.2) e anti IL-4 (11B11) utilizados nas culturas de células foram purificados a partir do sobrenadante de cultura de hibridomas, em colunas de sefarose com afinidade por imunoglobulina do tipo IgG, segundo especificações do fabricante (GammaBind G Sepharose, Amersham Biosciences).

Os anticorpos anti-CD28 (37.51) e anti-CD3 (145-2C11) foram obtidos da empresa Pharmigen. O revestimento das placas foi realizado com anticorpo anti-IgG policlonal obtido da empresa Cappel.

No protocolo de diferenciação *in vitro* de células T CD4 foram utilizadas as seguintes citocinas recombinantes: IL-2; IL-4; IFN- γ ; IL-12; IL-6 e TGF- β todas obtidas da empresa PeproTech.

3.4- Contagem celular

As células dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram submetidas a contagem manual em câmara de Neubauer, por coloração com azul de trypan 0,4%, em solução salina, com exclusão de células não viáveis.

3.5- Purificação de células T CD4

Células dos linfonodos cervicais, braquiais, axilares e inguinais de animais *naive* foram purificadas por coluna magnética de seleção negativa (Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells Kit; Invitrogen) para obtenção de células T CD4 totais, segundo as especificações do fabricante. Para avaliação do grau de pureza, essas células foram analisadas por citometria de fluxo através de marcação com anticorpos específicos para CD4 e CD8. Após a purificação, as células foram cultivadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL de meio em poços de placas de cultura inicialmente tratadas com 0,3mg/mL de anti-IgG produzido em cabra, adsorvido na placa e ativadas com 1µg/mL de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para o estímulo. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ durante o tempo necessário para cada estímulo realizado.

3.6- Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

O RNA total foi extraído de células T CD4 totais ativadas *in vitro*. Para a extração do RNA total foi utilizado TRIzol (Invitrogen), conforme a descrição do fabricante. A pureza e integridade do RNA foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% com marcação de brometo de etídio. O RNA extraído foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) por RT-PCR. A reação enzimática de transcrição reversa foi realizada utilizando o Kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. As análises de expressão gênica para o gene *Irf2bp2* foram realizadas por PCR em tempo real, no sistema *TaqMan Gene Expression Assay* (Life Technologies). Utilizamos 10ng de cDNA, sintetizado para cada reação. A reação foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram utilizados oligonucleotídeos e sondas específicas para o gene *Irf2bp2* e para o gene *Hprt* (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase), que foi utilizado como gene repórter. Para a análise do gene

da *Irf2bp2* foi utilizada a sonda TaqMan Mm01239804_g1. Para o gene *Hprt* foi utilizada a sonda TaqMan Mm 01545399_m1. As sondas utilizadas para os genes testados eram conjugadas a fluoróforos FAM. Os primers utilizados nas reações para quantificação relativa foram obtidos da empresa Applied Biosystem. O método utilizado para a análise foi a quantificação relativa de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para os níveis de mRNA obtidos nas células T CD4 ativadas dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ em comparação com as células T CD4 ativadas dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻.

3.7- Imunofluorescência

Para a realização da imunofluorescência, placas de 24 poços (Biofil) e lamínulas de 13mm (Knutell Glass) foram previamente tratadas com Poly-D-Lysine (1mg/mL; Sigma) diluído em água Milli-Q e utilizado na concentração de 1:25. Foi adicionado 200µL em cada poço da placa de 24 poços. E incubado *overnight* a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente as placas e lamínulas foram lavadas com 500µL de água Milli-Q estéril e colocadas em fluxo laminar sob luz UV por duas horas. Células T CD4 *naive* obtidas dos linfonodos cervicais, braquiais, axilares e inguinais dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, foram purificadas por coluna magnética como descrito anteriormente. Após a purificação 5x10⁴ células foram cultivadas *overnight* em meio DMEM 10% SFB e ativadas *in vitro* com PMA (Phorbol 12-myristato 13-acetato; Calbiochen) e ionomicina (Calbiochen) nas concentrações finais 10nM e 1µM, respectivamente. Após o estímulo, as células foram fixadas com paraformoldeído 4% (PFA), por 15 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com tampão de lavagem (PBS, *Phosphate buffer saline*) contendo SFB 5% e NP40 (Calbiochem) 0,5%) 5 vezes (5 minutos cada) sob leve agitação. Após as lavagens as células foram incubadas com o anticorpo anti-IRF2BP2 (Proteintech) na concentração (1µg/mL), por duas horas, à temperatura ambiente e posteriormente lavadas 5 vezes (5 minutos cada). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a rodamina (0,5mg/mL), diluída em tampão de lavagem, por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, seguida de 5 lavagens (5 minutos cada) com PBS. As células também foram coradas com DAPI (10mM), por 5 minutos preparadas em Vectashield (Vector) e as lamínulas foram montadas em laminas e analisadas no microscópio confocal de fluorescência FV10i (Olympus, Japão).

3.8- Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4 em culturas Th1, Th2 e Th17.

Células T CD4 *naive* obtidas dos linfonodos cervicais, braquiais, axilares e inguinais dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, foram purificadas e ativadas *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 como descrito no item anterior, na presença de citocinas e anticorpos neutralizantes que promovem condições polarizantes para cada um dos perfis efetores de acordo com o descrito a seguir:

Para as células sem polarização, usamos 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. Para diferenciação Th1, usamos 5 ng/mL de IFN-γ, 5 ng/mL de IL-12 e 20 µg/mL de anticorpo anti-IL4. Para diferenciação Th2, utilizamos 50 ng/mL de IL-4 e 100 µg/mL de anticorpo anti-IFN-γ. Para diferenciação Th17, utilizamos 5 ng/mL de TGF-β, 50 ng/mL de IL-6, 20 µg/mL de anticorpo anti-IL4 e 100 µg/mL de anticorpo anti-IFN-γ.

A partir do segundo dia após a ativação as células foram expandidas dobrando-se a área e o volume das culturas até o sexto dia de diferenciação. Foi realizada a transferência das culturas para placas cujos poços possuísem o dobro da área e a adição de mesmo volume para meio DMEM contendo IL-2 recombinante (20U/mL) para as culturas não diferenciadas, Th1 e Th2 ou em meio livre de IL-2 para as culturas Th17. As análises foram realizadas no sexto dia de diferenciação. Para a confirmação da polarização das culturas, foi realizada marcação intracelular para citocinas específicas para cada um dos perfis efetores.

3.9- Imunofenotipagem

Para as marcações de superfície, 2,5x10⁶ células dos linfonodos (braquiais, axilares e inguinais), do timo e do baço de animais *naive* IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram utilizadas para as análises fenotípicas. Células do baço dos animais foram maceradas e incubadas com solução ACK (0,15M NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 0,1mM Na₂ EDTA) para a remoção das hemácias e posteriormente lavadas 2x com PBS 1x. As células dos diferentes órgãos foram centrifugadas 400g por 7 minutos e ressuspensas em tampão PBS contendo 1% de BSA (*Bovine Serum Albumin*; Sigma) e 0,1% de azida sódica (tampão FACS). Posteriormente as células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos para as proteínas indicadas nos respectivos experimentos. Todas as marcações foram realizadas segundo as especificações sugeridas pelo fabricante. Após as

marcações as células foram lavadas 1x com PBS e ressuspendidas em tampão de FACS e fixadas com PFA a 2% por pelo menos 24h a 4°C, ou com PFA 4% em tampão FACS por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Para os ajustes das marcações, em paralelo foram preparadas células não marcadas e células marcadas com anticorpo individualmente, e as devidas compensações foram realizadas.

Para todos os experimentos realizados, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA). Os dados coletados foram analisados no programa FlowJo v.7.6.5 para Windows.

3.9.1- Marcação intracelular para citocinas

Para avaliar a produção de citocinas das células T CD4 diferenciadas *in vitro*, 3×10^6 células foram lavadas e ressuspendidas em 3mL de meio DMEM 10% SFB, e foram reestimuladas com PMA e ionomicina (Calbiochen) nas concentrações finais 10nM e 1µM respectivamente, por 6 horas a 37°C em estufa úmida com uma atmosfera de 5% de CO₂. Após 4 horas de estímulo, foi adicionada Brefeldina A na concentração de 10 µg/mL (eBioscience). Após o estímulo, as células foram lavadas e fixadas por 16 horas em uma solução de PBS contendo 2% de PFA. Após a fixação, as células foram recolhidas, lavadas e adicionadas o mesmo volume de tampão de permeabilização (PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de saponina; Sigma) por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a permeabilização, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos para marcação de IFN-γ, IL-4 ou IL-17, e incubados por 40 minutos a 4°C no escuro. Foram realizadas após as marcações, a lavagem das células, 1x em tampão de permeabilização e 1x em tampão de FACS. Por fim as células foram ressuspendidas em tampão FACS e analisadas por citometria de fluxo. As marcações foram realizadas utilizando as concentrações sugeridas pelo fabricante.

3.9.2- Marcação intracelular para o fator de transcrição Foxp3

Para avaliar a produção de células T regulatórias $2,5 \times 10^6$ células dos linfonodos e do baço dos animais *naive* IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25, segundo as especificações sugeridas pelo fabricante e subsequentemente centrifugadas a 400g por 7 minutos a

4°C e foram ressuspensas em solução de fixação e permeabilização do Kit para marcação intracelular para Foxp3 (eBioscience) por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em solução de permeabilização do mesmo Kit e marcadas por 40 minutos com os anticorpos específicos contra Foxp3. A marcação foi realizada seguindo as especificações do fabricante a 4°C, no escuro. Após a marcação foram realizadas duas lavagens em solução de permeabilização e por fim as células foram ressuspensas em tampão FACS para aquisição.

3.10- Sensibilização dos animais com Ovalbumina

Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram imunizados subcutaneamente na pata traseira com uma dose única de 100µl contendo 200µg de Ovalbumina (OVA; Sigma) na presença de adjuvante completo de Freund, com análise 10 dias depois. Após este período os linfonodos drenantes foram retirados e os linfócitos foram analisados para diferentes populações de proteínas de superfície e para citocinas intracelulares, assim como descrito anteriormente no item 3.9.

3.10.1- Ensaio de proliferação celular

Para o ensaio de proliferação celular foram utilizadas células dos linfonodos drenantes dos animais sensibilizados com OVA e re-estimuladas *in vitro* com OVA (0,5 µg/mL) por 72 horas em placa de 96 poços (Biofil) em estufa úmida a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram fotografadas em microscópio óptico de fluorescência Axionvision Observer Z1 (Zeiss, Alemanha). Também realizamos a marcação intracelular destas células com o anticorpo anti-Ki67. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4, segundo as especificações sugeridas pelo fabricante, e subsequentemente centrifugadas a 400g por 7 minutos a 4°C e foram ressuspensas em solução de fixação e permeabilização do Kit para marcação intracelular para Ki67 (eBioscience) por 16 horas. Após isso, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em solução de permeabilização do mesmo Kit e marcadas por 40 minutos com anticorpo específico contra Ki67 e então estas células foram analisadas por citometria de fluxo. A marcação foi realizada seguindo as especificações do fabricante a 4°C, no escuro. A expansão populacional foi analisada pelo método de contagem manual com

exclusão de células não-viáveis por coloração com azul de trypan 0,4% em solução salina.

3.11- Análise estatística

Foi utilizado o teste *t student* para as análises estatísticas entre os diferentes grupos de animais. Com um intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *GraphPad Prisma*. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando de *p* foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Modelo de estudo

4.1.1 Construções dos animais transgênicos condicionais para superexpressão de IRF2BP2

Foram gerados animais transgênicos condicionais para a superexpressão da proteína IRF2BP2 em colaboração com a Dra. Anjana Rao e Giuliana Mognol (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, EUA).

Para construção dos animais, o transgene da IRF2BP2 foi inserido no locus Rosa 26. O cDNA da IRF2BP2 foi amplificado a partir do vetor pLIRES-EGFP-mIRF2BP2 e inserido no sítio de restrição *Ascl* do vetor CTV. O vetor utilizado foi sequenciado, linearizado por enzimas de restrição e eletroporado em células-tronco embrionários murinas de background C57BL/6. Após a eletroporação, as células transfectadas foram selecionadas com o antibiótico G418. Os clones das células de interesse foram expandidos e após a expansão, o DNA genômico dos clones foi isolado e os clones foram congelados para a microinjeção nos blastocistos.

Para a confirmação da inserção do transgene no locus de interesse, foram realizados ensaios de PCR e *Southern blot* (dado não mostrado). Após a confirmação as células tronco foram injetadas em blastocistos de animais C57BL/6 e posteriormente implantadas em camundongos fêmeas pseudo-grávidas. Após o nascimento dos animais, estes foram testados para a presença do transgene de interesse através de PCR em tempo real. Foram desenhadas sondas específicas para a região do cassete de GFP, e foi confirmada a transmissão genética do transgene de interesse. Após a confirmação da expressão do transgene, os animais foram cruzados entre si para gerar animais homozigotos.

Os animais homozigotos foram posteriormente cruzados com camundongos Lck-Cre. Para a confirmação da superexpressão de IRF2BP2, realizamos a genotipagem da presença ou ausência de Cre por PCR convencional. Para todos os experimentos os animais foram genotipados após cada nascimento, para a verificação da expressão da IRF2BP2 e a recombinase Cre. Os desenhos dos *primers* utilizados são demonstrados na Tabela 3.1. Foi utilizado como nomenclatura IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ para o camundongo selvagem e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ para o

camundongo transgênico que superexpressa a proteína IRF2BP2 restrita em linfócitos T.

Tabela 4.1- Lista de *primers* utilizado na genotipagem dos animais.

