

LEONARDO AUGUSTO KARAM TEIXEIRA

**PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1
NA DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

LEONARDO AUGUSTO KARAM TEIXEIRA

PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1
NA DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica

Orientador: Dr. João Paulo de Biaso Viola

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2006

Teixeira, Leonardo Augusto Karam.

Participação do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação e proliferação de linfócitos/ Leonardo Augusto Karam Teixeira.

Rio de Janeiro: UFRJ, CCS, 2006.

xviii, 173f.: il.; 31 cm.

Orientador: João Paulo de Biaso Viola

Tese de Doutorado - UFRJ, CCS, Instituto de Bioquímica Médica, Pós-graduação em Química Biológica, 2006.

Referências Bibliográficas: f. 91-113.

1. Linfócitos 2. NFAT 3. Diferenciação 4. Proliferação
5. Interferon-gama 6. Ciclina I. Viola, João Paulo de Biaso
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Bioquímica Médica III. Participação do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação e proliferação de linfócitos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Participação do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação e proliferação de linfócitos

Leonardo Augusto Karam Teixeira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica

Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2006.

Aprovado por:

Dr. João Paulo de Biaso Viola, Pesquisador Associado, INCA (Orientador)

Dra. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, Professora Titular, UFRJ (Revisora)

Dr. Franklin David Rumjanek, Professor Titular, UFRJ (Membro da banca)

Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes, Professor Doutor, USP (Membro da banca)

Dr. Luiz Fernando Reis, Membro Associado, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (Membro da banca)

Dr. Bruno Lourenço Diaz, Pesquisador, INCA (Suplente)



Este trabalho foi desenvolvido na Divisão de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) sob a orientação do Dr. João Paulo de Biaso Viola e com o auxílio financeiro da Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do “Fogarty International Research Collaboration Award” (FIRCA/NIH) e de Furnas Centrais Elétricas S.A.

*"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."*

Ricardo Reis

Aos meus pais e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mário e Rose, por todo o amor e toda a dedicação em cada minuto da minha vida. Pela educação, pelo carinho e pela incansável disposição em ajudar. A vocês, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos, Marco e Felipe, pela nossa grande amizade. Ao Kiko por estar sempre pronto para ajudar e pelo incentivo constante e ao Lipe pelos ensinamentos e discussões científicas nas madrugadas adentro.

Ao Dr. João Viola pelo exemplo de ética e dedicação à ciência. Pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela excelência da orientação, pelo privilégio das discussões científicas e pela amizade e confiança construída nesses anos.

À Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA) e a todos os órgãos financiadores desse trabalho.

À Dra. Anjana Rao pela oportunidade e pelas discussões científicas densas e objetivas.

Ao Dr. Marcelo Barcinski pelas discussões, pelos conselhos e pelo aprendizado nesses anos.

Ao Dr. Bruno Diaz pelo incentivo e pelas críticas sempre incisivas e pertinentes.

À Dra. Patrícia Bozza pela colaboração científica e pelas sugestões ao longo do projeto.

À Dra. Vivian Rumjanek pelo acompanhamento e revisão da tese.

Ao Maurício e à Bianca por estarem sempre dispostos a ajudar durante a minha adaptação ao laboratório e nos primeiros experimentos.

À Dri pela disposição incondicional durante o trabalho e pela grande amizade e carinho.

À Lilian pela parceria na bancada e pela amizade e confiança em todos esses anos.

À Nina pela vontade de trabalhar e por animar os dias de trabalho com a sua alegria.

À Bruna e ao Bruno Robbs pela dedicação e pela colaboração no projeto.

Ao pessoal das Divisões de Biologia Celular e Medicina Experimental que contribuíram com discussões científicas e alegraram o dia-a-dia, especialmente a Maria Theresa, Cristiane, Margot, Giu e Ana Paula.

Ao pessoal do apoio técnico da Divisão de Biologia Celular e do Biotério do INCA pela eficiência no trabalho e pela disposição em ajudar.

À Marilene e à Sueli pela paciência, ajuda e amizade. Com vocês, tudo ficou mais fácil...

Ao Dr. Mark Ansel pela disponibilidade, pela força na bancada e pelo grande incentivo.

Ao grupo da Dra. Anjana Rao pelas sugestões, críticas e incentivos. E claro, pelas partidas de futebol e volley no gramado da universidade.

Ao Marcelão pelos conselhos, pelos questionamentos e pelas histórias maravilhosas vividas ao longo desses anos.

Ao meu grande camarada Little pela amizade, pela parceria a qualquer hora e pelos vários momentos de muita alegria.

Ao Bê e à Miriam por terem me recebido de braços abertos e pela convivência inesquecível que tivemos em Boston. Com tudo!

À máfia lusitana de Boston por estreitar a distância e temperar a rotina com muita alegria.

À galera da Biologia da UFRJ pela convivência de tantos anos, pelas discussões científicas nas salas de aula, nos congressos e nos bares da vida e pela grande amizade que cultivamos até hoje.

Aos meus bons e velhos amigos por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos: especialmente ao Beto, Dario, Marcelinho, Renatinho, Rossano, Bárbara e Zana.

Às minhas irmãs gaúchas Elise e Luciana e aos meus irmãos gaudérios Alemão e Andrés pela amizade, pelo carinho e pela saudade de sempre.

Ao Cacá pelos conselhos em boa hora, pelo grande incentivo e pelas conversas profundas.

À minha vó Amélia por acreditar cada vez mais e à minha imensa família pelo apoio.

À Anita pelo nosso respeito, pela nossa amizade e pelo nosso amor. Obrigado pelo carinho e pela dedicação em todos os momentos!

Aos que me ajudaram a encontrar e construir os caminhos da vida.

RESUMO

Os fatores de transcrição da família NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) foram identificados inicialmente como reguladores da expressão de citocinas em células do sistema imune. Contudo, estas proteínas também são capazes de regular a expressão de genes relacionados com a diferenciação, a proliferação e a apoptose em outros tipos celulares. Neste trabalho, foi demonstrado que a proteína NFAT1 participa da diferenciação e da proliferação de linfócitos. Mais especificamente, que o NFAT1 induz a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ e reprime a expressão de ciclina A2 em linfócitos. A estimulação do receptor de célula T (TCR, “T Cell Receptor”) foi suficiente para ativar a proteína NFAT1, transativar o promotor de IFN- γ e induzir a produção desta citocina em linfócitos T CD8⁺. A produção de IFN- γ por estas células foi capaz de modular a resposta imune Th1/Th2 e controlar a inflamação alérgica *in vivo*. Por outro lado, NFAT1 inibiu a proliferação celular de linfócitos. A ausência do fator de transcrição NFAT1 levou a hiperproliferação linfocitária, ao encurtamento do tempo de ciclo celular e a expressão aumentada de ciclinas. A proteína NFAT1 foi capaz de se ligar ao promotor de ciclina A2 e reprimir sua expressão. Estes resultados demonstram que o NFAT1 é um regulador central da diferenciação e da proliferação de linfócitos, sugerindo um papel indutor na resposta Th1 e um papel supressor no ciclo celular.

ABSTRACT

The NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) family of transcription factors has been initially identified as regulators of cytokine gene expression in immune cells. However, these proteins are also able to regulate the expression of genes related to cell differentiation, proliferation, and apoptosis in other cell types. In this work, we have demonstrated that NFAT1 protein takes part in lymphocyte differentiation and proliferation. Specifically, NFAT1 induces IFN- γ production in CD8⁺ T cells, and represses cyclin A2 expression in lymphocytes. T cell receptor (TCR) triggering was sufficient to activate NFAT1 protein, transactivate IFN- γ promoter, and induce IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes. IFN- γ production by CD8⁺ T cells was able to modulate Th1/Th2 immune response and control allergic inflammation *in vivo*. On the other hand, NFAT1 inhibited cellular proliferation of lymphocytes. The absence of NFAT1 transcription factor led to lymphocyte hyperproliferation, cell cycle duration shortening, and cyclin overexpression. NFAT1 protein was able to bind to cyclin A2 promoter and downregulate its expression. These results demonstrate that NFAT1 is a master regulator of lymphocyte differentiation and proliferation, suggesting an inducer role in Th1 responses and a suppressor role in cell cycle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AP | Proteína ativadora |
| APC | Célula apresentadora de antígeno |
| Bcl-2 | Leucemia e linfoma de célula B |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| Ca ²⁺ | Íon divalente de Cálcio |
| CaM | Calmodulina |
| CCL11 | Ligante 11 de quimiocina do tipo CC |
| CCR3 | Receptor 3 de quimiocina do tipo CC |
| CD | Grupo de diferenciação |
| CD40L | Ligante de CD40 |
| CDK | Cinase dependente de ciclina |
| CDKI | Inibidor de cinase dependente de ciclina |
| cDNA | DNA complementar |
| CFA | Adjuvante completo de Freund |
| CFSE | Éster succinimidil diacetato carboxifluoresceína |
| ChIP | Imunoprecipitação de cromatina |
| CHO | Células do ovário de hamster chinês |
| CK-1 | Caseína cinase-1 |
| c-Myc | Oncogene do vírus da mielocitomatose aviária |
| Cn | Calcineurina |
| COX-2 | Ciclo-oxigenase-2 |
| CPM | Contagens por minuto |
| CRAC | Canal ativado pelo receptor de Cálcio |
| CsA | Ciclosporina A |
| CTL | Linfócito T citotóxico |
| CTLA-4 | Antígeno 4 de linfócito T citotóxico |
| CTLL | Linhagem celular de linfócito T citotóxico |
| CXCL9 | Ligante 9 de quimiocina do tipo CXC |
| DAG | Diacil glicerol |
| DBD | Domínio de ligação ao DNA |
| DMEM | Meio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DTH | Hipersensibilidade de tipo tardia |
| DTT | Ditiotreitol |
| E2F | Fator de ligação ao promotor E2 |
| EBI | “European Bioinformatics Institute” |
| EDTA | Ácido etileno diamino tetracético |
| EGR | Proteína de resposta ao crescimento prematuro |
| EGTA | Ácido etileno glicol tetracético |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| EMSA | Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética |
| Eomes | Eomesodermina |
| EPM | Erro padrão da média |
| FACS | Separação celular ativada por fluorescência |
| FasL | Ligante de Fas |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| g | Gravidade |
| G | Fase de intervalo |

| | |
|-----------------|---|
| G ₀ | Fase de quiescência |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos |
| GSK-3 | Cinase sintase de glicogênio-3 |
| HAT | Enzima acetil-transferase de histona |
| HDAC | Enzima desacetilase de histona |
| HEPES | Ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico |
| HRP | Peroxidase de <i>A Armoracia rusticana</i> (“Horseradish peroxidase”) |
| IFN | Interferon |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| INK4 | Inibidor de CDK-4 |
| Iono | Ionicina |
| IP ₃ | Inositol trifosfato |
| ITAM | Motivo de ativação de tirosina em imunoreceptor |
| JNK | Cinase de região terminal NH ₂ de c-Jun |
| Luc | Luciferase |
| M | Molar ou Fase de mitose |
| mA | Miliamper |
| MAP | Proteína ativada por mitógeno |
| MCA | Metilcolantreno |
| MCP-1 | Proteína quimiotática de monócito-1 |
| mg | Miligrama |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| Mig | Monocina induzida por IFN- γ |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| NCBI | “National Center for Biotechnology Information” |
| NES | Sinal de exportação nuclear |
| NF κ B | Fator nuclear κ B |
| NFAT | Fator nuclear de células T ativadas |
| ng | Nanograma |
| NHR | Região de homologia a NFAT |
| NIH | “National Institutes of Health” |
| NK | Células assassinas naturais |
| NKT | Células T assassinas naturais |
| NLS | Sinal de localização nuclear |
| nm | Nanômetro |
| nM | Nanomolar |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| OREBP | Proteína ligadora do elemento da resposta osmótica |
| OVA | Ovalbumina |
| p | Probabilidade |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pb | Pares de base |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PE | Ficoeritrina |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PI | Iodeto de Propídeo |
| Pim-1 | Inserção do provírus da leucemia murina de Moloney |