<i>Primers</i>	Sequencia F	Sequencia R
GFP	CGTCGTCCTTGAAGAAGATGGT	CACATGAAGCAGCACGACTT
Rosa 26	TTCCCCTCGTGATCTGCAACTC	CTTTAAGCCTGCCAGAAAGACT
Cre	AGTTGAATAACCGGAAATGGTTT	CCTGTTTCACTATCCAGGTTACG

4.2. Caracterização da superexpressão da IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺

Como descrito anteriormente em Resultados (Item 4.1.1) foram gerados animais transgênicos condicionais para supressão de IRF2BP2. Na Figura 4.2.1 é demonstrado a construção dos animais. Antes do sítio de clonagem para o cDNA da IRF2BP2, existe um cassete de resistência a neomicina seguido por um códon de terminação, sendo esse cassete flanqueado por sítios loxP. Portanto a superexpressão de IRF2BP2 só ocorrerá após o cruzamento com os camundongos transgênicos que expresse a recombinase Cre, que removerá o cassete que contém o códon de terminação.

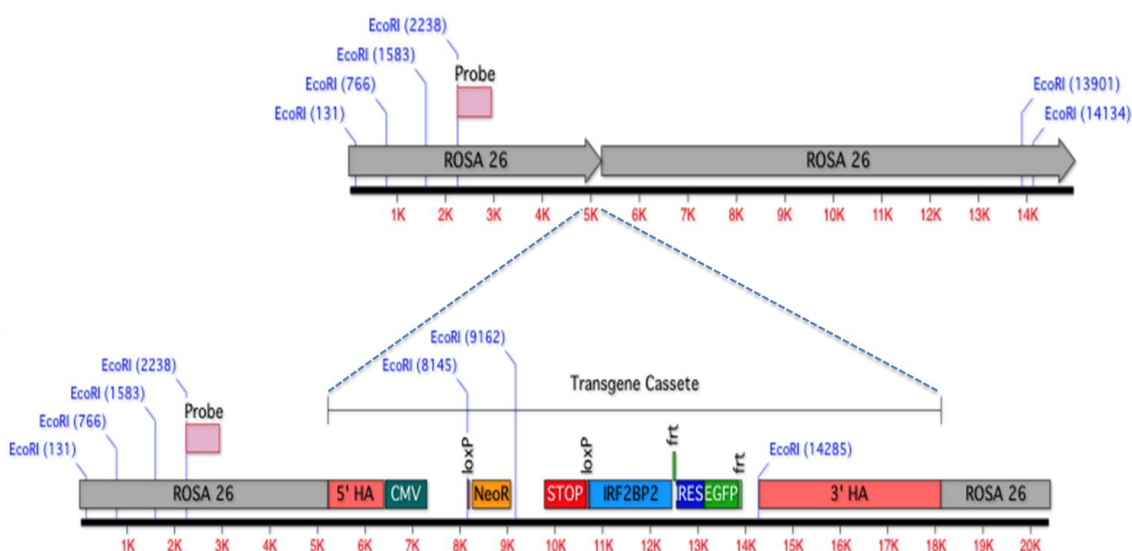


Figura 4.2.1 Representação esquemática da construção dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O gene de resistência a neomicina (neo) seguido por um códon de terminação (*stop* códon), ambos flanqueados por sítios loxP. cDNA de IRF2BP2, em sequência o sítio interno de entrada de ribossomo (IRES) e a região codificante para proteína verde fluorescente (EGFP), flanqueados por sítios frt.

Como observado na Figura 4.2.1, o transgene da IRF2BP2 possui uma entrada ribossomal seguida pelo gene que codifica GFP, sendo transcrito sempre que a IRF2BP2 é expressa. Assim para verificar a expressão do transgene da IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, analisamos por citometria de fluxo a presença de GFP nos linfócitos dos animais. Os linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram macerados em meio DMEM e submetidos a protocolo de imunofenotipagem como descrito no item 3.8. As células foram avaliadas por citometria de fluxo através de marcações com anticorpos monoclonais específicos contra CD3, CD4, CD8 e B220, utilizados como marcadores respectivamente das populações de células T, CD4, CD8 e B. Observamos que as únicas células que expressam GFP são as células T (CD3, CD4 e CD8), sendo que as células B (B220) não expressam GFP (Figura 4.2.2). Estes resultados demonstram que, o transgene inserido é expresso especificamente nas células T, não sendo observado expressão do transgene em outra população celular (células B).

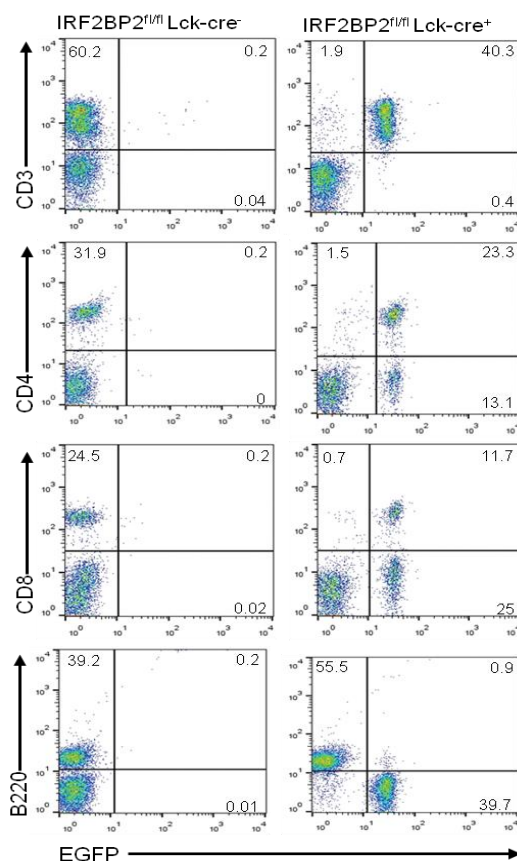


Figura 4.2.2- Análise da presença de GFP nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Células dos linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-B220, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a fluorocromos e analisados por citometria de fluxo, para avaliar a presença de GFP nas populações de células B220⁺, CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes (n=3).

Após a imunofenotipagem dos animais, para avaliar a expressão gênica de IRF2BP2, linfócitos T CD4 foram purificados a partir de linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ com 8 semanas de idade, através de coluna de seleção negativa. Após a purificação, o percentual de células T CD4 foi confirmado por citometria de fluxo através das marcações com anticorpos monoclonais específicos contra CD4 e CD8. A pureza obtida em todos os experimentos foi de pelo menos 90%, com a depleção total de células T CD8 (dados não mostrados). Após a purificação, células T CD4 foram ativadas *in vitro* com anti-CD3 (1µg/mL) e anti-CD28 (1µg/mL) por 48 horas. Para avaliar a expressão gênica de IRF2BP2 em linfócitos T CD4 após a ativação, extraímos o RNA total das células ativadas. O RNA foi utilizado para a síntese de cDNA e analisado por PCR em tempo real para quantificação relativa dos níveis de mRNA codificante de IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Como mostrado na Figura 4.2.3, a expressão gênica de IRF2BP2 se mostrou em torno de 9 vezes maior nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻.

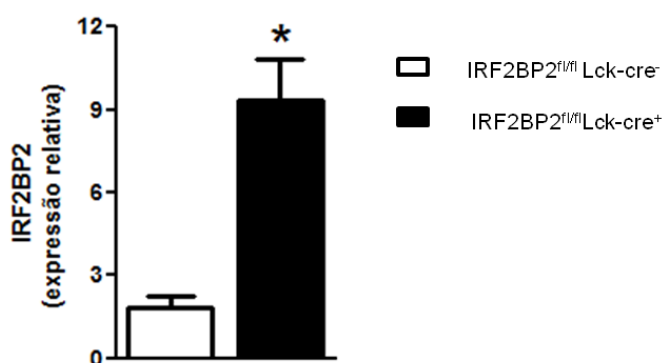


Figura 4.2.3- Quantificação relativa da expressão gênica de IRF2BP2. Quantificação relativa da expressão gênica de IRF2BP2 em células T CD4 purificadas por seleção negativa, 48 horas após ativação com anti-CD3 (1µg) e anti-CD28 (1µg). Os dados estão expressos em unidades arbitrárias de quantificação relativa em relação a expressão do animal IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻. A normalização das massas foi realizada pela expressão do gene *hprt*. O gráfico representa a média ± DPM (n=4) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Em estudos prévios, a proteína IRF2BP2 foi identificada como uma proteína nuclear co-repressora de IRF-2 e NFAT1 (CHILDS *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2011). Para analisarmos se a inserção do transgene da IRF2BP2 inserida no genoma dos animais poderia ter ocasionado alterações na conformação da proteína ou na sua localização celular, linfócitos T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, foram submetidos a um ensaio de imunofluorescência. Células

T CD4 foram purificadas como descrito anteriormente e ativadas *in vitro* com PMA (20nM) e ionomicina (2µM). Após 24 horas, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-IRF2BP2 e anticorpo secundário conjugado a rodamina. Observamos então que IRF2BP2 está localizada no núcleo das células T CD4 ativadas (Figura 4.2.4), confirmando os dados na literatura (CHILDS *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2011). Esse resultado demonstra que, em termos de localização celular a proteína IRF2BP2 expressa pelo transgene se comporta como a proteína endógena.

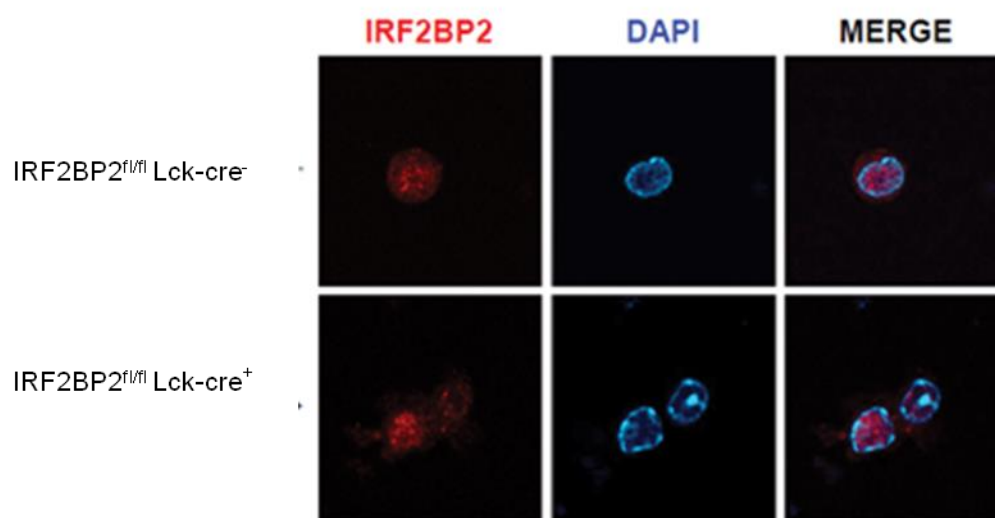


Figura 4.2.4- Análise da localização celular de IRF2BP2 em linfócitos T CD4. Ensaio de imunofluorescência para demonstrar a sub localização celular de IRF2BP2 em linfócitos T CD4. Células T CD4 purificadas por seleção negativa e ativadas com PMA (20nM) e ionomicina (2µM) durante 24 horas. As células foram incubadas por duas horas com o anticorpo anti-IRF2BP2 por duas horas e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado a rodamina. O núcleo das células foram corados com DAPI e as lâminas foram analisadas por microscopia confocal.

4.3. Análise dos órgãos linfoides dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺

Para avaliarmos os possíveis efeitos da IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ realizamos uma caracterização das populações de células nestes animais. Inicialmente, determinamos a quantidade de células nos órgãos linfoides centrais e periféricos. Realizamos também análises macroscópicas de diferentes órgãos destes animais. O número total de células nos órgãos linfoides centrais e periféricos (timo, baço e linfonodos periféricos) foi determinado após estes órgãos serem processados de acordo com o item 3.4 em Materiais e Métodos.

Nestas análises, observamos uma redução no número total de células nos linfonodos e timo, entretanto, não observamos diferença no número total de células do baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.3.1).

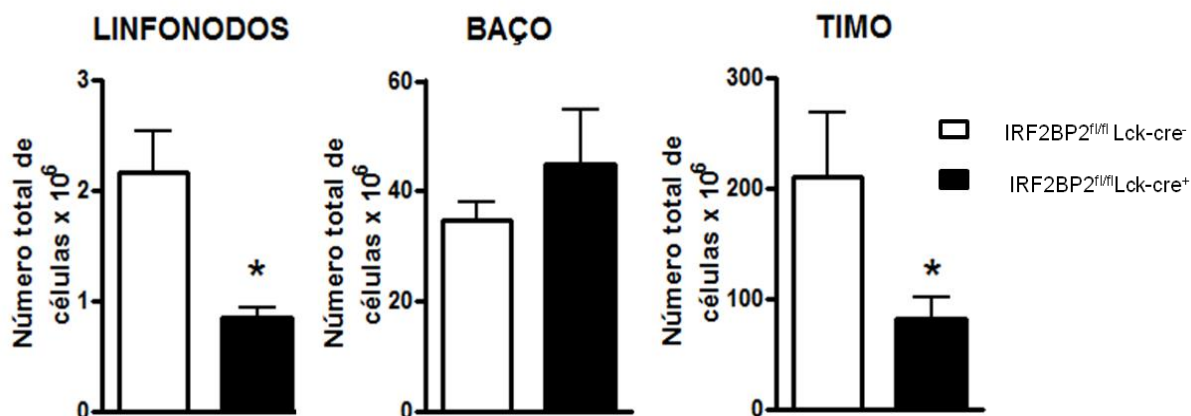


Figura 4.3.1- Número total de células nos órgãos linfoides dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Células do timo, baço e linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, foram contadas por coloração com azul de trypan 0,4% com exclusão de células não viáveis. O gráfico representa a média ± DPM (n=6) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Para as análises macroscópicas, os órgãos linfoides periféricos, baço e linfonodos foram comparados quanto ao seu tamanho. Observamos uma redução no tamanho dos linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ em comparação aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻. Estes resultados demonstram uma redução no número de células e no tamanho dos linfonodos, sugerindo um papel da IRF2BP2 no desenvolvimento deste órgão. Porém, não foi observado o mesmo fenótipo no baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ (Figura 4.3.2).

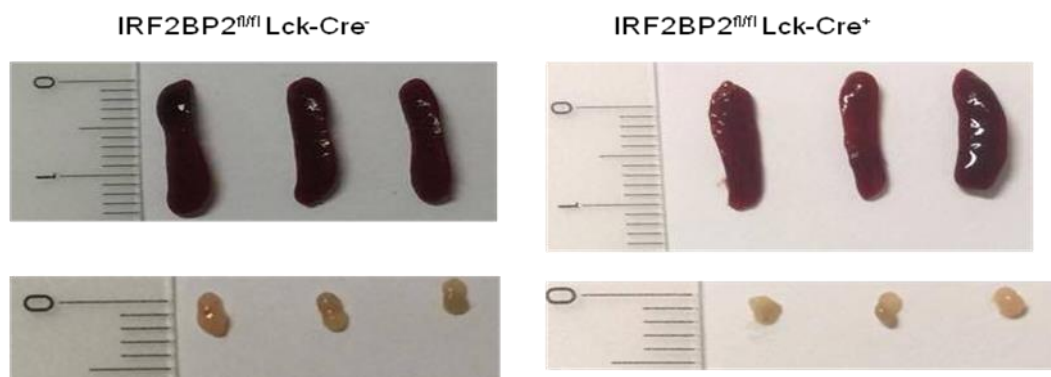


Figura 4.3.2- Análise macroscópica dos órgãos linfoides periféricos. Fotografia da análise macroscópica do baço e linfonodo inguinal dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O tamanho dos órgãos está representado em centímetros.

4.4- Caracterização das populações linfocitárias nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺

Para avaliar as subpopulações dos linfócitos T nos órgãos linfoides periféricos, realizamos ensaios de imunofenotipagem nos órgãos centrais e periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. As populações de células T do timo, baço e linfonodos e de células B do baço e linfonodos foram analisadas por citometria de fluxo através de marcações com anticorpos monoclonais específicos contra CD3, CD4, CD8 e B220. Neste experimento, observamos uma redução da população de células CD3⁺ e um aumento relativo da população de células B220⁺ no baço e no linfonodo dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ (Figura 4.4.1).

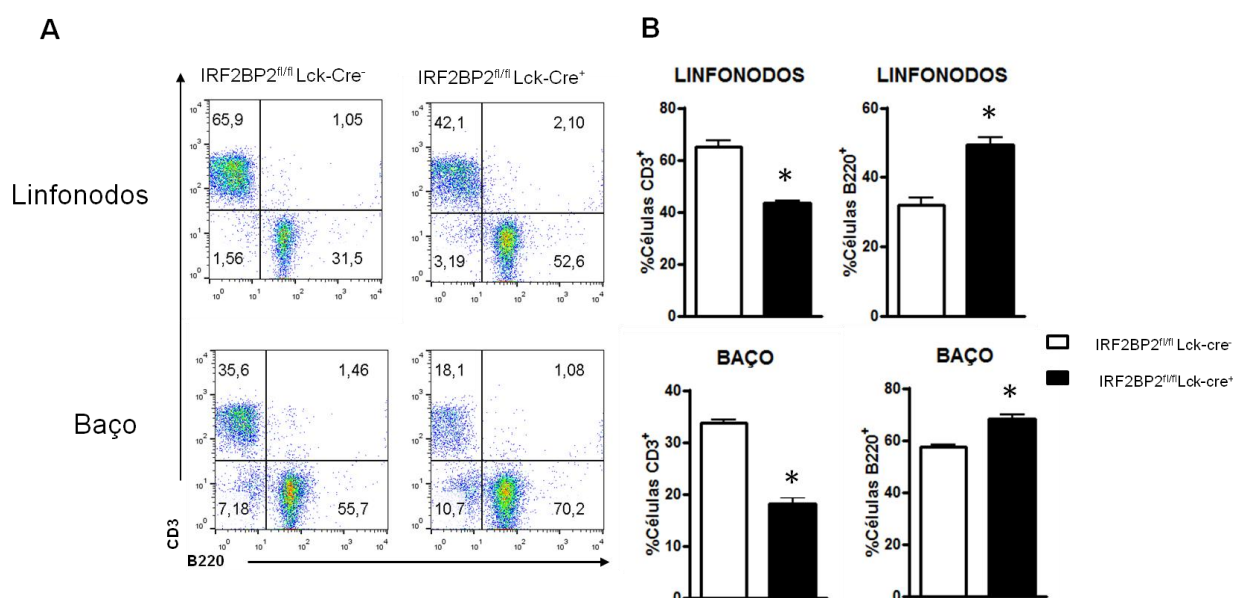


Figura 4.4.1- Caracterização das populações linfocitárias nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. A- Células dos linfonodos periféricos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-B220 conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. As células do baço foram previamente lisadas com ACK para a realização da marcação para os marcadores de superfície. Os números correspondem à porcentagem de células em cada quadrante. B- Gráfico representativo do percentual de células CD3⁺ e B220⁺ nos linfonodos periféricos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O gráfico representa a média \pm DPM (n=6) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Após observamos uma redução na população de células CD3 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, analisamos as populações de células CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, e foi possível observar uma redução das populações de células CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.4.2).

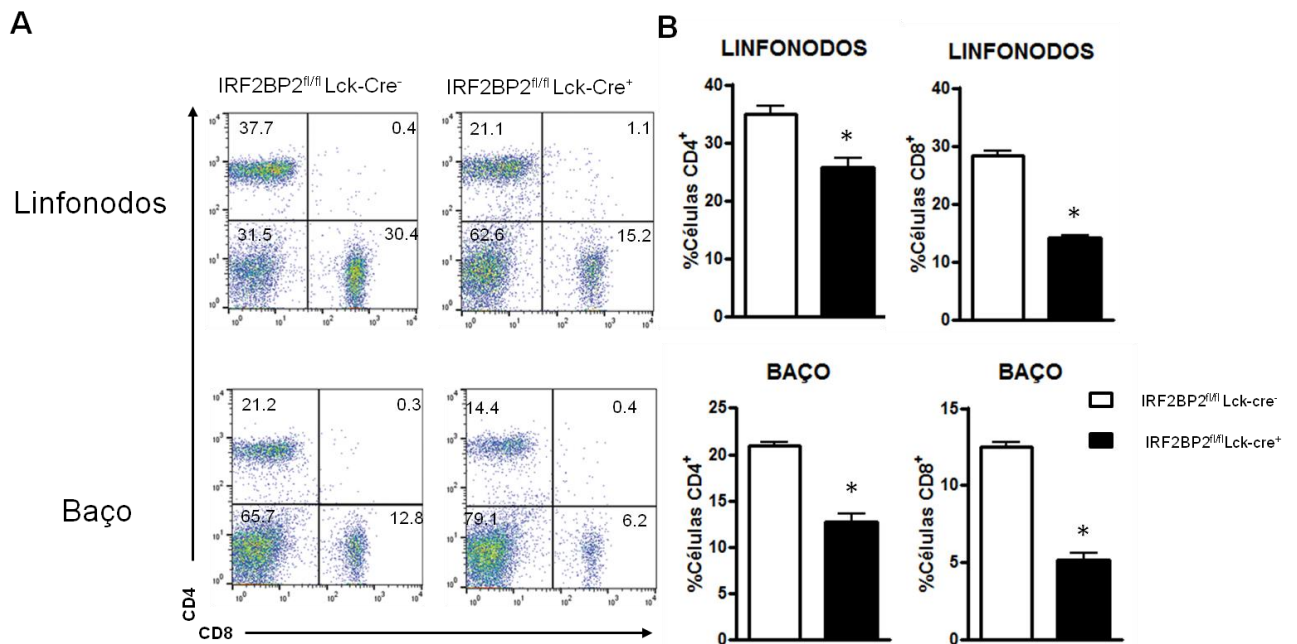


Figura 4.4.2- Caracterização das subpopulações linfocitárias nos linfonodos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. A- Células dos linfonodos periféricos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 conjugado a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. Os números correspondem à porcentagem de células em cada quadrante. B- Gráfico representativo demonstrando as porcentagens de células CD4⁺ e células CD8⁺ nos linfonodos e baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O gráfico representa a média ± DPM (n=6) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Analizamos também as populações de células CD4⁺ e CD8⁺, no timo. Observamos um aumento da população duplo negativa e uma leve diminuição da população duplo positiva nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, sugerindo que nestes animais possa estar acontecendo um atraso na diferenciação de células T (Figura 4.4.3)

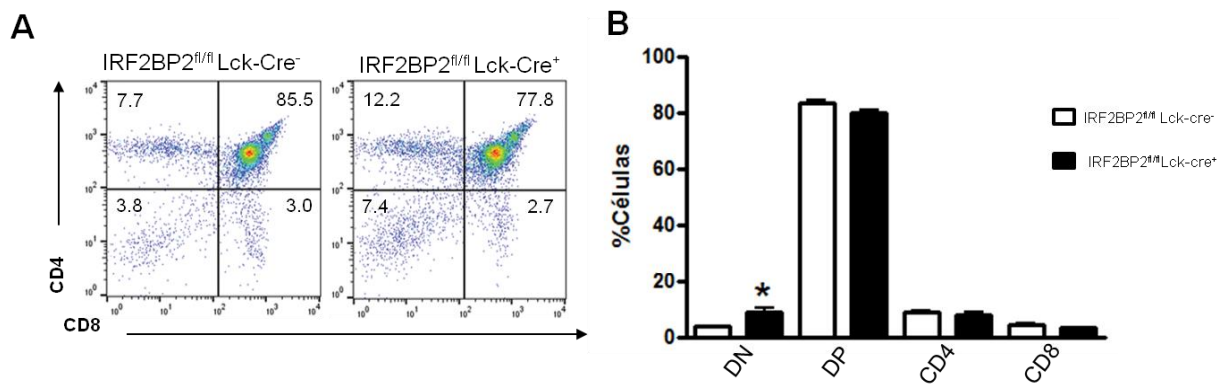


Figura 4.4.3- Caracterização das subpopulações linfocitárias no timo dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. A- Células do timo dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 conjugado a fluorocromos e foram analisadas por citometria de fluxo. Os números correspondem à porcentagem de células em cada quadrante. B- Gráfico representativo demonstrando as porcentagens de células duplo negativo (DN), duplo positivo (DP), células CD4⁺ e células CD8⁺ no timo dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O gráfico representa a média ± DPM (n=6) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Em conjunto estes resultados sugerem um papel repressor para IRF2BP2 na diferenciação e/ou expansão de células T. Entretanto, mais experimentos são necessários para definir os mecanismos envolvidos.

4.5- Caracterização da população de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺

Para caracterizar a população de células T regulatórias tímicas (tTreg) nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, células do baço e linfonodos foram maceradas em meio DMEM e estas células foram submetidas ao protocolo de marcação intracelular para detecção do fator de transcrição Foxp3. As células do baço e dos linfonodos também foram marcadas para as proteínas de superfície CD4 e CD25. A população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi então analisada por citometria de fluxo (Figura 4.5.1). Neste experimento observamos que o percentual de células nTreg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) estava aumentado no baço e linfonodo dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ em comparação aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.5.1).

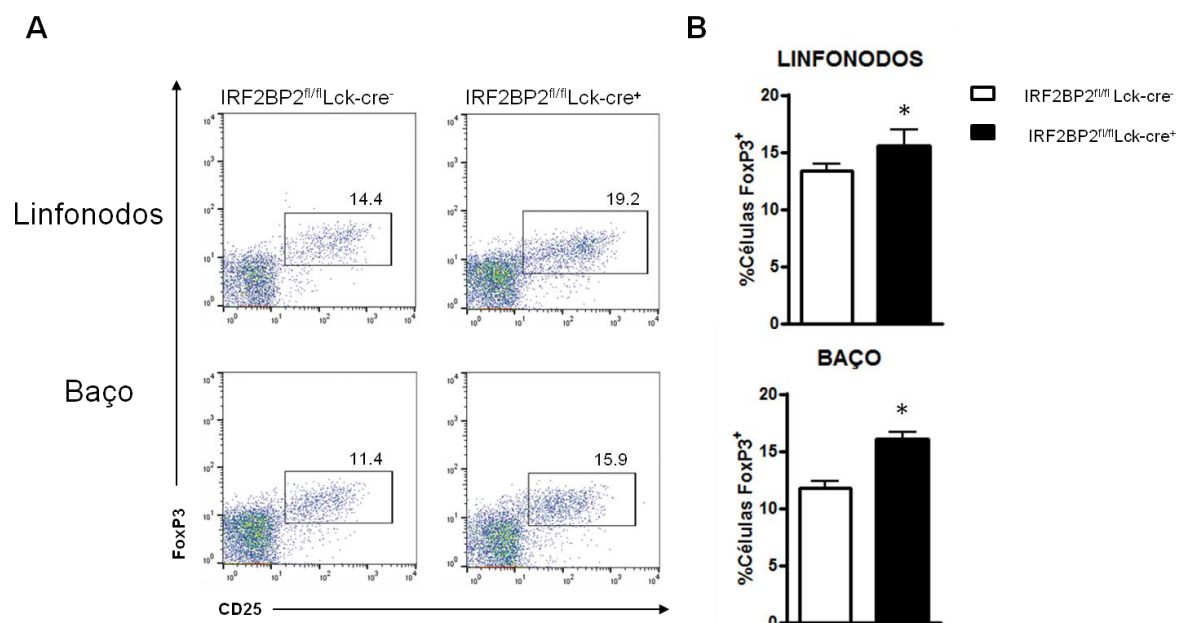


Figura 4.5.1- Análise da população de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. A- Percentual de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Células dos linfonodos e baço periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD25, fixadas, permeabilizadas e marcadas para o fator de transcrição Foxp3. As análises de CD25 e FoxP3 foram realizadas dentro da população de células CD4. Os percentuais mostrados na figura são referentes aos quadrantes nos quais estão inseridos. B- Gráfico representativo do percentual de células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). O gráfico representa a média ± DPM (n=6) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

4.6- Análise da população de células T CD8 semelhantes à memória CD44⁺CD122⁺

Em animais não estimulados, foi previamente descrito uma heterogeneidade na população de células T CD8, sendo identificadas células com fenótipo semelhante à células de memória CD44⁺CD122⁺, chamadas de memória inata, que possuem origem tímica, ou memória virtual, de origem periférica, gerada independente da interação via TCR com o MHC:antígeno cognato (JAMESON & MASOPUST, 2015). Para investigarmos se IRF2BP2 apresenta um envolvimento na geração de células T CD8 com esse fenótipo, analisamos as populações CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ e CD8⁺CD44⁺CD122⁺, sendo esta última descrita como células semelhantes à memória (WHITE *et al.*, 2017).