| | |
|--------------------------|---|
| PIP ₂ | Fosfatidil inositol bifosfato |
| PKA | Proteína cinase A |
| PKC | Proteína cinase C |
| PLC | Fosfolipase C |
| PMA | Forbol miristato acetato |
| PMSF | Fluoreto de fenil metil sulfonil |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| R | Ponto de restrição |
| RANTES | Secretada e expressa em células T normais e regulada durante a ativação |
| Ras | Oncogene do vírus do sarcoma murino de Harvey e Kirsten |
| Rb | Retinoblastoma |
| RHR | Região de homologia a Rel |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNase | Ribonuclease |
| RPA | Ensaio de proteção a RNase |
| RT-PCR | Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase |
| S | Fase de síntese |
| SDS | Duodecil sulfato de sódio |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SP | Motivo com repetições de serina e prolina |
| SRR | Região rica em serina |
| STAT | Ativador de transcrição e transdutor de sinal |
| TAD | Domínio de transativação |
| TBE | Tampão Tris Borato EDTA |
| T-bet | T-box expresso em células T |
| TBS | Tampão Tris salina |
| Tc | Célula T citotóxica |
| TCR | Receptor de célula T |
| TE | Tampão Tris EDTA |
| TF | Fator de transcrição |
| Th | Célula T auxiliar ou “T helper” |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TonEBP | Proteína ligadora do elemento ativador responsivo a tonicidade |
| Tris | Tris hidroximetil amino metano |
| U | Unidade |
| URL | Unidade relativa de luz |
| V | Volts |
| VEGF | Fator de crescimento de endotélio vascular |
| YY1 | Yin Yang 1 |
| ZAP-70 | Proteína 70 associada a zeta |
| Δ | Deleção |
| °C | Graus Celsius |
| μCi | MicroCurie |
| μF | MicroFaraday |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| [γ ³² P] dATP | Desoxiadenina trifosfato marcada com fósforo isótopo 32 no carbono γ |
| ³ H | Trítio |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** O estímulo do TCR induz a ativação de NFAT. 5
- Figura 2:** Esquema representativo dos membros da família NFAT. 7
- Figura 3:** Os mecanismos moleculares da diferenciação Th1/Th2 em linfócitos T CD4⁺. 11
- Figura 4:** As fases do ciclo celular. 19
- Figura 5:** Frequência celular de diferentes populações linfocitárias avaliadas por citometria de fluxo. 54
- Figura 6:** Linfócitos T CD8⁺ representam a principal fonte de IFN- γ durante o estímulo primário de células T. 55
- Figura 7:** Linfócitos T CD8⁺ produzem IFN- γ após o estímulo do TCR. 56
- Figura 8:** NFAT1 é ativado e translocado para o núcleo de linfócitos T CD8⁺ após o influxo de Ca²⁺. 57
- Figura 9:** Influxo de Ca²⁺ induz a transativação e a produção de IFN- γ na linhagem celular CTLL-R8⁺. 58
- Figura 10:** NFAT transativa o promotor murino de IFN- γ na linhagem celular CTLL-R8⁺. 59
- Figura 11:** NFAT1 é essencial para a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺. 60
- Figura 12:** Expressão de Eomesodermina é semelhante entre linfócitos T CD8⁺ de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. 61
- Figura 13:** Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ induz a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o tipo Th1. 62
- Figura 14:** Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ controla a migração de eosinófilos em um modelo de inflamação alérgica *in vivo*. 63
- Figura 15:** Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ regula o padrão de citocinas durante a resposta alérgica *in vivo*. 64
- Figura 16:** Linfócitos NFAT1^{-/-} hiperproliferam durante o desafio *in vitro*. 65
- Figura 17:** Hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-} não está restrita a um compartimento celular específico. 66
- Figura 18:** Hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-} independe da alta produção de IL-4. 67

| | |
|--|----|
| Figura 19: Linfócitos NFAT1 ^{-/-} superexpressam diferentes genes de ciclinas. | 68 |
| Figura 20: Linfócitos NFAT1 ^{-/-} hiperproliferam durante o estímulo primário <i>in vitro</i> . | 69 |
| Figura 21: Enriquecimento de linfócitos NFAT1 ^{-/-} em fases S e G ₂ /M do ciclo celular após o estímulo primário <i>in vitro</i> . | 70 |
| Figura 22: Identificação de uma região repressora no promotor murino de ciclina A2. | 71 |
| Figura 23: Localização de um sítio de ligação para NFAT na região repressora do promotor murino de ciclina A2. | 72 |
| Figura 24: NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor murino de ciclina A2 <i>in vitro</i> . | 73 |
| Figura 25: NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor murino de ciclina A2 <i>in vivo</i> . | 74 |
| Figura 26: NFAT1 é um repressor da expressão do promotor murino de ciclina A2. | 75 |
| Figura 27: Localização de quatro sítios de ligação para NFAT em uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2. | 76 |
| Figura 28: NFAT1 é capaz de se ligar a uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2 <i>in vivo</i> . | 77 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O sistema imune e os linfócitos T | 1 |
| 1.2. A ativação de linfócitos T | 2 |
| 1.3. Os fatores de transcrição da família NFAT | 4 |
| 1.4. A diferenciação celular | 9 |
| <i>A diferenciação de linfócitos Th1/Th2</i> | 9 |
| <i>O NFAT e a diferenciação linfocitária</i> | 12 |
| <i>O IFN-γ e a resposta alérgica</i> | 13 |
| 1.5. A proliferação celular | 16 |
| <i>O ciclo celular</i> | 16 |
| <i>O NFAT e a proliferação celular</i> | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1. Animais | 23 |
| 3.2. Linhagens celulares e células primárias | 23 |
| 3.3. Reagentes | 24 |
| 3.4. Purificação de anticorpos | 24 |
| 3.5. Purificação de linfócitos | 25 |
| 3.6. ELISA | 25 |
| 3.7. Marcação de citocina intracelular | 26 |
| 3.8. Ensaio de proteção a RNase (RPA) | 26 |
| 3.9. Western blot | 27 |
| 3.10. Imunofluorescência | 28 |
| 3.11. Plasmídeos | 29 |
| 3.12. Ensaio de transativação | 30 |
| 3.13. RT-PCR | 31 |
| 3.14. Co-cultura de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ | 31 |
| 3.15. Sensibilização de animais | 32 |
| 3.16. Modelo de inflamação alérgica <i>in vivo</i> | 32 |
| 3.17. Ensaio de proliferação celular | 33 |
| 3.18. Bioinformática | 34 |
| 3.19. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) | 34 |
| 3.20. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) | 36 |
| 3.21. Análise estatística | 38 |
| 4. RESULTADOS | 40 |
| 4.1. A participação do NFAT1 na diferenciação de linfócitos | 40 |
| 4.1.1. <i>Linfócitos T CD8⁺ produzem IFN-γ após o estímulo do TCR</i> | 40 |
| 4.1.2. <i>NFAT1 é essencial para a produção de IFN-γ em linfócitos T CD8⁺</i> | 42 |
| 4.1.3. <i>Produção de IFN-γ por linfócitos T CD8⁺ induz a diferenciação do tipo Th1 in vitro e controla a inflamação alérgica in vivo</i> | 45 |

| | |
|--|-----|
| 4.2. A participação do NFAT1 na proliferação de linfócitos | 47 |
| 4.2.1. Ausência de NFAT1 induz a hiperproliferação linfocitária durante o desafio in vitro | 47 |
| 4.2.2. NFAT1 é um repressor da proliferação celular em linfócitos | 49 |
| 4.2.3. NFAT1 se liga ao promotor e reprime a expressão de ciclina A2 | 50 |
| 5. DISCUSSÃO | 78 |
| 6. CONCLUSÕES | 90 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |
| 8. APÊNDICES | 114 |
| 8.1. Artigos originais | |
| 8.1.1. Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA, Viola JPB (2002). NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. <i>FASEB J</i> , 16: 1940-1942. | 114 |
| 8.1.2. Teixeira LK, Fonseca BPF, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, Bozza PT, Viola JPB (2005). IFN- γ production by CD8 ⁺ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. <i>J Immunol</i> , 175: 5931-5939. | 135 |
| 8.2. Artigos de revisão | |
| 8.2.1. Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK (2005). NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. <i>Braz J Med Biol Res</i> , 38: 335-344. | 145 |
| 8.2.2. Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, Viola JPB (2005). The role of interferon- γ on immune and allergic responses. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> , 100: 137-144. | 156 |
| 8.3. Capítulo de livro | |
| 8.3.1. Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF (2004). Imunologia tumoral. In: <i>Oncologia Molecular</i> . p. 105-112. Editores: CG Ferreira e JCC da Rocha. São Paulo, Editora Atheneu. | 165 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema imune e os linfócitos T

O sistema imune é formado por um conjunto de células e moléculas que defendem o organismo de infecções e antígenos estranhos ao corpo e ainda reconhecem e toleram antígenos próprios. A resposta imune é caracterizada por uma primeira linha de defesa rápida e pouco específica contra o patógeno, chamada de imunidade inata. Por sua vez, o sistema imune inato é capaz de informar e estimular uma resposta imunológica mais específica que é dependente de linfócitos T e B, denominada de imunidade adaptativa. A perda do controle da resposta imune em uma destas etapas pode levar ao aparecimento de alergias, inflamações, doenças auto-imunes e câncer (Janeway, 2001).

No indivíduo adulto, as células do sistema imune são produzidas na medula óssea a partir da diferenciação de células-tronco hematopoéticas. Estas células dão origem a precursores mielóides e linfóides responsáveis pela heterogeneidade observada no sistema. Os precursores mielóides são capazes de se diferenciar na medula óssea em monócitos, neutrófilos, eritrócitos, eosinófilos e outros granulócitos. Já os precursores linfóides se diferenciam em linfócitos T, B e células NK (“Natural Killer”) nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) (Kondo *et al.*, 2001).

Os precursores de linfócitos T têm a sua origem na medula óssea, porém seus processos de maturação e diferenciação ocorrem no timo (von Boehmer *et al.*, 2003). Neste órgão, os timócitos (linfócitos T imaturos) passam por uma série de rearranjos gênicos que levam à expressão do TCR (“T Cell Receptor”), receptor que caracteriza os linfócitos T. O TCR é composto pela associação de 2 cadeias polipeptídicas transmembranares que podem formar heterodímeros do tipo $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. A formação do complexo TCR depende ainda da associação destas cadeias com outras moléculas de superfície, como a molécula CD3 e a cadeia ζ (Weiss, 1993). O rearranjo do TCR é a base da diversidade do repertório de linfócitos T capazes de

reconhecer a variedade de antígenos a que somos apresentados. Após a expressão do TCR na superfície celular, os linfócitos T passam pelo processo de seleção tímica (positiva e negativa), onde são testados para a especificidade antigênica de seus TCRs (Goldrath e Bevan, 1999; von Boehmer *et al.*, 2003). Ainda no timo, os linfócitos T sobreviventes se diferenciam em dois tipos celulares, caracterizados pela expressão dos co-receptores CD4 e CD8. Os linfócitos T CD4⁺ são denominados T auxiliares (Th, “T helper”) e os linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos com o processo de citotoxicidade (CTL, “Cytotoxic T Lymphocyte”) (Goldrath e Bevan, 1999; von Boehmer *et al.*, 2003). Os linfócitos T maduros, porém ainda indiferenciados (“naive”), estão aptos a abandonar o timo e colonizar os órgãos linfóides secundários, como o baço e os linfonodos. Nestes órgãos, os linfócitos T podem ser apresentados a diferentes antígenos capturados e processados por células APC (“Antigen Presenting Cells”). Após a captura do antígeno em diferentes tecidos, as células APC (células dendríticas e macrófagos) migram para os órgãos linfóides secundários, onde se encontram com os linfócitos T maduros. Neste momento, inicia-se o processo de ativação de linfócitos T (Janeway e Bottomly, 1994).

1.2. A ativação de linfócitos T

A ativação de linfócitos T ocupa um papel central na geração da imunidade adaptativa. Os linfócitos T reconhecem antígenos apresentados pelas células APC através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, “Major Histocompatibility Complex”). No momento da ativação linfocitária, o TCR reconhece moléculas de MHC associadas a peptídeos derivados da degradação de proteínas sintetizadas dentro da própria célula (MHC de classe I) ou da ingestão por vias endocíticas (MHC de classe II). Esta ligação (primeiro sinal de ativação) pode ser estabilizada pelo co-receptor CD8, que reconhece moléculas de MHC de classe I, ou pelo co-receptor CD4, que reconhece moléculas de MHC de classe II (Germain, 1994). Além do primeiro sinal, outras moléculas co-estimulatórias estão envolvidas no processo de ativação de linfócitos T. O principal sinal co-estimulador ocorre através da interação da molécula CD28

expressa em linfócitos T com seu ligante B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) expressos nas APCs (segundo sinal de ativação). As proteínas da família B7 apresentam um papel dual na resposta imune. Elas podem interagir tanto com a molécula de CD28, aumentando e sustentando a ativação de linfócitos T, como também com a molécula CTLA-4 (CD152), gerando um sinal inibitório (Lenschow *et al*, 1996). As cascatas intracelulares disparadas através do primeiro e segundo sinais induzem a ativação celular, a diferenciação, a proliferação (expansão clonal), e a aquisição de funções efetoras (Janeway e Bottomly, 1994).