Células dos linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻, foram marcadas para as seguintes populações CD8, CD44 e CD62L e também para a população de células CD8, CD44 e CD122. Observamos um aumento na

população de células $CD8^+CD44^+CD62L^+$ nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ quando comparado aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ (Figura 4.6.1A).

Ao analisarmos a população de células de memória virtual ($CD8^+CD44^+CD122^+$) observamos um aumento dessa população nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ quando comparado aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ (Figura 4.6.1D). Juntos estes resultados sugerem um envolvimento de IRF2BP2 na geração e manutenção de células T CD8 de memória virtual, entretanto mais estudos são necessários para compreender o envolvimento da IRF2BP2 na diferenciação desta subpopulação de linfócitos nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$.

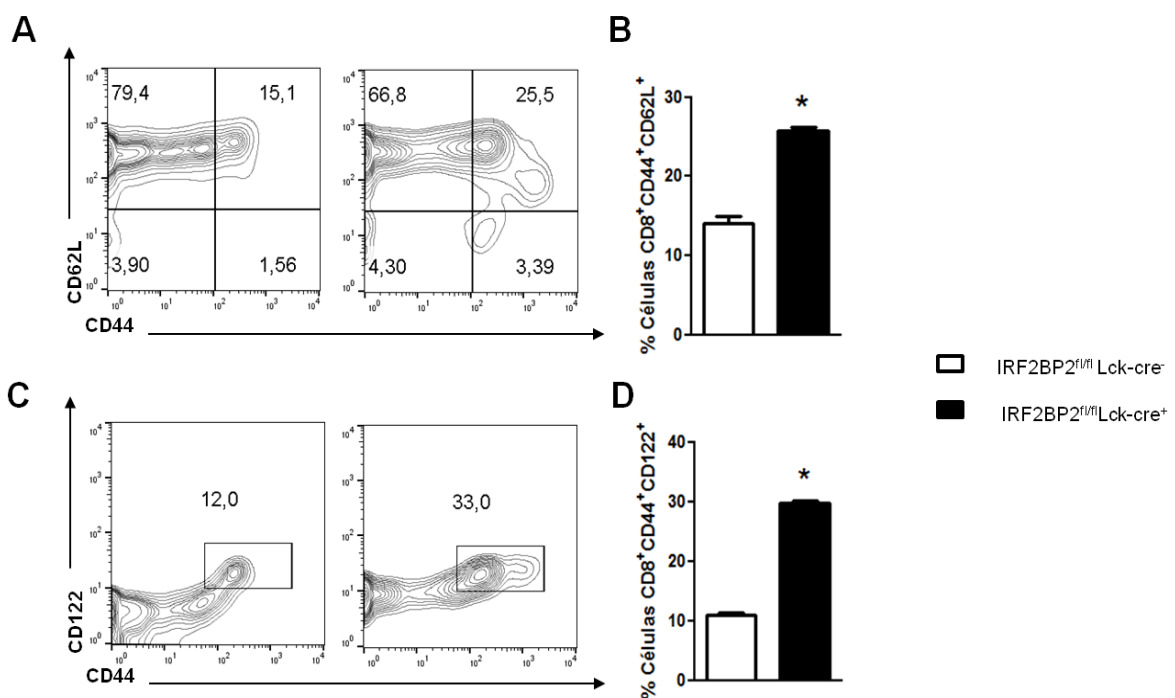


Figura 4.6.1- Avaliação da população de células de memória virtual ($CD8^+CD44^+CD122^+$). A- Marcação de superfície para análise da expressão de CD8, CD44 e CD62L em células dos linfonodos periféricos dos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ e $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$. Estas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD62L conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. B- Gráfico representativo do percentual de células $CD8^+CD44^+CD62L^+$. C- Marcação de superfície para análise da expressão de CD8, CD44. O gráfico representa a média \pm DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$.

4.7- Avaliação da expressão de marcadores de ativação em células T

Como mencionado anteriormente a superexpressão de IRF2BP2 foi associada com níveis menores de CD25 e CD69 (SECCA *et al.*, 2016). Em nossos experimentos observamos uma diminuição no número total de células nos linfonodos e no timo nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ e também uma redução nas populações

de células T CD4 e T CD8 (Figura 4.4.2). Para compreender melhor um possível papel da IRF2BP2 na ativação linfocitária, investigamos a expressão dos marcadores de ativação celular de linfócitos CD25, CD69, CD44 e CD62L em células T CD4 e T CD8 de linfonodos dos animais não estimulados IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺.

Para isto, obtivemos células dos linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ não estimulados e avaliamos a expressão das moléculas CD25, CD69, CD44 e CD62L nos linfócitos T CD4 e T CD8, através de marcação de superfície e analisamos por citometria de fluxo. Em células T CD4 foi possível observar uma diminuição da população celular CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻ e um aumento das populações CD4⁺CD62L^{high}CD44⁺ e CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparados aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.7.1A e B). Entretanto, para as populações de células CD4⁺CD69⁺ e CD4⁺CD25⁺ não observamos diferenças entre os animais analisados (Figuras 4.7.1C e D).

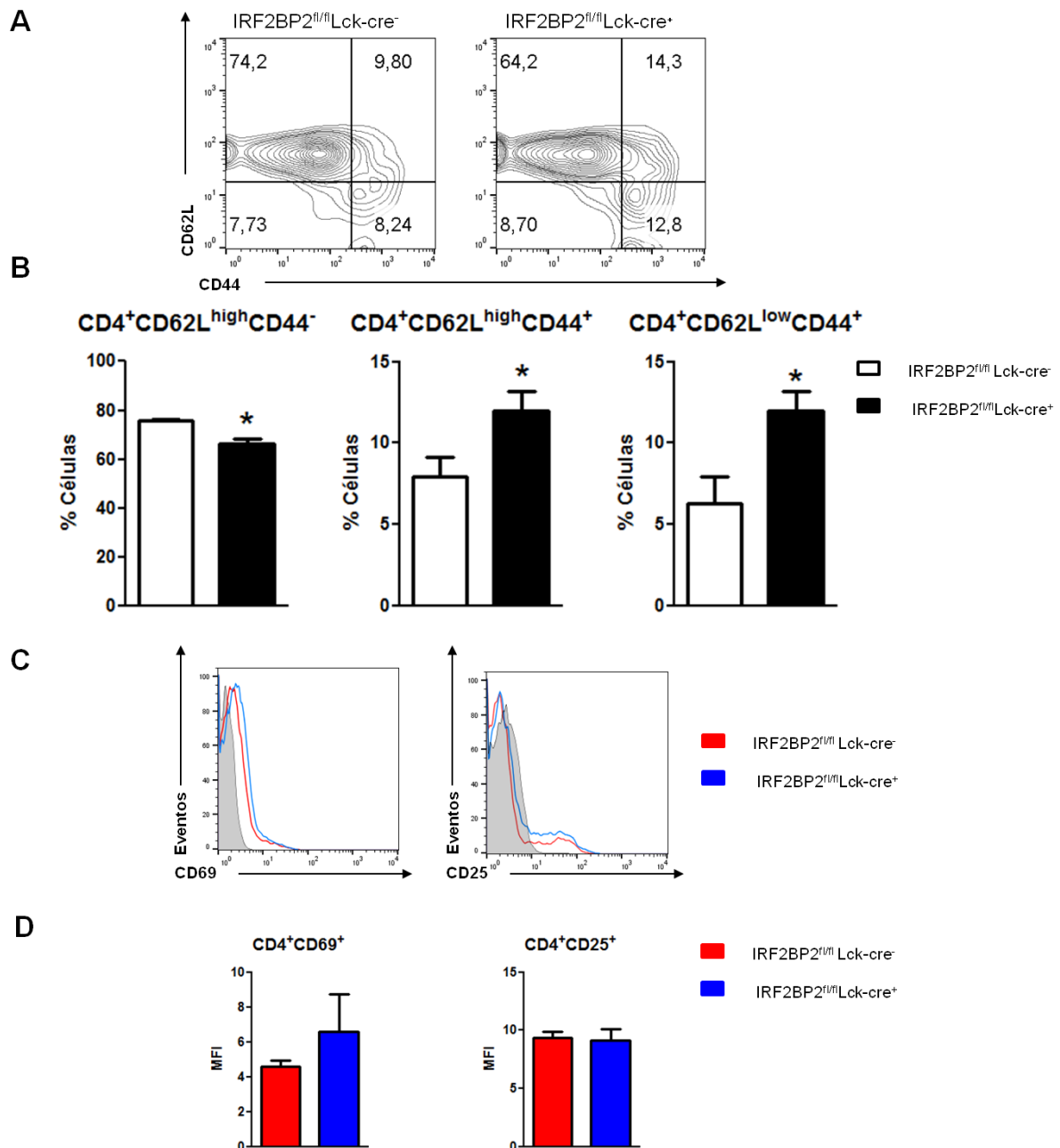


Figura 4.7.1- Avaliação da expressão de marcadores de ativação celular em células T CD4. A- Marcação de superfície para análise de expressão de CD4, CD44 e CD62L em células dos linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Estas células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD44 e anti-CD62L conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. Os percentuais mostrados nas figuras são referentes aos quadrantes nos quais estão inseridos. B- Gráficos representativo do percentual de células CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻, CD4⁺CD62L^{high}CD44⁺ e CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺. C- Histograma representativo da marcação de superfície para CD69 e CD25 em células T CD4 total dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ como descrito em A. D- MFI dos marcadores representados em C. O gráfico representa a média \pm DPM (n=5).

Avaliamos também os mesmos marcadores nas células T CD8, onde observamos uma diminuição da população celular $CD8^+CD62L^{high}CD44^-$ e um aumento das populações $CD8^+CD62L^{high}CD44^+$ e $CD8^+CD62L^{low}CD44^+$ nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ quando comparado aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ (Figuras 4.7.2A e B). Entretanto, as análises das populações de células $CD8^+CD69^+$ e $CD8^+CD25^+$ não foi possível observar diferença entre os animais (Figuras 4.7.2C e D).

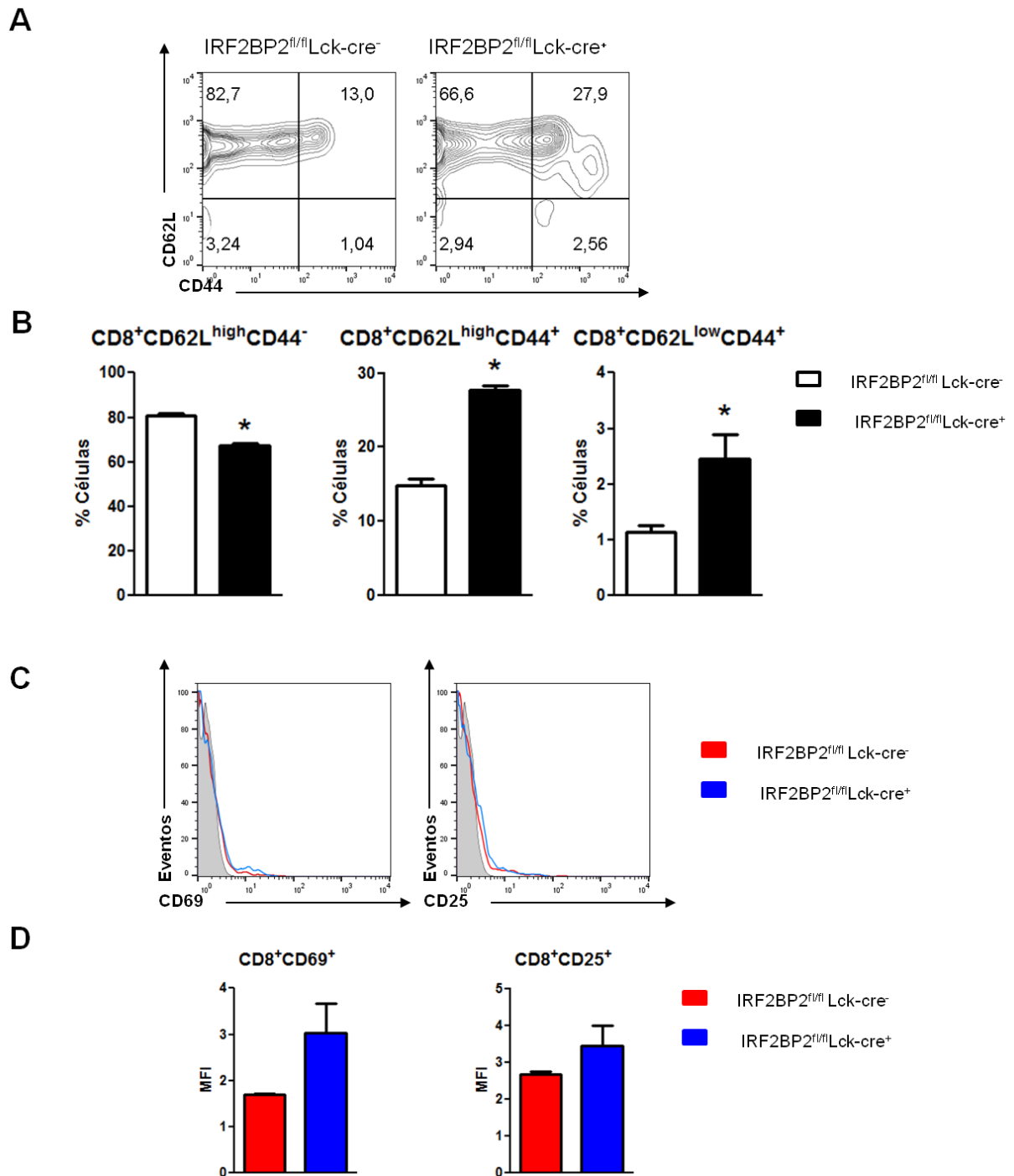


Figura 4.7.2- Avaliação da expressão de marcadores de ativação celular em células T CD8. A- Marcação de superfície para análise da expressão de CD8, CD44 e CD62L em células dos linfonodos periféricos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Estas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD62L conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. B- Gráfico representativo do percentual de células CD8⁺CD62L^{high}CD44⁻, CD8⁺CD62L^{high}CD44⁺ e CD8⁺CD62L^{low}CD44⁺. CD8⁺CD44⁺CD62L⁺. C- Histograma representativo da marcação de superfície para CD69 e CD25 em células T CD8 totais dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ como descrito em A. D- MFI dos marcadores representados em E. O gráfico representa a média ± DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de um experimento.