O reconhecimento do antígeno induz o agrupamento de diversas moléculas de TCR na superfície dos linfócitos T, exatamente na região de contato com as APCs (sinapse imunológica) (Cantrell, 1996). Este agrupamento de receptores aproxima proteínas cinases que estão associadas a domínios citoplasmáticos dos co-receptores CD4 e CD8. Por sua vez, estas proteínas fosforilam os motivos ITAMs (“Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif”) encontrados nas porções citoplasmáticas da molécula CD3 e da cadeia ζ , ativando o complexo TCR. Uma vez fosforilados, estes ITAMs se tornam sítios de recrutamento para outras proteínas cinases de tirosinas (ZAP-70), proteínas adaptadoras e enzimas celulares, como a fosfolipase C_γ (PLC_γ) e as Ras-MAP cinases. A ativação de PLC_γ leva à hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2), formando os produtos inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 é um mediador da liberação de Cálcio (Ca^{2+}) de reservatórios intracelulares enquanto o DAG é um ativador da proteína cinase C (PKC). O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e a indução de PKC e de proteínas Ras-MAP cinases são eventos fundamentais para a ativação de linfócitos T. Somadas, estas vias disparam processos bioquímicos intracelulares que culminam com a indução de diversos fatores de transcrição, como NFAT, $NF\kappa B$ e AP-1. Uma vez ativados, estes fatores de transcrição são translocados para o núcleo, onde participam da regulação da expressão de uma série de genes (Crabtree e Clipstone, 1994; Weiss e Littman, 1994; Cantrell, 1996).

1.3. Os fatores de transcrição da família NFAT

Os fatores de transcrição da família NFAT (“Nuclear Factor of Activated T cells”) desempenham um papel central durante a ativação de linfócitos T (Rao *et al.*, 1997). Estas proteínas regulam a expressão de diversos genes relacionados com a resposta imune, como genes de citocinas e moléculas de superfície. Inicialmente descrita em linfócitos T ativados, a proteína NFAT foi caracterizada como um fator nuclear indutível que apresentava a capacidade de se ligar ao promotor humano de interleucina-2 (IL-2) (Shaw *et al.*, 1988). Contudo, membros desta família foram identificados posteriormente em diversos tipos celulares com a capacidade de regular fenômenos biológicos variados, como a proliferação e a morte celular (Rao *et al.*, 1997; Horsley e Pavlath, 2002; Macián, 2005).

A ativação das proteínas NFAT ocorre após o estímulo de receptores acoplados à mobilização de Ca^{2+} , como receptores antigênicos de células T e B ou receptores Fc presentes em monócitos, mastócitos e células NK (Rao *et al.*, 1997). A estimulação destes receptores leva a formação de IP_3 que mobiliza o Ca^{2+} presente em reservatórios citoplasmáticos, como o retículo endoplasmático. O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} induz a abertura de canais de membrana plasmática (CRAC, “ Ca^{2+} Receptor Activated Channels”) que sustentam os níveis citoplasmáticos e induzem a ativação de enzimas dependentes de calmodulina, como a calcineurina (Lewis, 2001). A calcineurina é uma fosfatase de serina/treonina que tem a capacidade de desfosforilar resíduos de serina encontrados em proteínas da família NFAT (Loh *et al.*, 1996; Okamura *et al.*, 2000). Esta desfosforilação expõe uma sequência de localização nuclear (NLS, “Nuclear Localization Signal”) e esconde uma sequência de exportação nuclear (NES, “Nuclear Export Signal”), permitindo a translocação de NFAT para o núcleo, onde ocorre a transativação de genes-alvo (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003) (Figura 1). O retorno de NFAT para o citoplasma é dependente de fosforilações nos mesmos resíduos de aminoácidos, e é mediada pela proteína cinase GSK-3 (“Glycogen Synthase Kinase-3”) (Beals *et al.*, 1997). A movimentação de NFAT entre o núcleo e o citoplasma é extremamente rápida e

dinâmica, e é regulada precisamente por outras diversas proteínas cinases (PKA, JNK, CK-1, p38, Pim-1, PKC) (Beals *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Gomez del Arco *et al.*, 2000; Rainio *et al.*, 2002; San-Antonio *et al.*, 2002; Mácian, 2005). Alguns agentes farmacológicos podem mimetizar a ativação de linfócitos T em estudos *in vitro*. O ionóforo de Ca^{2+} Ionomicina (Iono) induz um aumento do nível intracelular de Ca^{2+} e portanto pode ser usado como um ativador de vias dependentes de calcineurina/NFAT. Da mesma forma, o éster de forbol PMA (“Phorbol 12-Myristate 13-Acetate”) pode ser usado como um ativador de vias dependentes de PKC. Por outro lado, a droga imunossupressora Ciclosporina A (CsA) bloqueia diretamente a fosfatase calcineurina e pode ser usada como um inibidor de proteínas NFAT (Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000) (Figura 1).

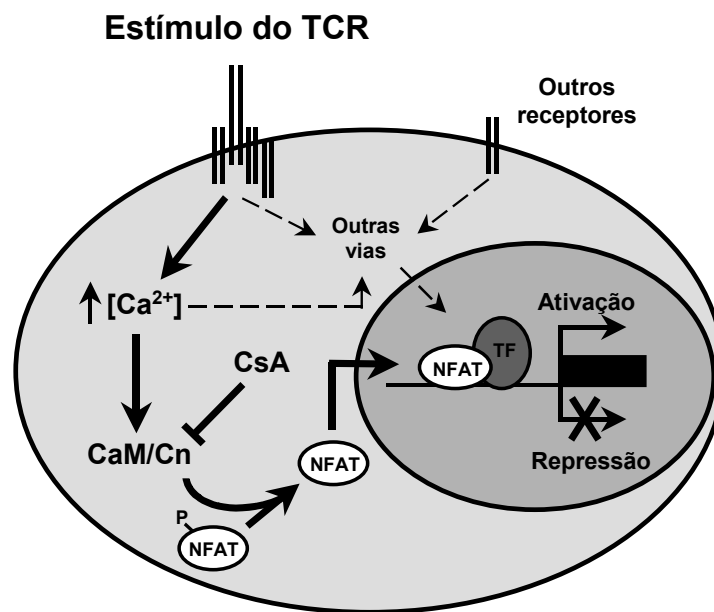


Figura 1. O estímulo do TCR induz a ativação de NFAT. Após o estímulo do TCR, algumas vias de sinalização são ativadas em linfócitos T. O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} induz a ativação da fosfatase calcineurina que é capaz de desfosforilar proteínas da família NFAT presentes do citoplasma, permitindo sua translocação nuclear. No núcleo, as proteínas NFAT regulam a expressão de diversos genes-alvo em colaboração com outros fatores de transcrição. TCR, Receptor de célula T; Ca^{2+} , Cálcio; CaM, Calmodulina; Cn, Calcineurina; NFAT, Fator nuclear de células T ativadas; CsA, Ciclosporina A; TF, Fator de transcrição.

A família dos fatores de transcrição NFAT é composta por 5 membros: NFAT1 (NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, NFATc3) e NFAT5 (TonEBP, OREBP, NFATz) (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Quatro destas proteínas (NFAT1-4) são reguladas através da via de sinalização de Ca^{2+} /calcineurina. Já a proteína NFAT5, último membro descrito, é regulada por variações de tonicidade celular induzidas por estresse osmótico. Os membros da família NFAT apresentam 2 domínios altamente conservados em sua estrutura protéica: uma região regulatória na porção N terminal da proteína com similaridade entre todos os membros da família (NHR, “NFAT-Homology Region”) e um domínio de ligação ao DNA semelhante ao encontrado em fatores de transcrição da família Rel (DBD, “DNA Binding Domain” ou RHR, “Rel-Homology Region”) (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003) (Figura 2).

A região regulatória NHR é responsável pela ativação dos membros da família NFAT e apresenta uma série de peculiaridades. Nesta região, encontra-se o sítio de ligação para a enzima calcineurina (PXIXIT, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido), a sequência de localização nuclear (NLS), a sequência de exportação nuclear (NES), e diversas regiões ricas em resíduos de serina e prolina (SRR, “Serine-Rich Region” e SP, “Serine Proline-Repeat Motif”). A dinâmica de fosforilação e desfosforilação destes resíduos de aminoácidos (principalmente dos motivos SRR-1, SP-2 e SP-3) determina o estágio de ativação da proteína NFAT, que pode ser dividida em 3 momentos distintos: desfosforilação, translocação nuclear e ligação ao DNA. O domínio de ligação ao DNA (DBD) apresenta uma sequência de 8 resíduos de aminoácidos (RAHYETEG) por onde o NFAT se liga às regiões regulatórias do DNA. Baseado na comparação de sequências e na determinação da estrutura da proteína NFAT, o sítio consenso de ligação ao DNA foi identificado em 9 pares de bases pela sequência de nucleotídeos (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N (onde N representa qualquer nucleotídeo). Qualquer membro da família NFAT tem a capacidade de se ligar a este sítio consenso que está presente em regiões promotoras e regulatórias de uma série de genes. O domínio DBD também apresenta uma região

de interação com o principal parceiro transcricional de NFAT, o fator de transcrição AP-1 (heterodímero de Fos e Jun). Esta interação confere maior estabilidade à ligação do NFAT ao DNA. Além destes 2 domínios (NHR e DBD), os fatores de transcrição NFAT ainda apresentam domínios de transativação (TAD, “Transactivation Domain”) exclusivos nas regiões N e C terminal da proteína (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Estas regiões apresentam grande divergência entre os membros da família e podem estar envolvidas na interação com outros parceiros transcripcionais. De fato, diversos fatores de transcrição são capazes de cooperar com proteínas NFAT durante a modulação da expressão gênica (AP-1, EGR, YY1, GATA-3, T-bet, p21) (Jain *et al.*, 1992; Decker *et al.*, 1998; Sweetser *et al.*, 1998; Avni *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Khanna *et al.*, 2005; Macián, 2005) (Figura 2).

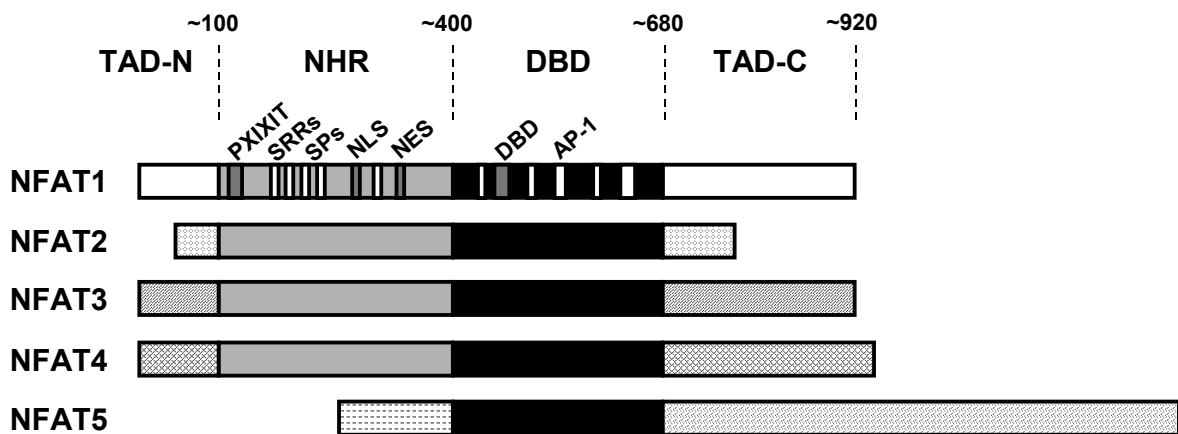


Figura 2. Esquema representativo dos membros da família NFAT. A família dos fatores de transcrição NFAT é composta por 5 membros: NFAT1-5. As proteínas NFAT1-4 são reguladas através da via de sinalização de Ca^{2+} /calcineurina. Os membros da família NFAT apresentam 2 domínios altamente conservados em sua estrutura protéica: a região regulatória NHR (“NFAT-Homology Region”) e um domínio de ligação ao DNA (DBD, “DNA Binding Domain”). Na região regulatória NHR, encontra-se o sítio de ligação para a calcineurina (PXIXIT), a sequência de localização nuclear (NLS), a sequência de exportação nuclear (NES) e diversas regiões ricas em resíduos de serina e prolina (SRR, “Serine-Rich Region” e SP, “Serine Proline-Repeat Motif”). No domínio DBD, encontra-se a sequência de ligação ao DNA e regiões de interação com o fator de transcrição AP-1 (Proteína ativadora-1). As proteínas NFAT apresentam ainda domínios de transativação (TAD) diferentes nas regiões N e C terminal da proteína. Os números indicados na figura representam os resíduos de aminoácidos da proteína NFAT1 (Adaptado de Macián, 2005).

Estima-se que toda célula apresente ao menos a expressão de um dos membros da família NFAT. Dentro do sistema imune, as proteínas da família NFAT já foram detectadas em diversos compartimentos celulares (monócitos, células NK, linfócitos, mastócitos e outros) (Rao *et al.*, 1997). Fora dele, estes fatores de transcrição também apresentam uma expressão ubíqua e já foram identificados em células endoteliais (vasos sanguíneos), células musculares lisas e esqueléticas (vasos sanguíneos e fibras musculares, respectivamente), células do sistema nervoso central (neurônios), do tecido cartilaginoso (condrócitos) e do sistema cardíaco (cardiomiócitos) (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). Dentre os membros da família NFAT sensíveis à via de sinalização por Ca^{2+} /calcineurina, somente as proteínas NFAT1, 2 e 4 são expressas em linfócitos (Rao *et al.*, 1997). Durante o processo de diferenciação linfocitária, a proteína NFAT4 está envolvida principalmente com a maturação e seleção de linfócitos T no timo (Ho *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; Oukka *et al.*, 1998). Contudo, nos órgãos linfóides periféricos, ocorre uma diminuição da expressão de NFAT4 e um aumento das proteínas NFAT1 e NFAT2 (Lyakh *et al.*, 1997; Amasaki *et al.*, 1998; Oukka *et al.*, 1998). Em linfócitos T não ativados, a proteína NFAT1 é expressa constitutivamente e se encontra no citoplasma na sua forma fosforilada (inativa). Esta proteína representa o membro majoritário da família NFAT, sendo responsável por quase 90% do conteúdo total de NFAT em linfócitos T (Lyakh *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000; Macián, 2005). Já a proteína NFAT2 é regulada durante a transcrição e pode ser induzida tanto pela proteína NFAT1 quanto pela própria proteína NFAT2 através de um alça regulatória positiva (Chuvpilo *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Desta forma, fica evidente que a proteína NFAT1 exerce um papel único na ativação de linfócitos T periféricos.

Apesar da semelhança estrutural que confere certa redundância aos membros da família, as proteínas NFAT são funcionalmente distintas. A análise de animais geneticamente deficientes para cada um dos membros desta família facilita o entendimento de suas funções. Animais deficientes para o fator de transcrição NFAT1 (NFAT1^{-/-}) se desenvolvem normalmente, mas apresentam um aumento da resposta imune, acompanhado por esplenomegalia e linfomegalia

(Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996). Quando estimuladas *in vitro*, células de baço e linfonodo destes animais não só exibem uma resposta aumentada do tipo Th2 (altos níveis de expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e baixos níveis de interferon-gama - IFN- γ), como também hiperproliferam quando comparadas com células de animais normais (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Por outro lado, animais deficientes para NFAT2, além de serem letais durante a embriogênese, apresentam uma deficiência na resposta do tipo Th2 (baixos níveis de IL-4) e uma redução da capacidade proliferativa quando comparados com animais normais (Ranger *et al.*, 1998a; Yoshida *et al.*, 1998). Diversos outros trabalhos também demonstram a especificidade destes e de outros membros da família NFAT durante a geração da resposta imune (Rao *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2003; Macián, 2005).

1.4. A diferenciação celular

A diferenciação de linfócitos Th1/Th2

O estímulo antigênico induz a diferenciação de linfócitos T nos órgãos linfóides secundários. Os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar em pelo menos dois tipos de células efetoras, denominadas Th1 ou Th2 (Seder e Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996). O mesmo ocorre com linfócitos T CD8⁺ que também podem apresentar esta dicotomia após ativação (Tc1 ou Tc2) (Mosmann *et al.*, 1997). Esta dicotomia encontrada tanto em células T CD4⁺ como em células T CD8⁺ é caracterizada pelo padrão distinto de citocinas produzidas, assim como pelos efeitos causados na geração da resposta imune. Além de ter sido descrito inicialmente em linfócitos T CD4⁺, o fenômeno de diferenciação de linfócitos T é mais bem ilustrado pelo modelo Th1/Th2 (Seder e Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996; Murphy e Reiner, 2002; Ansel *et al.*, 2003).

Os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em células Th que produzem padrões de citocinas mutuamente exclusivos. Os linfócitos Th1 produzem preferencialmente IFN- γ e TNF- β e são peças fundamentais da imunidade celular contra patógenos intracelulares, enquanto que os linfócitos Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, e IL-13 e estão relacionados com a imunidade

humoral, já que contribuem para a diferenciação de células B (Seder e Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996). Diversos fatores influenciam a diferenciação de linfócitos Th durante o estímulo antigênico. Entre eles estão o tipo da APC, a natureza e a concentração do antígeno apresentado, a presença de moléculas co-estimulatórias na superfície da APC, mas principalmente o microambiente de citocinas em que os linfócitos T se encontram durante a ativação (Seder e Paul, 1994; Constant e Bottomly, 1997). Vários estudos demonstraram que as citocinas IFN- γ e IL-12 facilitam a diferenciação de linfócitos T para o fenótipo Th1, enquanto que a IL-4 induz a diferenciação para o caminho Th2 (Seder e Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996). O balanço da resposta imune Th1/Th2 é extremamente importante, uma vez que pode determinar desde a geração de uma resposta imune eficiente contra uma infecção, até a patogênese de síndromes imunológicas. A produção descontrolada de citocinas do tipo Th1 está relacionada com doenças auto-imunes e reações do tipo DTH (“Delayed-Type Hypersensitivity”), ao passo que uma desregulação da produção de citocinas do tipo Th2 é a base do aparecimento de doenças alérgicas (Seder e Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996).

Vários fatores de transcrição são capazes de controlar a expressão dos genes relacionados com a diferenciação Th1/Th2, como as proteínas NFAT, T-bet, GATA-3 e STATs (“Signal Transducer and Activator of Transcription”) (Murphy *et al.*, 2000; Murphy e Reiner, 2002; Ansel *et al.*, 2003) (Figura 3). As proteínas T-bet e GATA-3 foram recentemente caracterizadas como reguladoras seletivas e exclusivas dos fenótipos Th1 e Th2, respectivamente (Zheng e Flavell, 1997; Szabo *et al.*, 2000). A expressão de um destes fatores em linfócitos T CD4⁺ indiferenciados é suficiente para induzir a aquisição do fenótipo Th a ele associado e inibir o desenvolvimento do fenótipo contrário (Zheng e Flavell, 1997; Szabo *et al.*, 2000). Os fatores de transcrição STAT1, STAT4 e STAT6 também são marcadores característicos dos fenótipos Th, uma vez que animais deficientes para estas proteínas são incapazes de gerar células Th1 (STAT1 e STAT4) ou Th2 (STAT6) (Durbin *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1996a; Kaplan *et al.*, 1996b; Meraz *et al.*, 1996; Thierfelder *et al.*, 1996). Contudo, estes fatores de transcrição são ativados

por alças regulatórias positivas disparadas pelas próprias citocinas que eles produzem, como é o caso do IFN- γ (STAT1 e T-bet), da IL-12 (STAT4) e da IL-4 (STAT6 e GATA-3) (Murphy e Reiner, 2002; Ansel *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2003). Assim, a ativação destes fatores é dependente do microambiente de citocinas em que o linfócito T se encontra, mas não do estímulo inicial que as células recebem através do disparo do TCR (primeiro sinal), como é o caso das proteínas da família NFAT.

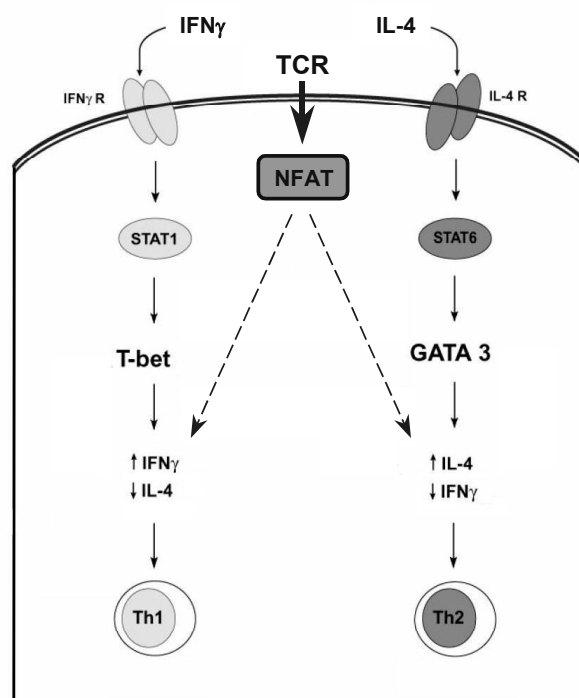


Figura 3. Os mecanismos moleculares da diferenciação Th1/Th2 em linfócitos T CD4⁺. O microambiente de citocinas em que os linfócitos T CD4⁺ se encontram no momento do estímulo antigênico é fundamental para a diferenciação Th1/Th2. O IFN- γ ativa sequencialmente os fatores de transcrição STAT1 e T-bet, consolidando o fenótipo Th1 (alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4). Por sua vez, a IL-4 ativa os fatores de transcrição STAT6 e GATA-3, consolidando o fenótipo Th2 (alta produção de IL-4 e baixa produção de IFN- γ). Contudo, o estímulo do TCR ativa outros fatores de transcrição importantes para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺, como é o caso do NFAT. APC, Célula apresentadora de antígeno; TCR, Receptor de célula T; STAT, Ativador de transcrição e transdutor de sinal. (Adaptado de Szabo *et al.*, 2003).

O NFAT e a diferenciação linfocitária

O disparo do TCR inicia a ativação de linfócitos T. Em questão de segundos, as proteínas NFAT pré-existentes no citoplasma são ativadas e, em poucos minutos, podem regular a transcrição de diversos genes no núcleo. Os primeiros alvos regulados por proteínas da família NFAT foram caracterizados em células T como genes de diferenciação linfocitária. Sítios de ligação para as proteínas NFAT foram identificados nos promotores das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF e das moléculas de superfície CD40L, CTLA-4 e FasL (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Por este motivo, as proteínas NFAT são consideradas reguladoras centrais da diferenciação de linfócitos T.

As proteínas NFAT são encontradas tanto em linfócitos Th1 como em linfócitos Th2, e são capazes de se ligar ao promotor e regular a transcrição de citocinas características dos dois fenótipos (Rao *et al.*, 1997; Macián, 2005). Os mecanismos moleculares que ativam diferencialmente os membros desta família durante a diferenciação Th1/Th2 ainda não são totalmente compreendidos. A falta de NFAT1 em linfócitos T CD4⁺ compromete a produção de IFN- γ e a diferenciação Th1, ao mesmo tempo em que aumenta a produção de citocinas do tipo Th2 (Kiani *et al.*, 1997 e 2001; Viola *et al.*, 1998). A perda de NFAT4, associada à falta de NFAT1, potencializa a produção de IL-4, IL-5 e IgE e também a resposta do tipo Th2 (Ranger *et al.*, 1998b; Rengarajan *et al.*, 2002). Por outro lado, a falta de NFAT2 compromete a produção de IL-4 e IgE e o desenvolvimento do fenótipo Th2 (Ranger *et al.*, 1998a; Yoshida *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT4 são reguladores positivos do fenótipo Th1 e/ou negativos do fenótipo Th2 e que a proteína NFAT2 apresenta um papel contrário (Macián, 2005).

Em linfócitos T CD8⁺, os mecanismos de diferenciação celular são pouco conhecidos. Assim como em linfócitos T CD4⁺, a diferenciação de células T CD8⁺ também é determinada pelo padrão de citocinas produzidas, onde a geração do fenótipo Tc1 é predominante ao Tc2 e caracterizada pelos altos níveis de IFN- γ e TNF- α (Mosmann *et al.*, 1997). Além disso, os

linfócitos T CD8⁺ são excelentes produtores de mediadores citolíticos, como perforinas e granzimas, que conferem capacidade citotóxica a estas células em combinação com as citocinas do tipo Tc1 (Shresta *et al.*, 1998). Os linfócitos T CD8⁺ apresentam ainda outras peculiaridades em relação aos linfócitos T CD4⁺ no que diz respeito ao potencial proliferativo, a aquisição da função efetora e a geração de células de memória (Seder e Ahmed, 2003). Os fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação de linfócitos T CD8⁺ são diferentes dos descritos em células T CD4⁺ (Glimcher *et al.*, 2004). O fator de transcrição T-bet, controlador central do fenótipo Th1 em linfócitos T CD4⁺, não influencia a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ (Szabo *et al.*, 2002). Em compensação, a produção de IFN- γ , perforinas e granzimas em linfócitos T CD8⁺ está sob a regulação da proteína Eomesodermina (Eomes), um fator de transcrição da mesma família de T-bet (Pearce *et al.*, 2003). Proteínas da família NFAT já foram identificadas durante a maturação de linfócitos T no timo (Amasaki *et al.*, 1998; Oukka *et al.*, 1998). Contudo, pouco se sabe sobre o papel destes fatores de transcrição durante a ativação de linfócitos T CD8⁺ maduros. Após o estímulo primário, estas células são fundamentais para o controle de infecções causadas por parasitas intracelulares, para a resolução de doenças alérgicas e para a formação de respostas anti-tumorais (Kemeny, 1998; Harty *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2002).