4.8- Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4 para os perfis efetores Th1, Th2 e Th17

Para avaliarmos os possíveis papéis da IRF2BP2 na diferenciação ou função das células efectoras T CD4 (Th1, Th2 e Th17), diferenciamos células T CD4 *in vitro* para cada um destes perfis efetores e analisamos a capacidade de produção de citocinas por cada um dos perfis. Para isto, purificamos linfócitos T CD4 como descrito no item 3.5 em Materiais e Métodos. Após a purificação as células foram ativadas *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de condições polarizantes para cada um dos perfis efetores (Th1, Th2 e Th17), conforme descrito em Materiais e Métodos. Após 48 horas as células foram expandidas, dobrando-se diariamente área e volume das culturas por 6 dias. Para os perfis Th1 e Th2 ao longo da expansão as culturas receberam 20U/mL de IL-2 recombinante ao longo da expansão, enquanto que as culturas Th17 não foram suplementadas com IL-2, como demonstrado na representação esquemática do protocolo de diferenciação na Figura 4.8.1A. No dia 6 da diferenciação, para avaliarmos a produção das principais citocinas relacionadas a cada um dos perfis efetores analisados, as células das culturas Th1, Th2 e Th17 foram estimuladas com PMA (10nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 horas, na presença de brefeldina nas 2 últimas horas. Após às 6 horas de estímulos as células foram então fixadas e permeabilizadas para a marcação das citocinas intracelulares. Os anticorpos anti IFN- γ e anti IL-4, foram utilizados para as culturas Th1 e Th2 e anti-IFN- γ e anti IL-17 para as culturas Th17. Após as marcações, as culturas foram analisadas por citometria de fluxo.

O perfil Th1 produz principalmente a citocina IFN- γ , e é importante na resposta imune contra patógenos intracelulares e câncer. O perfil Th2 produz as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Células Th2 tem como característica a não produção de IFN- γ e este perfil tem como principal função a defesa contra parasitas. Já o perfil Th17 tem como característica principal a produção da citocina inflamatória IL-17 e está envolvido na defesa contra bactérias extracelulares, infecções fúngicas e autoimunidade (ZHU *et al.*, 2010).

Em nossos experimentos as culturas Th1 originadas dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ continham principalmente IFN- γ (Figura 4.8.1B). Observamos também que nas culturas Th1 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, a produção de IFN- γ era maior quando comparada aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.8.1C).

As culturas Th2 produziram principalmente IL-4, confirmando a polarização das culturas para o perfil Th2 (Figura 4.8.1B). Interessantemente observamos que 20% das células dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ produzem IFN- γ , mesmo quando diferenciadas, na presença de citocinas polarizantes para o perfil Th2 (Figura 4.8.1B e C). Um fenótipo semelhante foi observado na diferenciação Th17. As células dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ produziram principalmente IL-17, quando diferenciadas para esse perfil, conforme esperado (Figura 4.8.1B). Contudo uma pequena porcentagem de células dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ permanecia produzindo IFN- γ (Figura 4.8.1B e C). É importante ressaltar que a diferenciação das células Th2 e Th17 são cultivadas na presença de anti-IFN- γ . Mesmo na presença dessa citocina inibitória da produção de IFN- γ , a produção desta continua a ocorrer nestes perfis.

Em conjunto esses resultados mostram que células CD4⁺ dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ produzem IFN- γ mesmo nos perfis em que essa citocina não deveria ser produzida, sugerindo uma desregulação nos mecanismos de repressão da expressão de IFN- γ .

4.9- Diferenciação das culturas de linfócitos T CD4 sem indução de polarização

O perfil de diferenciação encontrado nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ (Figura 4.8.1) sugere ser um perfil Th0, que é descrito como um perfil de citocinas misto, que apresenta uma produção tanto das citocinas do perfil Th1 quanto do perfil Th2 (YATES, CALLARD, STARK, 2004; SAINI, RAMESH, NATH, 2013). Assim, analisamos também a produção de citocinas nas culturas sem polarização.

Células T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, foram purificadas e ativadas com anti-CD3 e anti-CD28 conforme descrito no item 4.7 e a partir do dia 2 do protocolo de diferenciação as células foram expandidas com meio com 20U/mL de IL-2 recombinante, diariamente dobrando a área e o volume das culturas até o dia 6. No dia 6, as células foram estimuladas com PMA (10nM) e ionomicina (1µM) por 6 horas, na presença de brefeldina nas duas últimas horas, e foram fixadas e permeabilizadas para a marcação intracelular com os anticorpos específicos para IFN-γ, IL-4 e IL-17 e avaliadas por citometria de fluxo, para verificar o percentual de células produtoras destas citocinas. Neste contexto podemos observar que as culturas sem polarização da células provenientes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, possuíam um aumento na produção de IFN-γ (Figura 4.9.1A e B). Sugerindo que as células sem polarização diferenciam-se para o perfil Th1, que é caracterizado pela produção de IFN-γ, quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.9.1). Entretanto, é importante ressaltar que embora ocorra um aumento da produção de IFN-γ nas culturas de células não-polarizadas nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, nestes também é possível observar que 45% das células produzidas neste perfil, são duplo-positivas para as citocinas analisadas, produzindo simultaneamente IL-4 e IFN-γ.

Esses resultados nos sugerem que além do aumento da produção de IFN-γ, há uma população de células intermediária aos perfis de diferenciação, que são duplo-positivas para IL-4 e IFN-γ. Contudo, mais experimentos são necessários para compreendermos o perfil destas células nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺.

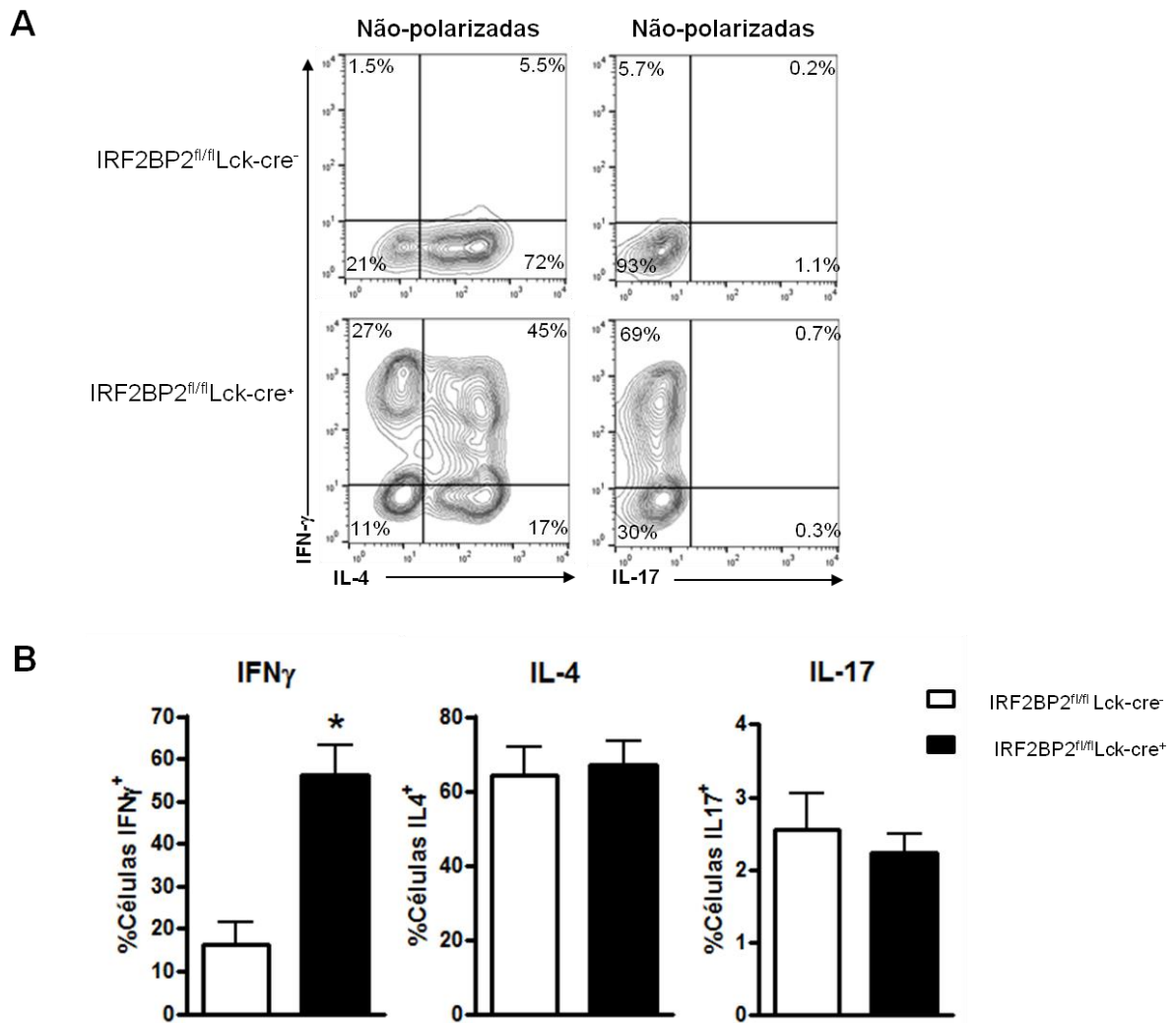


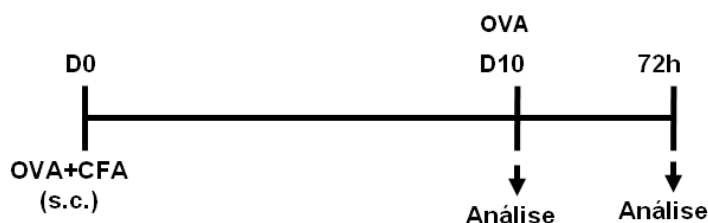
Figura 4.9.1- Diferenciação *in vitro* de células T CD4 em culturas não polarizantes. A- Análise da produção de citocinas IFN- γ , IL-4 ou IL-17 no dia 6 do protocolo de diferenciação *in vitro*, na condição não polarizante. Células T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram purificadas e ativadas com anti-CD3 (1 μ g) e anti-CD28 (1 μ g) expandidas diariamente dobrando-se área e volume na presença de 20u/mL de IL-2 diariamente. No dia 6 da cultura, as células foram estimuladas com PMA (10nM) e ionomicina (1 μ M) por 6h, na presença de brefeldina nas últimas 2 horas, fixadas e permeabilizadas para marcação intracelular com os anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e analisada por citometria de fluxo, com relação ao percentual de produção de citocinas. Os números correspondem à porcentagem de células em cada quadrante. B- Os gráficos representam o percentual de células produtoras de IFN- γ , IL-4 ou IL-17 na condição não polarizante. O gráfico representa a média \pm DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes.

4.10- Análise das subpopulações linfocitárias dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ em resposta ao desafio antigênico

Para avaliar um possível papel da IRF2BP2 na resposta a um antígeno *in vivo*, os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram sensibilizados por via subcutânea com OVA (200 μ g) na presença do adjuvante completo de Freund (CFA)

por 10 dias. Após esse período, células dos linfonodos drenantes dos animais foram analisadas e também re-estimuladas *in vitro* com OVA (0,5µg/mL) por 72 horas, para que realizássemos ensaios de proliferação celular, como demonstrado no esquema representativo na Figura 4.10.1A. Para a contagem celular total dos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram analisadas por contagem manual com exclusão de células não viáveis por coloração com azul de trypan. Na Figura 4.10.1B, foi possível observar uma tendência a redução, no número total de células viáveis nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻.

A



B

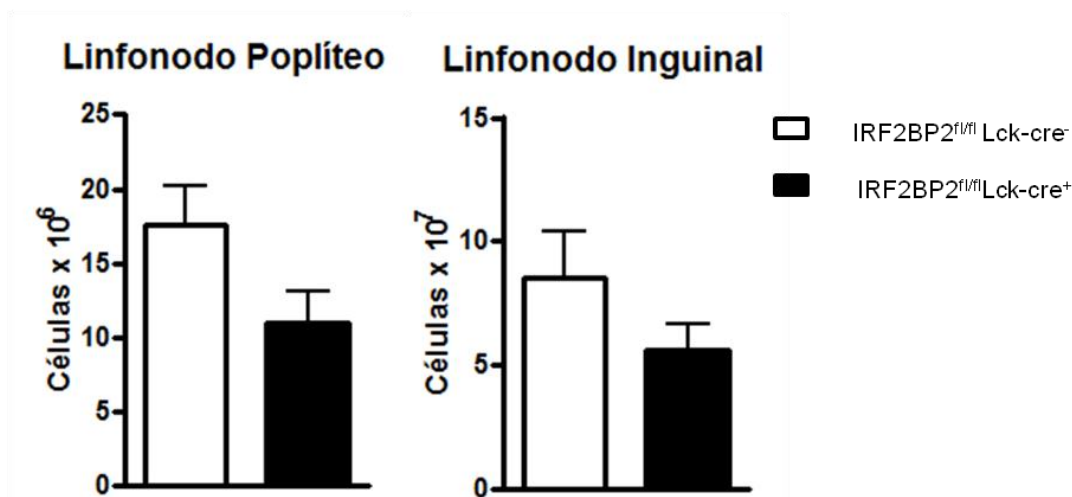


Figura 4.10.1- Número total de células nos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com OVA. A- Representação esquemática do protocolo de sensibilização dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, com ovalbumina na presença do adjuvante completo de Freund. Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ foram sensibilizados com 200µg de ovalbumina na pata traseira e após 10 dias os linfonodos inguinais e linfonodos poplíteos foram retirados para a caracterização das subpopulações linfocitárias. B- Número total de células nos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Os linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com Ovalbumina na presença do adjuvante completo de Freund's foram macerados e as células viáveis foram contadas com azul de trypan 0,4% em solução salina. O gráfico representa a média ± DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Para avaliar as subpopulações de linfócitos, utilizamos anticorpos específicos contra CD3, CD4, CD8 e B220 respectivamente. Também analisamos a população de células T regulatórias, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Foi possível observar que as populações de células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ estavam diminuídas nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ em relação aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ e que a população de células $B220^+$ estava aumentada (Figura 4.10.2). Em relação à população de células T regulatórias também observamos um aumento da população de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^+$ em relação aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre^-$ (Figura 4.10.2). Todos esses resultados estão de acordo com o fenótipo observado para os animais não estimulados nos experimentos anteriores.