O IFN- γ e a resposta alérgica

O IFN- γ é uma citocina fundamental tanto para a geração da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa (Boehm *et al.*, 1997). A produção de IFN- γ pode ser detectada em diversos tipos celulares do sistema imune, como células APC, células NK, linfócitos T CD4⁺ (Th1), T CD8⁺, e até mesmo linfócitos B (Boehm *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2003). A expressão desta citocina é regulada por uma série de fatores de transcrição, incluindo NFAT, NF κ B, STAT, T-bet e Eomesodermina, mas os mecanismos moleculares de regulação gênica variam entre os

compartimentos celulares analisados (Murphy *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2003). Uma vez produzido e secretado, o IFN- γ se liga ao seu receptor e ativa o fator de transcrição STAT1 que regula a expressão de diversos genes-alvo (Bach *et al.*, 1997). De maneira geral, o IFN- γ participa de uma série de efeitos biológicos fundamentais ao sistema imune, mas se destaca principalmente como um indutor da diferenciação Th1 e da imunidade celular (Boehm *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2003).

O IFN- γ aumenta a capacidade fagocítica e induz a produção de IL-12 em células APC (Hayes *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2003). Além disso, esta citocina é capaz de induzir e manter a expressão da cadeia β do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) em células T CD4⁺, tornando-as permissivas ao efeito da IL-12 produzida por células APC (Mullen *et al.*, 2001; Afkarian *et al.*, 2002). Esta alça regulatória é dependente de IFN- γ e essencial para o comprometimento de linfócitos T CD4⁺ com o fenótipo Th1 (Seder *et al.*, 1993; Wenner *et al.*, 1996). O IFN- γ também pode atuar diretamente em linfócitos T CD4⁺ (Bradley *et al.*, 1996; Das *et al.*, 2001). O sinal disparado pela ligação desta citocina leva a ativação de T-bet, o regulador central do fenótipo Th1 (Lighvani *et al.*, 2001; Afkarian *et al.*, 2002). Por sua vez, T-bet não só induz a produção de IFN- γ , mas também inibe a produção de citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-5 (Szabo *et al.*, 2000). Portanto, o IFN- γ funciona como um indutor da polarização Th1 e um repressor da polarização Th2, controlando o balanço de respostas Th1/Th2. De fato, diversos modelos comprovam a importância do IFN- γ durante a resposta imune *in vivo*. Um defeito na via de sinalização do IFN- γ compromete a ativação da resposta Th1 e aumenta a suscetibilidade de camundongos a infecções por patógenos intracelulares, como *Mycobacterium*, *Listeria* e *Leishmania* (Dalton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993; Meraz *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2002). Em humanos, mutações na via do IFN- γ levam a imunodeficiências severas e a suscetibilidade a infecções por micobactérias (Newport *et al.*, 1996; Jouanguy *et al.*, 1999). Além disso, o IFN- γ e as respostas imunes do tipo Th1 também são protetoras contra doenças imunológicas de base

Th2, como reações alérgicas e asma (Iwamoto *et al.*, 1993; Cohn *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 1999). Em humanos, uma deficiência na produção de IFN- γ predispõe ao desenvolvimento de quadros alérgicos (Leonard *et al.*, 1997) e pacientes com asma severa apresentam uma redução significativa da produção de IFN- γ quando comparados com indivíduos saudáveis (Renzi *et al.*, 1999).

Doenças alérgicas do trato respiratório são caracterizadas pela hiper-responsividade e obstrução reversível das vias aéreas, além de inflamação local seguida de alta produção de muco (Wills-Karp, 1999). Estas doenças apresentam bases genéticas e ambientais e são extremamente frequentes, já que afetam aproximadamente 5% da população ocidental. A evolução do quadro alérgico está relacionada com uma diferenciação do tipo Th2 (Renault, 2001). A alta produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) leva ao recrutamento e a ativação de células efetoras da resposta alérgica, como mastócitos, basófilos e eosinófilos (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001). A citocina IL-4 é fundamental para a diferenciação de linfócitos Th2 e mastócitos, além de induzir a troca de classe de imunoglobulinas produzidas por linfócitos B para IgE. Por outro lado, a IL-5 regula o desenvolvimento e a ativação de eosinófilos. Ambas citocinas (IL-4 e IL-5) regulam a adesão, o rolamento e a infiltração de eosinófilos para o local da inflamação através da indução de moléculas de adesão. A IL-9 também regula a proliferação e a diferenciação de mastócitos e eosinófilos, ao passo que a IL-13 está associada com a alta secreção de muco por células epiteliais e glândulas da mucosa (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001). Além das citocinas Th2, a inflamação alérgica está relacionada com os altos níveis séricos de IgE, que induzem a liberação de mediadores inflamatórios (como histamina, prostaglandinas e leucotrienos) e fatores quimiotáticos (como eotaxina, MCP-1 e RANTES). Na mucosa, estes mediadores induzem mudanças rápidas de permeabilidade vascular, causam edema, produção excessiva de muco e contração da musculatura lisa, permitindo a migração de diversas células efetoras para o local da inflamação (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001).

A indução de respostas do tipo Th1 tem efeito protetor contra doenças alérgicas de base Th2, como a asma e a alergia. Tanto linfócitos T CD4⁺ Th1 quanto as citocinas IFN- γ e IL-12 podem modular as respostas Th e suprimir os efeitos causados por respostas alérgicas (Iwamoto *et al.*, 1993; Cohn *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 1999). De fato, a transferência de linfócitos Th1 ou linfócitos T CD8⁺ (ambos excelentes produtores de IFN- γ) é capaz de reprimir o infiltrado de eosinófilos e a secreção de muco para as vias respiratórias em modelos de inflamação alérgica murina (Cohn *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999 e 2002). De forma semelhante, animais deficientes para o fator de transcrição T-bet apresentam níveis reduzidos de IFN- γ e desenvolvem alergia de maneira espontânea (Finotto *et al.*, 2002). Em humanos, pacientes asmáticos que apresentam uma redução na expressão de T-bet em células pulmonares, também apresentam uma diminuição da produção de IFN- γ em linfócitos periféricos quando comparados com indivíduos saudáveis (Nurse *et al.*, 1997; Finotto *et al.*, 2002). Assim, a indução de respostas Th1 através da transferência de células produtoras de IFN- γ pode proteger contra doenças alérgicas de base Th2.

1.5. A proliferação celular

O ciclo celular

Como descrito anteriormente, a ativação celular é capaz de induzir tanto a diferenciação quanto a proliferação. Alguns trabalhos sugerem a existência de uma relação de interdependência entre estes dois fenômenos. Independentemente, a proliferação é um mecanismo de multiplicação celular e perpetuação da informação contida no interior da célula. O ciclo celular é caracterizado por um conjunto de tarefas que são executadas de maneira sequencial e unidirecional para que uma célula origine duas outras geneticamente idênticas a ela. Duas destas tarefas são claramente definidas durante a proliferação: o relaxamento do material genético para a duplicação do DNA, conhecida como fase S (Síntese), e a condensação da cromatina seguida de divisão celular, conhecida como fase M (Mitose). Estas duas fases são separadas entre si por dois intervalos chamados G₁ e G₂ (“Gap”), onde ocorrem atividades metabólicas intensas de

preparação para as fases S e M, respectivamente. Todas estas etapas e suas transições são reguladas precisamente e estão sujeitas a diversos pontos de controle ao longo do ciclo celular. O descontrole de qualquer uma destas etapas pode levar ao surgimento do câncer (Sherr, 1996; Nurse, 2000; Evan e Vousden, 2001).

A proliferação celular é regulada por complexos protéicos que impulsionam as células ao longo das fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular (Figura 4). As principais proteínas envolvidas neste processo são as cinases dependentes de ciclinas (CDK, “Cyclin Dependent Kinase”) e suas ativadoras, as próprias ciclinas (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). A associação específica entre ciclinas e CDKs determina a progressão unidirecional pelas fases do ciclo. Quando ativados, os complexos ciclina/CDK fosforilam uma série de substratos e permitem a duplicação do DNA (fase S) e a segregação dos cromossomos (mitose). A formação dos complexos ciclina/CDK pode ser regulada em diversos níveis. As ciclinas são induzidas por transcrição gênica e a sua disponibilidade determina a formação dos complexos e a atividade das CDKs (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). Segundo, os complexos ciclina/CDK podem ser inativados por proteínas inibidoras de CDK, chamadas CDKI (“CDK Inhibitor”). Estas proteínas se ligam e inativam as CDKs e são classificadas em duas famílias: a família das proteínas INK4 que inibe especificamente as cinases CDK4 e CDK6 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}), e a família das proteínas CIP/KIP que inibe a atividade das CDKs associadas às ciclinas D, E e A (p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}) (Sherr e Roberts, 1999 e 2004). Por último, os complexos ciclina-CDK também podem ser alvos de degradação por ubiquitinação, permitindo uma reposição constante de novos complexos específicos (Morgan, 1995; Pavletich, 1999; Sherr e Roberts, 1999 e 2004).

A entrada no ciclo celular é dependente de estímulos mitogênicos extracelulares que induzem a célula a sair do estágio de quiescência G₀ (Sherr, 1996). Durante a fase G₁, fatores de crescimento estimulam a formação do complexo ciclina D-CDK4/6 que fosforila a proteína Rb (“Retinoblastoma”), liberando o fator de transcrição E2F (“E2 Promoter Binding Factor”) (Bates

et al., 1994; Matsushime *et al.*, 1994; Meyerson e Harlow, 1994; Ekholm e Reed, 2000; Massagué, 2004). A ativação de E2F induz a transcrição de uma série de genes relacionados com a duplicação do DNA (Dyson, 1998; Harbour e Dean, 2000). No final de G₁, o complexo protéico ciclina E-CDK2 facilita a transição G₁/S através da fosforilação adicional de alguns sítios na proteína Rb (Lundberg e Weinberg, 1998; Harbour *et al.*, 1999). Neste momento, a célula passa por um ponto de controle R (“Restriction”), onde se avalia a maquinaria protéica necessária para a duplicação do DNA. Por este motivo, a proteína Rb é considerada o guardião do ciclo celular, já que determina a entrada da célula em fase S (Dyson, 1998; Harbour e Dean, 2000). Em seguida, a ciclina A pode se associar com CDK2 ou CDK1 e regular tanto a passagem pela fase S quanto a transição G₂/M, respectivamente (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992). Durante a fase S, a ciclina A mantém a proteína E2F livre do inibidor Rb, impedindo o regresso a G₁ (Xu *et al.*, 1994). Durante a fase G₂, o complexo ciclina B-CDK1 fosforila proteínas que regulam diferentes eventos da mitose, como a ruptura da membrana nuclear, a condensação dos cromossomos e a formação do fuso mitótico (Takizawa e Morgan, 2000; Smits e Medema, 2001). Recentemente, a saída do estágio de quiescência G₀ se mostrou dependente da fosforilação de Rb pelo complexo ciclina C-CDK3 (Ren e Rollins, 2004) (Figura 4).