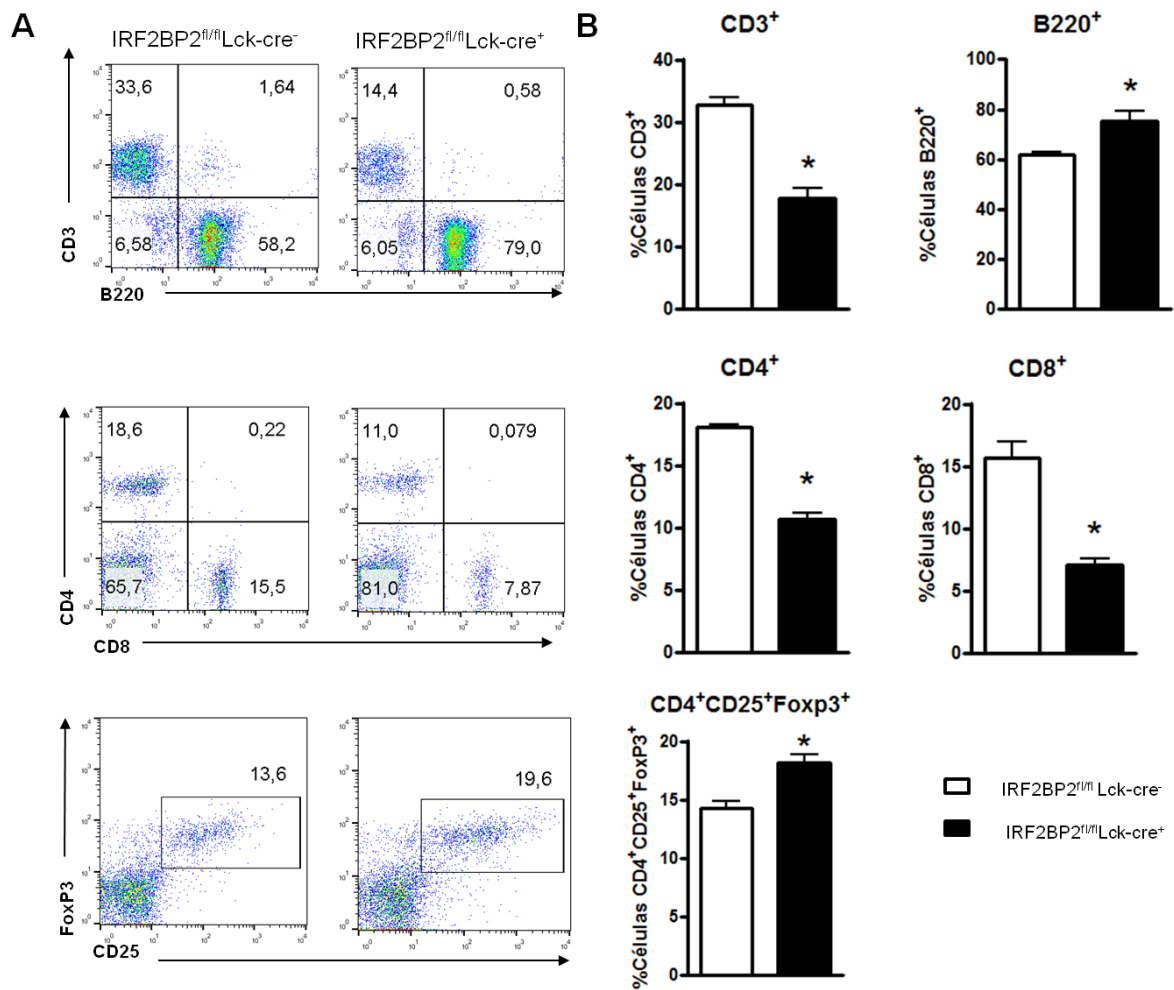


Figura 4.10.2- Caracterização das subpopulações de células T nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com OVA. A- Percentual das subpopulações de células nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Células dos linfonodos drenantes dos animais indicados foram analisadas por citometria de fluxo por marcação com anticorpos monoclonais anti-B220, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD25. Células dos linfonodos drenantes também foram fixadas e permeabilizadas para marcação intracelular para o fator de transcrição Foxp3. As análises de CD25 e FoxP3 foram realizadas dentro da população de células CD4. Os percentuais mostrados na figura são referentes aos quadrantes nos quais estão inseridos. B- Porcentagem de células correspondente as populações CD3⁺, B220⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. O gráfico representa a média \pm DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

4.11- Análise da proliferação celular nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ desafiados com antígeno específico

Para avaliarmos a proliferação celular nos animais sensibilizados com ovalbumina, células dos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻, foram re-estimuladas *in vitro* com OVA (0,5 μ g/mL) por 72 horas, para que realizássemos ensaios de proliferação celular. Para avaliarmos o envolvimento da IRF2BP2 na proliferação celular utilizamos o marcador de

proliferação celular Ki67. As células dos linfonodos drenantes foram marcadas para as proteínas de superfície CD4, fixadas e permeabilizadas e marcadas para Ki67. As análises da população de células CD4⁺Ki67⁺ foi então realizada por citometria de fluxo. Foi observado uma redução na proliferação celular nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.11.1).

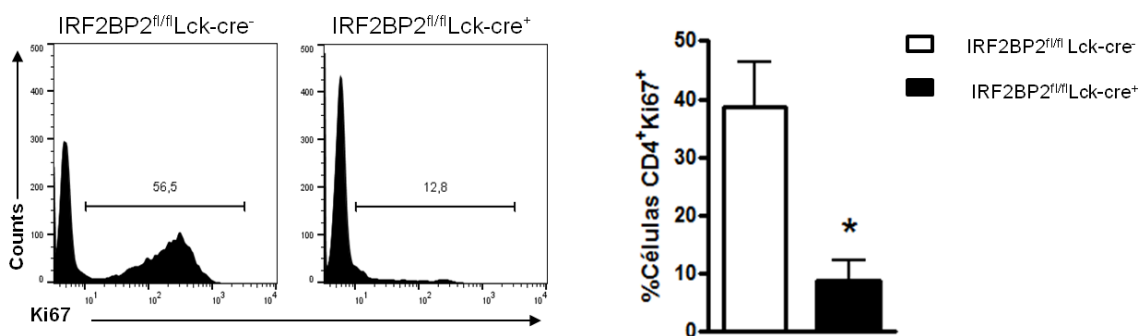


Figura 4.11.1- Análise da proliferação celular em células T CD4⁺ dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com OVA. A- Ensaio de proliferação de celular através da análise do marcador de proliferação Ki67. Linfócitos T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ sensibilizados com ovalbumina, como descrito na figura 7 foram estimuladas *in vitro* com 0,5µ/mL de ovalbumina por 72 horas. As células foram fixadas e permeabilizada para marcação da proteína nuclear Ki67. As análises de Ki67 foi realizada dentro da população de células T CD4+. O histograma é representativo do percentual de células Ki67⁺ de células T CD4+. B- O gráfico representa a média ± DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Analisamos também o número total de células nos linfonodos drenantes dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. Células dos linfonodos inguinais e poplíteos foram contadas manualmente conforme descrito anteriormente no item 4.9 deste texto. Observamos uma redução no número total de células viáveis nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.11.2A). Além disto, também analisamos as células por microscopia óptica após 72 horas de estímulo com OVA (0,5 µg/mL). Nas fotomicrografias das culturas de células possível observar uma redução no tamanho dos focos de proliferação formados por linfócitos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ (Figura 4.11.2B).

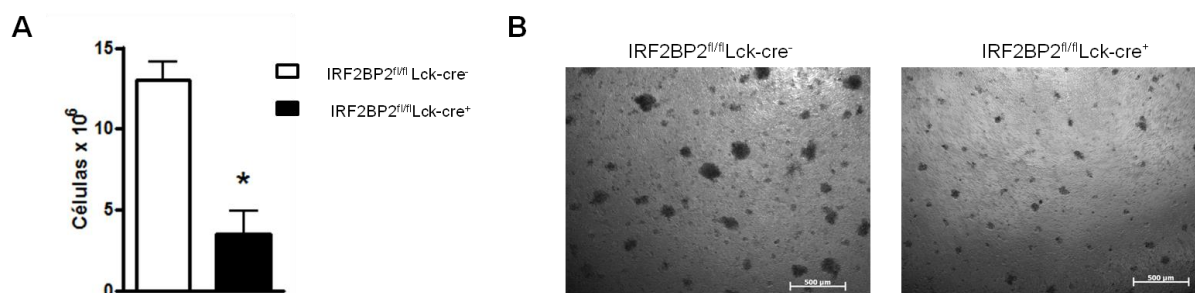


Figura 4.11.2- Análise do número total de células nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺. A- Número total de células dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ após 72 horas de estímulo com ovalbumina. B- Microscopia óptica de linfócitos purificados dos linfodossdrentantes, dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺ após 72 horas de estímulo *in vitro* com ovalbumina. O gráfico representa a média ± DPM (n=5) e (*) significa $p < 0,05$. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Juntos esses resultados sugerem que os linfócitos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁺, possuem uma diminuição na proliferação celular em relação aos linfócitos IRF2BP2^{fl/fl}Lck-cre⁻, uma vez que foi possível observar tanto uma redução do número total de células nestes animais, quanto uma diminuição da percentagem de células positivas para Ki67⁺.

5- DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliamos os possíveis papéis para a proteína IRF2BP2 na ativação e resposta de linfócitos T *in vivo*. A IRF2BP2 originalmente descrita como um repressor transcricional de IRF-2 (CHILDS *et. al.*, 2003), foi descrita em nosso laboratório como repressora da atividade de NFAT1 (CARNEIRO *et. al.*, 2011). NFAT1 e IRF-2 são fatores importantes na biologia das células imunes, entretanto são escassos os dados disponíveis na literatura referente à atividade da IRF2BP2 e sua participação em eventos biológicos dessas células. Então, para compreendermos os efeitos da proteína IRF2BP2, foram gerados os animais transgênicos condicionais para superexpressão de IRF2BP2 como descrito no item 4.1.1 (dados não publicados).

Uma vez que não eram conhecidos os efeitos do excesso ou falta da IRF2BP2 *in vivo*, optamos pela construção de animais transgênicos condicionais para superexpressão desta proteína. Como o interesse do nosso grupo era avaliar o envolvimento de IRF2BP2 na resposta imune, optamos por animais transgênicos condicionais para células T (IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺). Sendo assim, a superexpressão de IRF2BP2 está condicionada à presença da recombinase Cre e, uma vez que o interesse está em estudar os possíveis efeitos da proteína na resposta imune, os animais IRF2BP2^{fl/fl} foram cruzados com animais que expressam a Cre sob o controle do promotor da enzima Lck (dados não publicados). Dessa forma a superexpressão fica condicionada as células T, a partir de timócitos em estágio DN3.

Nosso grupo também gerou animais *knockout* condicionais para a proteína IRF2BP2 (dados não publicados). Entretanto, ao tentarmos estabelecer uma colônia de animais que apresentam a deleção da IRF2BP2 com animais que expressam a recombinase Cre de forma ubíqua, sob o controle do promotor de CMV, observamos que a deleção total da IRF2BP2 foi letal (dados não publicados). Recentemente, foi demonstrado que a ausência de IRF2BP2 em camundongos ocasionava a morte desses animais logo após o nascimento (STADHOUDERS *et al.*, 2015). Esses dados corroboram com os nossos estudos, demonstrando que a IRF2BP2 é essencial para a sobrevivência dos animais.

Para verificarmos a expressão do transgene, analisamos os níveis de mRNA de IRF2BP2 em células T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺. Observamos que os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ possuem um aumento de aproximadamente 9 vezes de mRNA de IRF2BP2 quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ (Figura

4.1.3). Confirmando a superexpressão de IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺. Como demonstrado na Figura 4.1.1, o transgene possui um sítio interno de entrada de ribossomo seguido pelo gene GFP, que é expresso sempre que IRF2BP2 for expressa pelo transgene. Assim, a presença de GFP foi analisada por citometria de fluxo para diferentes populações de células. Observamos que as únicas células que expressam GFP são as células T (Figura 4.1.2).

A IRF2BP2 é descrita como uma proteína de localização nuclear (CHILDS *et. al.*, 2003; CARNEIRO *et. al.*, 2011). Entretanto, uma vez que não sabíamos se a inserção do transgene de IRF2BP2 poderia ter ocasionado uma alteração localização celular da proteína, realizamos um ensaio de localização celular, sendo possível observar, que assim como descrito na literatura, IRF2BP2 em células T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ se localizavam no núcleo destas células.

Após a confirmação da superexpressão de IRF2BP2 nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, caracterizamos estes animais para um melhor entendimento da dinâmica das subpopulações linfocitárias na ativação e funções dos linfócitos T, em relação a superexpressão de IRF2BP2. Observamos uma redução no número total de linfócitos nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ (Figura 4.2.1). Corroborando esse resultado, nas análises macroscópicas dos órgãos, foi possível observar uma redução no tamanho dos linfonodos dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻. Entretanto, não observamos o mesmo fenótipo para no baço dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ (Figura 4.2.2).