O ciclo celular é um processo dinâmico e simultâneo a outros fenômenos biológicos, como os mecanismos de reparo de DNA e de morte celular programada (apoptose) (Zhou e Elledge, 2000; Lowe *et al.*, 2004). Com o passar do ciclo, algumas células sofrem naturalmente alterações genéticas. Além disso, eventos mutagênicos também podem induzir erros na molécula de DNA. Os diversos pontos de controle do ciclo celular avaliam constantemente a integridade da informação genética (Kastan e Bartek, 2004). Uma vez detectada, uma mutação deve ser eficientemente corrigida pela maquinaria de reparo de DNA (Hoeijmakers, 2001). Caso isto não ocorra, a célula ainda pode abandonar o ciclo através da ativação de mecanismos próprios de apoptose. Se os mecanismos de reparo e apoptose falharem, a célula alterada pode sofrer uma

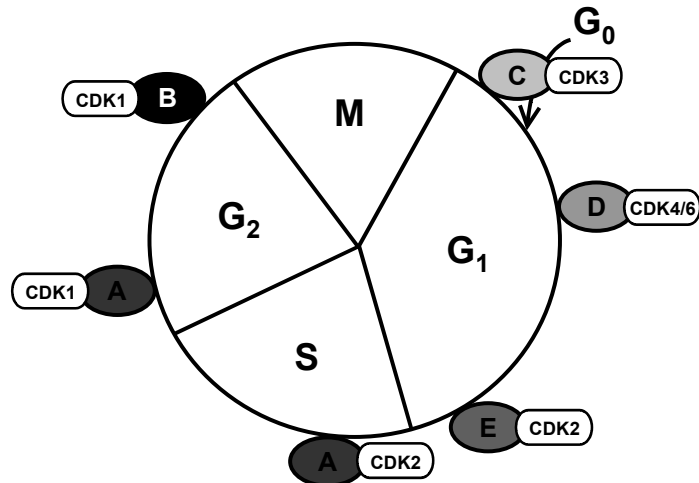


Figura 4. As fases do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em quatro etapas: fases G₁, S, G₂ e M. As etapas de duplicação do DNA (fase S, síntese) e divisão celular (fase M, mitose) são alternadas pelas fases G₁ e G₂ (“Gap”). A associação específica entre ciclinas (círculos preenchidos) e CDKs determina a transição sequencial e unidirecional entre as fases do ciclo celular. A saída do estágio de quiescência G₀ depende de estímulos mitogênicos extracelulares.

desregulação generalizada e eventualmente originar um tumor (Hanahan e Weinberg, 2000; Evan e Vousden, 2001). De fato, várias proteínas relacionadas com o ciclo celular já foram caracterizadas como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor e estão associadas a diversos tipos de câncer (Vogelstein e Kinzler, 2004). Dentre os proto-oncogenes, as ciclinas A e D e a cinase CDK4 estão expressas em altos níveis em carcinoma hepatocelular (ciclina A), câncer de mama, ovário e próstata (ciclina D) e melanoma (CDK4). Já as proteínas Rb e p16^{INK4a} são consideradas supressoras de tumor e estão reprimidas ou inativadas em diferentes tipos de câncer como retinoblastoma e sarcoma (Rb), melanoma e linfoma (p16^{INK4a}) (Hall e Peters, 1996; Vogelstein e Kinzler, 2004; Sherr, 2004).

O NFAT e a proliferação celular

Além de serem reguladores da diferenciação celular, as proteínas NFAT também exercem um papel importante durante a proliferação celular. O aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e a consequente indução da calcineurina estimulam a transcrição de genes relacionados com a

progressão do ciclo (Lipskaia e Lompré, 2004). De fato, proteínas NFAT regulam diretamente a expressão de genes de ciclo celular como CDK e CDKI, mas não existem evidências até o momento de sua influência na regulação de genes de ciclinas (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002). Além disso, a administração de Ciclosporina A interfere na expressão de alguns destes genes (Tomono *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001). Portanto, as proteínas da família NFAT controlam a proliferação através da indução ou repressão de genes de ciclo celular.

Conforme observado na diferenciação de linfócitos T, os membros da família NFAT também exercem funções opostas durante a regulação do ciclo celular. A proteína NFAT1 parece funcionar como um repressor de proliferação já que inibe diretamente a expressão da cinase CDK4 em linfócitos T e induz a expressão do inibidor p21^{WAF1/CIP1} em queratinócitos, determinando o momento de entrada em ciclo (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002). Animais deficientes para a proteína NFAT1 apresentam uma hiperproliferação linfocitária quando estimulados *in vitro*, além de esplenomegalia e linfomegalia *in vivo* (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996). A ausência de NFAT1 também dispara o crescimento e a diferenciação desordenada de células do tecido cartilaginoso (Ranger *et al.*, 2000). Por outro lado, a proteína NFAT2 funciona como um ativador do ciclo celular. A expressão desta proteína induz a proliferação de adipócitos, além da expressão das ciclinas D1 e D2 e do proto-oncogene c-Myc (Neal e Clipstone, 2003). Animais deficientes para NFAT2 apresentam um comprometimento da proliferação de linfócitos T e B, da repopulação do timo e de órgãos linfóides periféricos (Ranger *et al.*, 1998a; Yoshida *et al.*, 1998). A ausência desta proteína também compromete a proliferação de células musculares e endoteliais, e conseqüentemente a formação de válvulas cardíacas e vasos sanguíneos (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). Portanto, parece que enquanto a proteína NFAT1 exerce um papel supressor durante a progressão do ciclo, a proteína NFAT2 funciona como um indutor oncogênico da proliferação celular.

As proteínas da família NFAT também podem regular outros fenômenos biológicos relacionados com a tumorigênese além do ciclo celular. Os mecanismos de apoptose são essenciais para a progressão celular normal. Falhas na sua execução podem levar ao descontrole da proliferação (Lowe *et al.*, 2004). De fato, o NFAT é capaz de se ligar e induzir a expressão de moléculas pró-apoptóticas como o TNF- α , EGR e FasL (McCaffrey *et al.*, 1994; Latinis *et al.*, 1997; Rengarajan *et al.*, 2000; Chuvpilo *et al.*, 2002). Por outro lado, o NFAT pode resgatar células da apoptose através da indução de genes anti-apoptóticos, como o *bcl-2* (Oukka *et al.*, 1998). Apesar de controversos, estes dados indicam que proteínas da família NFAT participam do controle da apoptose, impedindo eventualmente o surgimento de tumores.

A formação de novos vasos sanguíneos também é essencial para o desenvolvimento de tumores já que alimenta a massa tumoral de oxigênio e nutrientes (Hanahan e Folkman, 1996). Alguns trabalhos demonstram que a proteína NFAT induz a expressão de COX-2 (“Cyclooxygenase-2”) quando ativada pela molécula de VEGF (“Vascular Endothelial Growth Factor”), regulando precisamente o processo de angiogênese (Iniguez *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2001; Duque *et al.*, 2005). Outra característica do processo de tumorigênese é capacidade de invasão tecidual e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000). Estudos recentes sugerem que tanto a invasividade quanto o potencial metastático de células tumorais estão sob a influência de membros da família NFAT (Jauliac *et al.*, 2002; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005). A ligação de receptores de integrina na membrana plasmática leva a ativação das proteínas NFAT1 e NFAT5 que regulam a invasividade de linhagens de câncer de cólon e mama (Jauliac *et al.*, 2002).

O fator de transcrição NFAT1 é o membro majoritário da família NFAT, representando quase a totalidade das proteínas NFAT encontradas em linfócitos T. Este fator participa ativamente de diversos eventos celulares vitais, como a proliferação e a diferenciação celular. Portanto, o estudo dos mecanismos moleculares utilizados pelo fator de transcrição NFAT1 é fundamental para a compreensão destes fenômenos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Considerando que os fatores de transcrição da família NFAT participam de diferentes fenômenos celulares, o objetivo geral deste trabalho é investigar o envolvimento do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação e na proliferação de linfócitos T.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a participação do NFAT1 durante a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺.
- Analisar a influência deste IFN- γ na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1.
- Analisar a influência do IFN- γ no controle da inflamação alérgica *in vivo*.

- Avaliar a participação do NFAT1 como um repressor da proliferação linfocitária.
- Avaliar a capacidade de ligação do NFAT1 em regiões regulatórias de genes de ciclinas.
- Avaliar a participação do NFAT1 como um repressor da expressão de ciclina A2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Em todos os experimentos, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) entre 8 e 12 semanas de idade, mantidos e criados no biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Rio de Janeiro. A linhagem de camundongos isogênicos C57Bl/6 e diferentes animais geneticamente deficientes (NFAT1^{-/-}, Dra. Anjana Rao, Harvard University; IFN- γ ^{-/-}, Dra. Leda Vieira, UFMG; CD8 α ^{-/-}, Dra. Vera Calich, USP) e seus respectivos controles selvagens foram gentilmente cedidos e utilizados conforme indicado em cada experimento. Os animais foram criados, tratados e manipulados conforme as normas estabelecidas pelo “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH, “National Institutes of Health”).

3.2. Linhagens celulares e células primárias

As linhagens celulares e as culturas primárias de linfócitos foram mantidas em meio DMEM (D-3656, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (1.0 mM), Piruvato de Sódio (1.0 mM), solução de vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1x, L-glutamina (2.0 mM), β -mercaptoetanol (55 μ M), HEPES (10 mM), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U) (todos da Invitrogen). As células foram cultivadas em placas ou garrafas de cultura (TPP, Techno Plastic Products) conforme a necessidade e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em estufa durante os tempos indicados. As linhagens celulares CTLL R8⁺ (linfócito T citotóxico murino; Dr. Pedro Persechini, UFRJ) e Jurkat (linfoblasto humano; Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ #CR063) e os hibridomas 2C11 (anti-CD3; Dr. Geraldo Pereira, Fiocruz), 53.6-7 (anti-CD8; Dr. Geraldo Pereira, Fiocruz) e 11B11 (anti-IL-4; Dr. Ricardo dos Santos, Fiocruz) foram utilizados conforme indicado em cada experimento.

3.3. Reagentes

As citocinas murinas IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- γ foram obtidas da PeproTech. A citocina IL-18 foi cedida pelo Dr. Fernando Cunha (USP). O anticorpo anti-CD28 (37.51) foi obtido da BD Biosciences. Os anticorpos policlonais anti-67.1 e anti-T2B1 para as regiões N e C terminal da proteína NFAT1, respectivamente, foram cedidos pela Dra. Anjana Rao (Harvard University). O anticorpo anti-IgG de camundongo foi obtido da MP Biomedicals. Antes do estímulo com anti-CD3, as placas de cultura foram sempre pré-tratadas com anti-IgG (0.3 mg/mL) por 2 horas a 37°C para a captura do anti-CD3. O éster de forbol PMA (“Phorbol 12-Myristate 13-Acetate”) e o ionóforo de Ca²⁺ Ionomicina (Iono) foram obtidos da Calbiochem. A droga imunossupressora Ciclosporina A (CsA) foi obtida da LC Laboratories. O adjuvante completo de Freund (CFA) e a ovalbumina (OVA) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes usados foram obtidos de fabricantes de renome internacional e possuem grau analítico.

3.4. Purificação de anticorpos

Os hibridomas (2C11, 53.6-7 e 11B11) foram cultivados por 2 semanas e suplementados com 2 volumes de meio de cultura a cada 2 dias. Os sobrenadantes foram recuperados, centrifugados e estocados a 4°C livres de células. Os anticorpos anti-CD3 (2C11), anti-CD8 (53.6-7) e anti-IL-4 (11B11) foram purificados a partir do sobrenadante das culturas dos respectivos hibridomas em colunas de sefarose com afinidade por imunoglobulina do tipo IgG, segundo as especificações do fabricante (GammaBind G SepharoseTM, Amersham Biosciences). Os sobrenadantes foram circulados pela coluna de sefarose com vazão constante em sistema fechado durante 16 horas a 4°C. Em seguida, a coluna foi lavada sequencialmente com 15 mL de PBS 1x, 15 mL de NaHCO₃ 0.1 M e 15 mL de NaHCO₃ 0.1 M e NaCl 0.5 M. Os anticorpos foram eluídos da coluna com 15 mL de Glicina 0.1 M pH 2.4 e neutralizados com Tris 4 M. As amostras foram esterilizadas em filtros de 0.22 μ m de espessura (Millex[®], Millipore) e imediatamente estocados a -20°C. Em seguida, os anticorpos foram quantificados através de um

kit de dosagem de proteína, segundo as especificações do fabricante (DC Protein Assay, Bio-Rad). Finalmente, a atividade dos anticorpos foi testada em ensaios funcionais de proliferação celular (anti-CD3), deleção celular dependente de sistema complemento (anti-CD3 e anti-CD8), ELISA e diferenciação de linfócitos Th1 (anti-IL-4).