Além disso, observamos também uma redução nas populações CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ no baço e nos linfonodos dos animais (Figura 4.3.1 e 4.3.2). Esses resultados corroboram com estudo prévio do nosso grupo, demonstrou que a superexpressão de IRF2BP2 em linfócitos T CD4 causa uma diminuição da proliferação celular (SECCA *et.al.*, 2016). No mesmo trabalho foi demonstrado que a diminuição do número de linfócitos não está relacionada a eventos de morte celular, sendo estes relacionados à redução da proliferação em linfócitos T CD4 superexpressando IRF2BP2. Estes dados reforçam o papel dessa proteína como um repressor transcricional, como descrito na literatura (KOEPEL *et.al.*, 2009; CARNEIRO *et.al.*, 2016; CHEN *et.al.*, 2015; SECCA *et.al.*, 2016).

Recentemente foi descrito uma mutação em IRF2BP2, associada a uma síndrome familiar de imunodeficiência variável comum (CVID), ocasionando uma redução na produção de plasmoblastos *in vitro* (KELLER *et al.*, 2016). O trabalho mencionado demonstrou um possível papel desta proteína na regulação da resposta

de células B. Em conjunto, esses dados reforçam um possível papel de IRF2BP2 na geração destas células. Todavia, mais estudos são necessários para compreendermos os mecanismos de ação de IRF2BP2 na geração de células B.

Surpreendentemente, ao avaliarmos a população de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$), observamos um aumento dessa população nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^+$, quando comparado aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^-$ (Figura 4.4.1). As células Tregs são uma subpopulação de células T, com um papel fundamental na tolerância imunológica e extremamente importante na prevenção do desenvolvimento de doenças autoimunes. Já foi demonstrado que alteração na quantidade e/ou qualidade funcional das células Tregs, são associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes (SAKAGUCHI, 2007; READ, 2000).

Em modelos de doenças autoimunes em camundongos, foi observado que o número adequado de células Tregs é fundamental para a prevenção de doenças autoimunes. Além disso, existem evidências que células T na periferia podem ser induzidas ao fenótipo T regulador, após transferência adotiva destas (SAKAGUCHI, *et al.*, 2001). Em conjunto, esses dados demonstram a importância das células T regulatórias.

Nossos resultados demonstram um aumento de células Tregs nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^+$, sugerindo o envolvimento de IRF2BP2 na geração de células T regulatórias. Ademais, estes dados nos permitem especular que animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^+$ podem desenvolver uma ação protetora contra doenças autoimunes, uma vez que o número de células Tregs encontra-se aumentado. Entretanto, mais experimentos são necessários para avaliar se esta observação possui alguma implicação biológica *in vivo*.

Outro aspecto importante no campo de estudo da ativação de linfócitos é geração de células de memória. Avaliamos as populações de células $CD44^+$, $CD62L^+$ e $CD122^+$ nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^+$ e $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^-$. Embora ainda não existam dados na literatura que relacionem a atividade de IRF2BP2 com a geração de células de memória, dados não publicados do nosso grupo demonstraram que a superexpressão ectópica de IRF2BP2 em linfócitos T CD8 ocasiona um aumento da população de células $CD44^+CD62L^+$ diferenciadas *in vitro* (NEITZKE-MONTINELLI & VIOLA, dados não publicados). Observamos um aumento na população de células $CD8^+CD44^+CD122^+$ nos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^+$ quando comparado aos animais $IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre^-$ (Figura 4.5.1C). Células $CD8^+CD44^+CD122^+$ são conhecidas como células T CD8 de memória inata quando

originadas do timo e células T CD8 de memória virtual quando originadas na periferia (JAMESON *et al.*, 2015). É importante ressaltar que essa população está presente sem o contato prévio com um antígeno estranho (WHITE *et al.*, 2017). Em conjunto esses dados sugerem o envolvimento de IRF2BP2 na geração de células T de memória. Entretanto mais estudos são necessários para avaliarmos o envolvimento de IRF2BP2 na geração e manutenção das células de memória.

Para avaliação do envolvimento de IRF2BP2 na ativação celular, avaliamos a expressão de proteínas marcadoras de ativação CD25 e CD69 cuja expressão normalmente é aumentada em células ativadas. O CD69 é uma das primeiras proteínas a serem expressas em células T ativadas, muito utilizado como um marcador de ativação celular em linfócitos T (ZIEGLER *et al.*, 1994). Com relação a esses marcadores observamos níveis similares de expressão entre os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺.

De forma semelhante também verificamos a ativação dos linfócitos através da dupla marcação de CD44 e CD62L. A expressão da proteína marcadora de ativação CD62L, cuja expressão é diminuída após a ativação em linfócitos. Já CD44 está envolvida com adesão de leucócitos ao endotélio, permitindo a agregação celular de forma que o aumento deste está relacionado à ativação celular. Foi possível observar uma diminuição das populações de células CD8⁺CD62L^{high}CD44⁻ e CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻ nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ (Figura 4.5.1A e B, 4.6.1A e B). Para as populações de células CD8⁺CD62L^{high}CD44⁺, CD4⁺CD62L^{high}CD44⁺, CD8⁺CD62L^{low}CD44⁺ e CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ observamos um aumento nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ (Figura 4.5.1A e B, 4.6.1A e B). Em relação a esses marcadores, o aumento das populações CD8⁺CD62L^{high}CD44⁺, CD4⁺CD62L^{high}CD44⁺, CD8⁺CD62L^{low}CD44⁺ e CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ e a diminuição das populações CD8⁺CD62L^{high}CD44⁻ e CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻ sugere que IRF2BP2 possa regular a ativação linfocitária.

Para investigar um possível papel para IRF2BP2 na diferenciação e função efetora dos linfócitos T *helper*, diferenciamos células T CD4 em culturas efetoras Th1, Th2 e Th17 (Figura 4.7.1) e analisamos as diferentes populações de células para cada um destes perfis. Observamos um aumento no percentual de células produtoras de IFN- γ , nos diferentes perfis efetores dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, quando comparado aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻. Como já mencionado anteriormente a produção de IFN- γ é característica exclusiva de células Th1 e não

de células Th2 ou Th17 (ZHU & PAUL, 2008), entretanto observamos a produção desta citocina nos perfis Th2 e Th17.

Curiosamente, as células cultivadas em condições não polarizantes (Figura 4.8.1) dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, produzem IFN- γ e IL-4. Gogran e colaboradores (2001), demonstraram que células T CD4 quando diferenciadas *in vitro*, nos tempos iniciais, após a ativação ocorre a produção de IFN- γ e IL-4, independente de citocinas polarizantes presentes no meio. Como mencionado anteriormente, YATES e colaboradores (2004) denominam esse estado das células como um perfil Th0. Em nossas análises observamos que as células T CD4 dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ quando diferenciadas *in vitro*, apresentavam a produção das citocinas dos perfis Th1 e Th2. Entretanto, podemos observar uma população de células duplo-positivas para estas citocinas (Figura 4.8.1), esta população representa aproximadamente 45% das culturas não polarizadas. Essa população de células demonstrada nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, sugere que além de um perfil misto de produção de citocinas, podemos ter uma população intermediária. Estes dados sugerem um atraso ou um estado estacionário na diferenciação destas células para os devidos perfis efetores (Th1 ou Th2).

Entretanto, outra hipótese que o nosso grupo está investigando, baseia-se em que durante a diferenciação das células T CD4, diferentes genes são ativados ou silenciados por regulação epigenética. Além dos fatores transcricionais específicos para cada perfil efector, que regulam a diferenciação Th1 e Th2, mecanismos epigenéticos também estão envolvidos nesse contexto. A capacidade da produção de citocinas para os perfis efetores está relacionada a modificações na estrutura da cromatina do gene de *Irfg* e *Il4*, sendo estas associadas com o comprometimento da reposta Th1 ou Th2 (AGARWAL, RAO, 1998; MURPHY & REINNER, 2002).

Nas células T CD4 *naive* os genes de *Irfg* e *Il4*, não estão localizados em uma região de cromatina silenciada. Entretanto, após diferenciadas para o respectivo fenótipo efector, os genes associados ao fenótipo efector oposto são silenciados (GOGRAN *et al.*, 2001). A acetilação de histonas H3 e H4 é aumentada no *locus* de *Irfg* e *Il4* após a diferenciação de células Th1 e Th2 respectivamente e são dependentes de T-bet e GATA-3 (FIELDS, KIM, FLAVELL, 2002; AVNI *et al.*, 2002). Células Th1 possuem o gene *IFNG* ativado e possuem silenciamento do gene de *IL4*, já as células Th2 apresentam um perfil oposto a esse (MURPHY & REINNER, 2002). Nesse contexto, poderíamos supor que IRF2BP2 pode induzir a acessibilidade dos *loci* destes genes, uma vez que a produção de IFN- γ é observada

nos diferentes perfis efetores. Entretanto, estas considerações neste momento são meramente especulativas e mais experimentos são necessários para entendermos o efeito de IRF2BP2 na diferenciação de células T CD4

Para compreendermos os possíveis efeitos de IRF2BP2 na resposta antigênica *in vivo* caracterizamos as populações linfocitárias dos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ sensibilizados com ovalbumina (OVA) na presença do adjuvante completo de Freund. Para essas análises foi possível compreender os possíveis efeitos de IRF2BP2 em resposta *in vivo* a um antígeno específico.

Observamos nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, sensibilizados com OVA, uma redução das populações de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. E observamos um aumento relativo na população de células B220⁺, resultado semelhante foi demonstrado ao analisarmos as células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), quando comparados aos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ sensibilizados com OVA (Figura 4.9.2). Confirmando o perfil de resposta observado nos animais *naive* (Figura 4.3.1, 4.3.2 e 4.4.1).

Em relação à proliferação celular nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ sensibilizados com OVA, utilizamos o marcador de proliferação celular Ki67. A proteína nuclear Ki67 desempenha uma função essencial na proliferação celular, expressa durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e não sendo expressa em G0 (GERDES *et al.*, 1983). Como mostrado na Figura 4.10.1, ao avaliarmos a proliferação de celular nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ e IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻ sensibilizados com OVA observamos uma redução da proliferação celular nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ quando comparado aos IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁻. O mesmo resultado foi observado em relação ao número total de linfócitos nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ sensibilizados. Como mencionado anteriormente, dados do nosso grupo demonstraram uma redução da proliferação celular em células T CD4 superexpressando IRF2BP2 (SÉCCA *et al.*, 2016). Juntos esses resultados nos sugere um possível papel de IRF2BP2 em vias de proliferação e/ou sobrevivência celular, necessitando de mais estudos para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

Finalmente, em conjunto nossos dados sugerem o envolvimento de IRF2BP2 em diferentes vias relacionadas à ativação e proliferação celular. Além disso, mais experimentos são necessários para avaliarmos os efeitos de IRF2BP2 na geração e função das células T regulatórias, uma vez que demonstramos um aumento dessa população de células nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺. Células T regulatórias são importantes nas doenças autoimunes, modelos clássicos de autoimunidade, nos

permitirão avaliar mais detalhadamente o papel da IRF2BP2 na função de células Treg. O aumento de IFN- γ demonstrado nos animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺, nos permite especular se este aumento seria capaz de uma atividade protetora, principalmente na fisiopatologia do câncer. Entretanto mais experimentos são necessários para avaliarmos as implicações fisiológicas destes achados *in vivo*.

6- CONCLUSÕES

- Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam uma diminuição no número total de linfócitos e uma redução nas populações de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺.

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ possuem um aumento na população de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺).

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam um aumento da população de células CD8⁺CD44⁺CD122⁺.

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam uma diminuição na população de células CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻ e um aumento das populações CD4⁺CD62L^{high}CD44⁺ e CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺.

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam uma diminuição na população de células CD8⁺CD62L^{high}CD44⁻ e um aumento das populações CD8⁺CD62L^{high}CD44⁺ e CD8⁺CD62L^{low}CD44⁺.

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ possuem um aumento na produção de IFN- γ nos diferentes perfis efetores Th1, Th2, Th17 e células não polarizadas quando diferenciados *in vitro*.

- Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam uma diminuição no número total de linfócitos e uma redução nas populações de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ em resposta a sensibilização com ovalbumina *in vivo*.

- Os animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ apresentam um aumento na população de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) em resposta a sensibilização com ovalbumina *in vivo*.

- Animais IRF2BP2^{fl/fl}Lck-Cre⁺ sensibilizados com ovalbumina apresentam uma resposta proliferativa diminuída de linfócitos em resposta a re-estimulação *in vitro* com ovalbumina.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª. edição. Editora Elsevier Ltda. Rio de Janeiro-RJ, 2012. 592p.

AFKARIAN, M. *et al.* **T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells**. *Nature immunology*, v. 3.6, p. 549, Jun 2002.

AGARWAL, S., & RAO, A. **Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation**. *Immunity*, v. 9, n. 6, p. 765-775. Dec 1998.

AHMED, R. & GRAY, D. **Immunological memory and protective immunity: understanding their relation**. *Science*, v. 272, n. 5258, p. 54-60, Apr 1996.

ANDERSON, G. *et al.* **Establishment and functioning of intrathymic microenvironments**. *Immunological reviews*. v. 209, n. 1, p. 10-27, Feb 2006.

ANSEL, K. M., LEE, D.U., RAO, A. **An epigenetic view of helper T cell differentiation**. *Nature immunology*, v. 4, n. 7, p. 616, Jul 2003.

AVNI, O. *et al.* **T H cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes**. *Nature immunology*, v. 3, n. 7, p. 643, Jul 2002.

BAECHER-ALLAN, C. *et al.* **CD4+ CD25high regulatory cells in human peripheral blood**. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, May 2001.

BHADRA, R. *et al.* **Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1–PDL-1 blockade**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 22, p. 9196-9201, Apr 2011.

BILATE, A. M., & LAFAILLE, J. J. **Induced CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance**. *Annual review of immunology*, v. 30, p. 733-758, Jan 2012.

BRUNKOW, M. E. *et al.* **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** *Nature genetics*, v. 27, n. 1, p. 68, Jan 2001.

CAMPBELL, J. J. *et al.* **6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3 β receptor CCR7.** *The Journal of cell biology*, v. 141, n. 4, p. 1053-1059, May 1998.

CAO, X. **Regulatory T cells and immune tolerance to tumors.** *Immunologic research*, v. 46, n. 1-3, p. 79-93, Sep 2010.

CARNEIRO, F. R. *et al.* **Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity.** *Molecular and cellular biology*, v. 31, n. 14, p. 2889-2901, May 2011.

CHATILA, T. A. **Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity.** *Endocrinology and Metabolism Clinics*, v. 38, n. 2, p. 265-272, Jun 2009.

CHEN, H. H. *et al.* **IRF2BP2 reduces macrophage inflammation and susceptibility to atherosclerosis.** *Circulation research*, CIRCRESAHA-114. Jul 2015

CHILDS, K.S., & GOODBOURN, S. **Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2.** *Nucleic acids research*, v.31, n.12, p.3016-3026, Apr 2003.

CHINEN, T. *et al.* **An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function.** *Nature immunology*, v. 17, n. 11, p. 1322, Nov 2016.

CHUVPILO, S. *et al.* **Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter.** *Nucleic Acids Res*, v. 21, n. 24, p. 5694-704, Dec 11 1993.

CIOFANI, M., & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. **A survival guide to early T cell development.** Immunologic research, v. 34, n. 2, p. 117-132, 2006.

COLLISON, L. W. *et al.* **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** Nature, v. 450, n. 7169, p. 566, Nov 2007.

COURTNEY, A. H., LO, W., & WEISS, A. **TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation.** Trends in biochemical sciences, Dec 2017.

CRUZ, S. A. *et al.* **Loss of IRF2BP2 in microglia increases inflammation and functional deficits after focal ischemic brain injury.** Frontiers in cellular neuroscience, v. 11, p. 201, 2017.

DE LAFAILLE, M. A. C., & LAFAILLE, J. J. **Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?.** Immunity, v. 30, n. 5, p. 626-635, May 2009.

DE LA ROSA, M. *et al.* **Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25+ regulatory T cell function.** European journal of Immunology, v. 34, n. 9, p. 2480-2488, Sep 2004.

DORAND, R. D. *et al.* **Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity.** Science, v. 353, n. 6297, p. 399-403, Jul 2016.

FIELDS, P. E., KIM, S. T. & FLAVELL, R. A. **Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN- γ loci accompany Th1/Th2 differentiation.** The Journal of Immunology, v. 169, n. 2, p. 647-650, May 2002.

FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., & RUDENSKY, A. Y. **Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells.** Nature immunology, v. 4, n. 4, p. 330, Mar 2003.

GERDES, J. *et al.* **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** International journal of cancer, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan 1983.

GERMAIN, R. N. **T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision.** *Nature reviews immunology*, v. 2, n. 5, p. 309, May 2002.

GERSHON, R. K., & KONDO, K. **Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.** *Immunology*, v. 18, n. 5, p. 723, Sep 1970.

GODFREY, D. I. *et al.* **A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression.** *The Journal of Immunology*, v. 150, n. 10, p. 4244-4252, May 1993.

GREEN, D. R. **Fas Bim boom!.** *Immunity*, v. 28, n. 2, p. 141-143, Feb 2008.

GROGAN, J. L. *et al.* **Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets.** *Immunity*, v. 14, n. 3, p. 205-215, Mar 2001.

HARADA, H. *et al.* **Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes.** *Cell*, v. 58, n. 4, p. 729-739, Aug 1989.

IHLE, J. N. **Cytokine receptor signalling.** *Nature*, v. 377, n. 6550, p. 591-4, Oct 19 1995.

JAMESON, S. C. & Masopust, D. **Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches.** *Immunity*, v. 31, n. 6, p. 859-871, 2009.

Kaech, S.M. & Cui, W. **Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation.** *Nature reviews Immunology*, 12(11), p.749, Nov 2012.

KAMBAYASHI, T. *et al.* **Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN- γ .** *The Journal of Immunology*. v. 170, no. 5, p. 2399-2408, Dec, 2002.

KAPLAN, M. H. *et al.* **Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells.** *Immunity*, v. 4, n. 3, p. 313-319, Mar 1996.

KELLER, M. D. *et al.* **Mutation in IRF2BP2 is responsible for a familial form of common variable immunodeficiency disorder.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 138, n. 2, p. 544-550. e4, Aug 2016.

KOEPPEL, M. *et al.* **The novel p53 target gene IRF2BP2 participates in cell survival during the p53 stress response.** Nucleic acids research, v. 37, n. 2, p. 322-335, Nov 2008.

KUHNS, M. S., DAVIS, M. M. & GARCIA, K. C. **Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex.** Immunity, v. 24, n. 2, p. 133-139, Feb 2006.

KUROSAKI, T., KOMETANI, K., & ISE, W. **Memory B cells.** Nature Reviews Immunology, v. 15, n. 3, p. 149, Mar 2015.

LANZAVECCHIA, A., & SALLUSTO, F. **Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination.** Nature immunology, v. 2, n. 6, p. 487, Jun 2001.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C. *et al.* **NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 13, p. 7214-7219, Jun 1999.

MACIAN, F. **NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.** Nature Reviews Immunology, v. 5, n. 6, p. 472, Jun 2005.

MACIÁN, F., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C., & RAO, A. **Partners in transcription: NFAT and AP-1.** Oncogene, v. 20, n. 19, p. 2476, 2001.

MACLEOD, M. K. L. *et al.* **CD4 memory T cells: what are they and what can they do?.** In: Seminars in immunology. Vol. 21, No. 2, pp. 53-61. Academic Press. Apr 2009.

MANGAN, P. R. *et al.* **Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage.** Nature, v. 441, n. 7090, p. 231, May 2006.

MATHIS, D., & BENOIST, C. **Aire**. Annual review of immunology, v. 27, p. 287-312, Dec 2009.

MCCARTY, A. S. *et al.* **Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily**. Molecular cell, v. 11, n. 2, p. 459-470, Feb 2003.

MEDZHITOV, R., & JANEWAY, C. J. **Innate immune recognition: mechanisms and pathways**. Immunological reviews, v. 173, n. 1, p. 89-97, Feb 2000.

MURPHY, K. M., & REINER, S. L. **Decision making in the immune system: the lineage decisions of helper T cells**. Nature Reviews Immunology, v. 2, n. 12, p. 933, Dec 2002.

PRINCE, A. L. *et al.* **The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T cell development** Immunological reviews, v. 228, n. 1, p. 115-131, Mar 2009.

RAMIALISON, M. *et al.* **Expression profiling in mouse fetal thymus reveals clusters of coordinately expressed genes that mark individual stages of T-cell ontogeny**. Immunogenetics, v. 54, n. 7, p. 469-478, Oct 2002.

RAO, A., LUO, C., & HOGAN, P. G. **Transcription factors of the NFAT family: regulation and function**. Annual review of immunology, v. 15, n. 1, p. 707-747, 1997.

READ, S., MALMSTRÖM, V., & POWRIE, F. **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation**. Journal of Experimental Medicine, v. 192, n. 2, p. 295-302, Jul 2000.

REZZANI, R., BONOMINI, F., & RODELLA, L.F. **Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development**. Progress in histochemistry and cytochemistry, v. 43, n. 2, p. 73-120, Mar 2008.

ROBBS, B. K. *et al.* **Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors.** *Molecular and cellular biology*, v. 28, n. 23, p. 7168-7181, Dec 2008.

RUSSELL, J.H., & TIMOTHY J.L. **Lymphocyte-mediated cytotoxicity.** *Annual review of immunology*. v. 20, p.1:323-370, Oct 2002.

SAKAGUCHI, S. *et al.* **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, May 1995.

SAKAGUCHI, S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nature immunology*, v. 6, n. 4, p. 345, Mar 2005.

SAKAGUCHI, S., WING, K., & MIYARA, M. **Regulatory T cells—a brief history and perspective.** *European journal of immunology*, v. 37, n. S1, Sep 2007.

SALLUSTO, F., & REINER, S. L. **Sliding doors in the immune response.** *Nature immunology*, v. 6, n. 1, p. 10, Jan 2005.

SAMELSON, L. E. **Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins.** *Annual review of immunology*, v. 20, n. 1, p. 371-394, 2002.

SAVINO, W. **The thymus is a common target organ in infectious diseases.** *PLoS pathogens*. v. 2, n. 6, p. e62, Jun 2006.

SÉCCA, C. *et al.* **IRF2BP2 transcriptional repressor restrains naive CD4 T cell activation and clonal expansion induced by TCR triggering.** *Journal of leukocyte biology*, v. 100, n. 5, p. 1081-1091, May 2016.

SHAH, D. K. & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. **An overview of the intrathymic intricacies of T cell development.** The Journal of Immunology, v. 192, n. 9, p. 4017-4023, May 2014.

SHRESTA, S. *et al.* **How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?** Current opinion in immunology, v. 10, n. 5, p. 581-587, 1998.

SMITH-GARVIN, J. E., KORETZKY, G. A., & JORDAN, M. S. **T cell activation.** Annual review of immunology, v. 27, p. 591-619, Jan 2009.

SOLIMAN, H., KHALIL, F., & ANTONIA, S. **PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells.** PloS one, v. 9, n. 2, p. e88557, Feb 2014.

STADHOUDERS, R. *et al.* **Control of developmentally primed erythroid genes by combinatorial co-repressor actions.** Nature communications, v. 6, p. 8893, Nov 2015.

SZABO, S. J. *et al.* **A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.** Cell, v. 100, n. 6, p. 655-669, Mar 2000.

TANG, Q. *et al.* **Distinct roles of CTLA-4 and TGF-B in CD4+ CD25+ regulatory T cell function.** European journal of immunology, v. 34, n. 11, p. 2996-3005, Nov 2004.

TANG, Q., & BLUESTONE, J. A. **The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation.** Nature immunology, v. 9, n. 3, p. 239, Mar 2008.

TANG, Q., & KRUMMEL, M. F. **Imaging the function of regulatory T cells in vivo.** Current opinion in immunology, v. 18, n. 4, p. 496-502, Jun 2006.

TENG, A. C. T. *et al.* **Identification of a phosphorylation-dependent nuclear localization motif in interferon regulatory factor 2 binding protein 2.** PloS one, v. 6, n. 8, p. e24100, Aug 2011.

TENG, A. C. T. *et al.* **IRF2BP2 is a skeletal and cardiac muscle-enriched ischemia-inducible activator of VEGFA expression.** The FASEB Journal, v. 24, n. 12, p. 4825-4834, Mar 2010.

Turvey, S. E., & David H. B. **Innate immunity.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 125, no. 2, p. S24-S32. Jul 2010

VAN DER MERWE, P. A., & DUSHEK, O. **Mechanisms for T cell receptor triggering.** Nature Reviews Immunology, v. 11, n. 1, p. 47, Jan 2011.

VAQUERIZAS, J. M. *et al.* **A census of human transcription factors: function, expression and evolution.** Nature Reviews Genetics, v. 10, n. 4, p. 252, Apr 2009.

VIGNALI, D. A. A., COLLISON, L. W., & WORKMAN, C. J. **How regulatory T cells work.** Nature Reviews Immunology, v. 8, n. 7, p. 523, Jul 2008.

WHITE, J. T., CROSS, E. W., & KEDL, R. M. **Antigen-inexperienced memory CD8+ T cells: where they come from and why we need them.** Nature Reviews Immunology, v. 17, n. 6, p. 391, May 2017.

YANG, S. J. *et al.* **The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development.** International immunology, v. 18, n. 5, p. 729-739, Mar 2006.

YATES, A., CALLARD, R., & STARK, J. **Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making.** Journal of theoretical biology, v. 231, n. 2, p. 181-196, Aug 2004.

YEUNG, K. T. *et al.* **A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2.** Molecular and cellular biology, v. 31, n. 11, p. 2287-2298, Mar 2011.

ZIEGLER, S. F., RAMSDELL, F., & ALDERSON, M. R. **The activation antigen CD69.** Stem cells, 12(5), p. 456-465, Jan 1994.

ZHENG, W., & FLAVELL, R. A. **The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.** *Cell*, v. 89, n. 4, p. 587-596, May 1997.

ZHOU, X. *et al.* **Plasticity of CD4+ FoxP3+ T cells.** *Current opinion in immunology*, v. 21, n. 3, p. 281-285, Jun 2009.

ZHU, J. *et al.* **Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T H 1- T H 2 responses.** *Nature immunology*, v. 5, n. 11, p. 1157, Oct 2004.

ZHU, J., & PAUL, W. E. **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** *Blood*, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, Sep 2008.

ZHU, J., YAMANE, H., & PAUL, W. E. **Differentiation of effector CD4 T cell populations.** *Annual review of immunology*, v. 28, p. 445-489, Jan 2009.

Zou, W., & Restifo, N. P. **T H 17 cells in tumour immunity and immunotherapy.** *Nature Reviews Immunology*, v.10, n. 4 p.248, Apr 2011.



PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 004/13

Parecer nº 004/13

Pesquisador: João Paulo de Biaso Viola	
Título do projeto: Estudo do Papel dos Fatores de Transcrição NFAT na Regulação Gênica e Estudo da Influência do Metabolismo Tumoral na Ativação e Função de Células T CD8+	
Data de entrada: 18/02/2013	Data da reunião: 27/02/2013
Situação do Projeto: APROVADO	
Considerações e Parecer:	
<p>Ao analisar o projeto de pesquisa "Estudo do Papel dos Fatores de Transcrição NFAT na Regulação Gênica e Estudo da Influência do Metabolismo Tumoral na Ativação e Função de Células T CD8+", tendo como pesquisador responsável João Paulo de Biaso Viola, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO.</p> <p>Informo que o solicitante possui o prazo de 180 dias a contar da data de hoje para apresentar o relatório parcial de atividades relacionadas ao projeto aprovado e, após o término de validade do mesmo, o prazo de 30 dias para apresentar o relatório final, ambos em modelo aprovado pela CEUA-INCA.</p>	

Rio de Janeiro, 26 de março de 2013.

Renata Batista da Silva Loza Telleria
Coordenadora da CEUA-INCA