3.5. Purificação de linfócitos

Os linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados de diferentes linhagens de camundongos não imunizados conforme indicado em cada experimento. Os linfonodos foram dissociados em uma suspensão celular e as diferentes populações de linfócitos T ($CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) foram purificadas por seleção negativa através de contas magnéticas conforme as instruções do fabricante (MACS technology, Miltenyi Biotec). As células foram marcadas com anticorpos biotinizados que foram detectados através de contas magnéticas marcadas com estrepto-avidina (Micro Beads, Miltenyi Biotec). Os seguintes anticorpos biotinizados foram usados conforme a necessidade de deleção: anti-B220/CD45R (RA3-6B2), anti-CD4 (GK1.5) e anti-CD8 (53.6-7) (BD Pharmingen). Em seguida, as células de interesse foram eluídas enquanto as células marcadas ficaram retidas na coluna magnética. As células de interesse foram marcadas com anticorpos contra moléculas de superfície por 15 minutos a 4°C e protegidas da luz. O grau de pureza das células isoladas foi avaliado por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson) através dos seguintes anticorpos: anti-B220/CD45R-FITC (RA3-6B2) e anti-CD3-PE (2C11); anti-CD8-FITC (53.6-7) e anti-CD4-PE (GK1.5) (BD Pharmingen). Todos os experimentos de purificação de linfócitos foram realizados a partir de uma suspensão celular normalizada entre um conjunto de 3 animais.

3.6. ELISA

As células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* conforme indicado em cada experimento: anti-CD3 (1.0 µg/mL), anti-CD28 (5.0 µg/mL), PMA (10 nM),

Ionomicina (Iono; 1.0 μ M), OVA (0.5 mg/mL), IL-12 (10 ng/mL), IL-18 (50 ng/mL). A adição de CsA (1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Nos momentos indicados, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos, centrifugados e estocados livres de células a -20°C. Os sobrenadantes foram testados para a presença de IFN- γ ou IL-4 por ELISA conforme as especificações do fabricante (BD OptEIA, BD Pharmingen). As reações de ELISA foram analisadas em espectrômetro a 450 nm (Spectra Max 190, Molecular Devices).

3.7. Marcação de citocina intracelular

As células indicadas foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 μ g/mL) durante os tempos determinados em cada experimento. Brefeldina A (10 μ g/mL; Cytotfix/Cytoperm KitTM, BD Pharmingen) foi adicionada à cultura 5 horas antes do procedimento de marcação. As células foram então recolhidas e marcadas para as moléculas de superfície com anticorpos anti-CD4-FITC (1:50; GK1.5) ou anti-CD8-FITC (1:50; 53.6-7) em tampão de marcação (PBS 1x; SFB 1%; Azida Sódica 0.09% a pH 7.4) por 15 minutos a 4°C e protegidas da luz. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas (tampão de marcação; saponina 0.5%) por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram marcadas para a citocina intracelular com o anticorpo anti-IFN- γ -PE (1:10; XMG1.2) em tampão de marcação por 30 minutos a temperatura ambiente. A frequência relativa de células produtoras de IFN- γ foi avaliada por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson).

3.8. Ensaio de proteção a RNase (RPA)

As células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* conforme indicado em cada experimento: anti-CD3 (1.0 μ g/mL), OVA (0.5 mg/mL), CsA (1.0 μ M). A adição de CsA ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Nos momentos

determinados, as células foram recolhidas, centrifugadas e o RNA total foi extraído imediatamente do precipitado celular com o reagente TRIzol[®] conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen). Os níveis de expressão de RNA mensageiro para IFN- γ ou ciclinas foram avaliados através do ensaio de proteção a RNase (BD RiboQuant[™], BD Pharmingen). Para a análise da expressão de IFN- γ foram usados os conjuntos de sondas mCK-1 e mCK-2. Para a análise da expressão de ciclinas foram usados os conjuntos de sondas mCYC-1 e mCYC-2. A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão dos genes constitutivos ribossomal L32 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.9. Western blot

As células indicadas em cada experimento foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 15 minutos com Ionomicina (1.0 μ M). A adição de CsA (1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com Ionomicina. Para os extratos protéicos totais, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 20 μ L de tampão de ressuspensão (Tris 40 mM pH 7.4; EDTA 10 mM pH 8.0; Pirofosfato de Sódio 60 mM) seguido rapidamente de 20 μ L de SDS 10%. Para os extratos protéicos nucleares, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 40 μ L de tampão de lise (Tris 10 mM pH 7.4; NaCl 10 mM; MgCl₂ 3.0 mM; NP-40 0.5%; DTT 0.5 mM; EGTA 0.1 mM; Leupeptina 50 μ M; Aprotinina 50 μ M; PMSF 1.0 mM). Em seguida, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado nuclear foi ressuspendido em 40 μ L de tampão de lise. Após a extração, todas as amostras (extratos totais e nucleares) foram imediatamente aquecidas a 100°C por 20 minutos e estocadas a -80°C. Em seguida, as amostras foram quantificadas através de um kit de dosagem de proteína, segundo as especificações do fabricante (DC Protein Assay, Bio-Rad). Os extratos protéicos (50 μ g) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 6% (Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)) a 25 mA por aproximadamente 4 horas, conforme descrito (Garfin, 1990).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Hybond™-P, Amersham Biosciences) a 30 V por 16 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com TBS 1x (Tris 10 mM pH 7.4; NaCl 150 mM) e leite desnatado em pó 5% por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes com TBST (TBS 1x; Tween-20 0.1%) por 5 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-NFAT1 (anti-67.1; 1:500) em TBST e leite desnatado em pó 5% por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST por 15 minutos e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (HRP, 1:10.000; Pierce) por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 6 vezes com TBST por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi tratada com o kit “ECL™ Western Blotting Analysis System” conforme especificações do fabricante (Amersham Biosciences). Em seguida, um filme de raio-X (Kodak BioMax Light Film) foi exposto a membrana por 5 minutos e revelado em processadora automática (Kodak X-OMAT 2000 Processor).

3.10. Imunofluorescência

Os linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos C57Bl/6 conforme descrito no item 3.5. As células foram aderidas a lamínulas previamente tratadas por 1 hora com gelatina 2% e cultivadas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas por 15 minutos com Ionomicina (1.0 µM). A adição de CsA (1.0 µM) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com Ionomicina. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 3% por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente e lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (PBS 1x; NP-40 0.5%; SFB 5%) por 5 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo primário policlonal anti-NFAT1 (anti-67.1; 1:200) por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente 5 vezes com tampão de

lavagem por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado a rodamina (1:100; Pierce) por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. As células foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem por 5 minutos e as lamínulas foram montadas em lâminas. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência a 580 nm e fotografadas em aumento de 100x (Axiovert S100, Carl Zeiss).

3.11. Plasmídeos

Os diversos plasmídeos utilizados apresentam regiões parciais dos promotores murinos de IL-2, IFN- γ ou ciclina A2 fusionadas ao gene repórter de luciferase (Luc) (pGL3-Control Vector; Promega). O plasmídeo contendo o promotor murino de IL-2 foi gentilmente cedido pela Dra. Anjana Rao (Harvard University; Luo *et al.*, 1996a). Os plasmídeos contendo as diferentes construções do promotor murino de IFN- γ (pIFN- γ) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Christopher Wilson (University of Washington; Sweetser *et al.*, 1998). A região promotora murina de ciclina A2 foi gentilmente cedida pelo Dr. Jean-Marie Blanchard (Institut de Génétique Moléculaire; Huet *et al.*, 1996). Os plasmídeos contendo as diferentes construções do promotor murino de ciclina A2 (CicA2) foram construídos pela Dra. Lilian Carvalho (INCA; Carvalho, 2005). O vetor de expressão NFAT1 apresenta o cDNA da isoforma C de NFAT1 murino (Dra. Anjana Rao, Harvard University; Luo *et al.*, 1996b) clonado no vetor de expressão pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) conforme descrito (Carvalho, 2005). O vetor de expressão controle (Vetor) é caracterizado pela ausência do cDNA de NFAT1 (Figura 26).

A região do promotor de IL-2 é representada simplesmente por 3 sítios de ligação para a proteína NFAT dispostos em sequência e está fusionada ao gene da luciferase (3xNFAT-Luc) (Luo *et al.*, 1996a). A região proximal do promotor murino de IFN- γ (-538 pb) contém 3 sítios de ligação para a proteína NFAT nas posições -100, -160 e -280. Foram utilizados os seguintes plasmídeos: pIFN- γ -538, pIFN- γ -108, pIFN- γ -39, pIFN- γ -538N160 (mutação pontual na posição -160), pIFN- γ -538N280 (mutação pontual na posição -280) e pIFN- γ -538N160/280

(dupla mutação nas posições -160 e -280) (Sweetser *et al.*, 1998). A região proximal do promotor murino de ciclina A2 (-862 pb) contém 1 sítio de ligação para a proteína NFAT na posição -460. Foram utilizados os seguintes plasmídeos: CicA2 -862, CicA2 -576, CicA2 -302, CicA2 -24 e CicA2 -862 Δ -576,-302 (deleção entre sítios -576 e -302) (Carvalho, 2005). Todos os plasmídeos foram transformados e amplificados em bactérias XL1-Blue (Stratagene) e purificados através do kit “Plasmid Maxi Kit” segundo as especificações do fabricante (Qiagen) (Sambrook *et al.*, 1989).

3.12. Ensaios de transativação

Em cada experimento de transativação, as células indicadas foram eletroporadas em um volume final de 600 μ L de meio DMEM sem SFB com as diferentes construções plasmidiais (3-30 μ g) em cubetas de 0.4 cm (Gene Pulser[®] Cuvette, Bio-Rad) a 950 μ F e 250 V (Gene Pulser[®] II, Bio-Rad). Após a eletroporação, as células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente antes de serem plaqueadas. Passadas 24 horas, as células foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 16 horas conforme indicado em cada experimento: PMA (10 nM) e/ou Ionomicina (1.0 μ M). A adição de CsA (1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Em seguida, as células foram recuperadas, centrifugadas e lisadas com 50 μ L do reagente de lise de cultura celular por 20 minutos, conforme as instruções do fabricante (Luciferase Assay System; Promega). O extrato total (10 μ L) foi adicionado a 100 μ L do substrato da luciferase e a atividade de luciferase foi gentilmente dosada pelo Dr. Eduardo Abrantes (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer) através de luminômetro (Monolight 3010 Luminometer, Analytical Luminescence Laboratory). A atividade de luciferase foi expressa em unidades relativas de luz (URL).

3.13. RT-PCR

Os linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} como descrito no item 3.5. As células foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 µg/mL) durante os tempos indicados. Em seguida, o RNA total foi extraído do precipitado celular com o reagente TRIzol[®] conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen). A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão do gene constitutivo de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A síntese de primeira fita de cDNA e a reação de PCR subsequente para a detecção de Eomesodermina (Eomes) foram realizadas através do kit “Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads” conforme as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1.5% e visualizados com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL) em transiluminador ultravioleta (Eagle Eye[™] II, Stratagene). Os oligonucleotídeos usados foram os seguintes (Alpha DNA):

| | | |
|-----------------|------------|---|
| Eomes (334 pb): | Senso | 5' - GCC CAC GTC TAC CTG TGC AAC CG - 3' |
| | Anti-senso | 5' - TGT TAT TGG TGA GTT TTA ACT TCC C - 3' |
| GAPDH (276 pb): | Senso | 5' - TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3' |
| | Anti-senso | 5' - ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA - 3' |

3.14. Co-cultura de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foram isolados conforme descrito no item 3.5. a partir dos camundongos indicados. Os linfócitos T CD4⁺ foram co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ de animais selvagens ou deficientes para IFN-γ (IFN-γ^{+/+} e IFN-γ^{-/-}, respectivamente) em uma razão de 2:1 (CD4⁺:CD8⁺). As células foram estimuladas *in vitro* por 72 horas com anti-CD3 (1.0 µg/mL) na presença de IL-12 (10 ng/mL). Após 3 dias de estímulo, as células foram recolhidas, lavadas 3 vezes em meio de cultura e cultivadas na ausência de estímulos e na

presença de IL-2 (20 U/mL) por 48 horas. Em seguida, os linfócitos T CD4⁺ foram novamente purificados (isolados dos linfócitos T CD8⁺) e cultivados sem estímulos (PBS) ou estimulados *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 µg/mL). Passado este tempo, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e testados para a presença de IFN-γ e IL-4 por ELISA.

3.15. Sensibilização de animais

Animais entre 8 e 12 semanas de idade foram contidos e sensibilizados na pata por via subcutânea com 200 µg de ovalbumina (OVA). A OVA foi reconstituída em PBS 1x (4.0 mg/mL) e emulsificada (1:1) em adjuvante completo de Freund (CFA). A mistura foi homogeneizada por 30 minutos e em seguida inoculada na pata dos animais (100 µL/animal).

3.16. Modelo de inflamação alérgica in vivo

Os animais foram sensibilizados conforme descrito no item anterior. Após 14 dias, os animais foram desafiados na pleura com PBS ou OVA (100 µL/animal a 120 µg/mL). Após 24 horas, a cavidade torácica foi lavada (1.0 mL de PBS 1x; BSA 0.1%) e as células foram citocentrifugadas (Shandon Cytospin 2, Thermo). Em seguida, as células foram coradas com May-Grünwald (Merck) por 5 minutos, seguida de coloração com Giemsa (1:20; Merck) por 30 minutos. As lâminas foram avaliadas para a contagem diferencial de leucócitos através de um microscópio ótico em aumento de 100x (Axioskop, Carl Zeiss). Além disso, os linfonodos drenantes da pata (poplíteos e inguinais) foram isolados 24 horas após o desafio. As células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 µg/mL). Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e testados para a presença de IFN-γ e IL-4 por ELISA. A deleção do compartimento T CD8⁺ em animais NFAT1^{+/+} (NFAT1^{+/+} + anti-CD8) foi realizada através da administração de anticorpo monoclonal anti-CD8 (53.6-7; 100 µg/animal) por via endovenosa na cauda a cada 2 dias. Os inóculos foram

iniciados 10 dias antes da sensibilização e foram mantidos durante todo o experimento. A eficiência da deleção foi avaliada por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). A frequência relativa de linfócitos T CD8⁺ nos linfonodos foi sempre menor do que 3% no final do procedimento de deleção (dado não mostrado).

3.17. Ensaios de proliferação celular

As diferentes células primárias (linfócitos não estimulados ou linfonodos totais sensibilizados *in vivo*) foram preparadas conforme indicado em cada experimento. As células foram cultivadas sem estímulos ou (re)-estimuladas *in vitro* conforme indicado: OVA (0.5 mg/mL) ou anti-CD3 (1.0 µg/mL). Para os ensaios de proliferação celular, as células foram cultivadas na presença de ³H-timidina (5.0 µCi/mL) por 12 horas e recolhidas nos tempos indicados (PHDTM Cell Harvester, Cambridge Technology). Em seguida, a incorporação de ³H-timidina foi dosada em líquido de cintilação através de um contador de partículas β (LS 6000 LL, Beckman Instruments) e expressa em contagens por minuto (CPM). Na figura 18B, as células foram estimuladas na ausência ou presença de anticorpo anti-IL-4 (11B11; 20, 100 ou 200 µg/mL). Para as análises do tempo de ciclo celular, as células (1x10⁷ células/mL) foram lavadas com PBS 1x e marcadas com CFSE (5.0 µM, Invitrogen) em PBS 1x por 15 minutos a 37°C e protegidas da luz. No final dos 15 minutos, as células foram lavadas com meio de cultura com SFB e incubadas por 30 minutos a 37°C e protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas novamente e estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 µg/mL) durante os tempos indicados. Após o tempo de estímulo, as células foram marcadas para moléculas de superfície com anticorpos anti-CD4-PE (GK1.5), anti-CD8-PE (53.6-7) ou anti-B220-PE (RA3-6B2) por 15 minutos a 4°C e protegidas da luz (Figura 17). Finalmente, as células foram analisadas por citometria de fluxo após os tempos indicados (FACScan, Becton Dickinson). Para as análises das fases do ciclo celular, as células foram marcadas com 500 µL de tampão de Iodeto de Propídeo

(PI) (Tris 3.4 mM pH 7.6; NaCl 10 mM; NP-40 0.1%; RNase 700 U/L; PI 0.075 mM) por 15 minutos a 4°C e protegidas da luz (Vindelov, 1977). Após o tempo de marcação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson).

3.18. Bioinformática

As sequências genômicas dos promotores de ciclina A2 e E2 de *M. musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* foram obtidas através de busca por palavra-chave no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>) (21 de outubro de 2005). As sequências foram alinhadas através do programa ClustalW versão 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) presente no servidor do “European Bioinformatics Institute” (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). O alinhamento múltiplo foi analisado pelo programa GeneDoc versão 2.6.002 (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>) e os sítios de ligação para o fator de transcrição NFAT foram identificados através do programa MatInspector versão 5.0 (Cartharius *et al.*, 2005) presente no servidor do “Genomatix” (<http://www.genomatix.de/>). A posição +1 foi usada para definir o início de transcrição do gene murino de ciclina A2 e o início de tradução do gene murino de ciclina E2, de acordo com o banco de dados do NCBI.

3.19. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

Os extratos nucleares foram obtidos a partir de células Jurkat. As células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 1 hora com Ionomicina (1.0 µM). A adição de CsA (1.0 µM) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com Ionomicina. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x; BSA 0.1%. As células foram ressuspendidas em 1.0 mL de tampão RSB 1x (Tris 10 mM pH 7.4; NaCl 10 mM; MgCl₂ 3.0 mM; EGTA 5.0 mM; DTT 1.0 mM; Pirofosfato de Sódio 20 mM; Iodoacetamida 10 mM; NaF 0.5 mM; β-glicerofosfato 10 mM; Leupeptina 50 µM; Aprotinina 50 µM; PMSF 1.0 mM) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida, as células foram lisadas com NP-40 0.05% e centrifugadas a 1.800 x g por 5

minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado nuclear foi lavado gentilmente com 1.0 mL de tampão RSB 1x. As células foram centrifugadas novamente a 4.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado nuclear foi ressuspenso em 60 µL de tampão C (HEPES 20 mM pH 7.4; NaCl 420 mM; MgCl₂ 1.5 mM; EDTA 0.2 mM; Glicerol 25%; DTT 1.0 mM; Leupeptina 50 µM; Aprotinina 50 µM; PMSF 1.0 mM) e incubado por 30 minutos em gelo. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recuperado. Em seguida, foram adicionados 60 µL de tampão D (HEPES 20 mM pH 7.4; KCl 50 mM; EDTA 0.2 mM; Glicerol 20%; DTT 1.0 mM; Leupeptina 50 µM; Aprotinina 50 µM; PMSF 1.0 mM) ao sobrenadante. As amostras foram aliquotadas, dosadas conforme descrito no item 3.4. e estocadas a -80°C. Alternativamente, o domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína recombinante NFAT1 foi utilizado nos ensaios de EMSA (Dra. Anjana Rao, Harvard University).

Os oligonucleotídeos (5.0 µg de cada: senso e anti-senso) foram ressuspenso em 50 µL de tampão de hibridação (Tris 10 mM pH 7.4; NaCl 50 mM), homogeneizados e desnaturados por 10 minutos a 95°C. Em seguida, os oligonucleotídeos foram resfriados lentamente por 16 horas a temperatura ambiente. Para a marcação radioativa, os oligonucleotídeos (50 ng) foram incubados com a enzima T4 polinucleotídeo cinase (10 U; New England Biolabs) por 1 hora a 37°C na presença de 50 µCi de [γ ³²P] dATP (Amersham Biosciences) em um volume final de 20 µL. Após a marcação, a reação foi inativada por 10 minutos a 65°C e as sondas foram purificadas em coluna MicroSpinTM G-25 conforme as especificações do fabricante (Amersham Biosciences).

A reação de EMSA foi realizada com a proteína NFAT1 recombinante (10 nM) ou com o extrato nuclear de células Jurkat (5.0 µg) (Figuras 24A e 24B, respectivamente). As proteínas foram incubadas com as sondas radioativas indicadas (IL-2, CicA2, CicA2 Mut; 10.000 CPMs) por 20 minutos a temperatura ambiente na presença de tampão de reação de EMSA (HEPES 10

mM pH 7.0; NaCl 125 mM; Glicerol 10%; DTT 0.25 mM; BSA 0.8 mg/mL) e poli(dI:dC) (0.2 µg/reacção; Amersham Biosciences) em um volume final de 20 µL. Nos ensaios de competição, os oligonucleotídeos não marcados radioativamente (oligos frios) foram adicionados em excesso a reação antes da adição das sondas marcadas, da seguinte forma: IL-2 (5, 10 e 25x); CicA2 (50, 100, 250x); CicA2 Mut (50, 100, 250x). Os complexos DNA-proteína foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 4% (Acrilamida/Bis-acrilamida (19:1); Bio-Rad) em tampão TBE 1x (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM; EDTA 2.0 mM pH 8.0). Inicialmente, o gel foi submetido a uma potência de 100 V por 1 hora. Em seguida, as amostras foram aplicadas e a eletroforese foi realizada a 200 V por mais 1 hora. O gel foi transferido imediatamente para papel de filtro (Whatman) e seco a vácuo por 2 horas a 75°C (Heto Dry GD-1, Heto Lab Equipment). Em seguida, um filme de raio-X (Kodak BioMax MS) foi exposto ao papel de filtro por 2 horas e revelado em processadora automática (Kodak X-OMAT 2000 Processor). Foram usados os seguintes oligonucleotídeos (IDT, Integrated DNA Technologies):

IL-2: Senso 5' - **TGG AAA** ATT TGT TTC ATA GT - 3'
 Anti-senso 3' - **ACC TTT** TAA ACA AAG TAT CA - 5'

CicA2: Senso 5' - A GTT CCA GCG **TTT CCC** TAT GTT GTA - 3'
 Anti-senso 3' - T CAA GGT CGC **AAA GGG** ATA CAA CAT - 5'

CicA2 Mut: Senso 5' - A GTT CCA GCG **AGA GTC** TAT GTT GTA - 3'
 Anti-senso 3' - T CAA GGT CGC **TCT CAG** ATA CAA CAT - 5'

3.20. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados conforme descrito no item 3.5. a partir dos camundongos indicados. As células foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (0.25 µg/mL) por 7 dias. Após 1 semana, as células foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 4 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (1.0 µM) conforme indicado. A adição de CsA (1.0 µM) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com PMA e Ionomicina. Após o estímulo, as células

foram fixadas diretamente por 20 minutos a temperatura ambiente (HEPES 5.0 mM pH 7.5; NaCl 10 mM; EDTA 0.1 mM; EGTA 0.05 mM; paraformaldeído 1.1%). A reação foi neutralizada com a adição de Glicina (125 mM). As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x a 4°C. Em seguida, as células foram lisadas e o extrato nuclear foi lavado com as soluções I (HEPES 10 mM pH 7.5; EDTA 10 mM; EGTA 0.5 mM; Triton X-100 0.75%) e II (HEPES 10 mM pH 7.5; NaCl 200 mM; EDTA 1.0 mM; EGTA 0.5 mM), respectivamente, por 10 minutos a 4°C. O extrato nuclear foi ressuspensionado gentilmente e lisado em 1.0 mL de tampão de lise (Tris 25 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; SDS 0.1%; Desoxicolato 0.5%; Leupeptina 50 µM; Aprotinina 50 µM; PMSF 1.0 mM). A cromatina foi então sonicada entre 10-15 vezes por 20 segundos a 4°C, com intervalos de 1 minuto entre cada pulso de sonicação (550 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific). Após a sonicação, o tamanho dos fragmentos de cromatina (~300-500 pb) foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2%. A cromatina foi separada do precipitado celular por centrifugação (2 vezes por 5 minutos a 16.000 x g e 4°C) e o sobrenadante foi recuperado depois de cada etapa de centrifugação. Uma alíquota de cada amostra (50 µL) foi retirada, estocada a 4°C e referida como controle positivo do experimento (INPUT). A cromatina foi incubada com contas de sefarose por 2 horas a 4°C sob agitação, segundo as especificações do fabricante (Protein A SepharoseTM CL-4B, Amersham Biosciences). Em seguida, as contas de sefarose foram centrifugadas 2 vezes a 1.100 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante (cromatina fragmentada) foi recuperado depois de cada etapa de centrifugação. A cromatina foi incubada na ausência ou na presença dos anticorpos de interesse por 16 horas a 4°C sob agitação. Os seguintes anticorpos foram usados: anti-NFAT1 (15 µg de anti-67.1 e 50 µg de anti-T2B1) e anti-histona H4 acetilada (5.0 µg de anti-H4ac, Upstate Biotechnology). No dia seguinte, a cromatina foi imunoprecipitada na presença de contas de sefarose por 3 horas a 4°C sob agitação. O imunoprecipitado foi centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e lavado exaustivamente com

diversos tampões conforme descrito (Ansel *et al.*, 2004). O imunoprecipitado foi tratado com RNase A (50 µg/mL; Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C, seguido de tratamento com proteinase K (0.2 mg/mL; Roche) por 4 horas a 50°C. A cromatina foi separada das contas de sefarose através de incubação a 65°C por 16 horas. No dia seguinte, a cromatina foi purificada por extração com fenol-clorofórmio e precipitada com etanol conforme descrito (Sambrook *et al.*, 1989). Finalmente, a cromatina foi ressuspensa em TE 1x (Tris 10 mM pH 8.0; EDTA 0.1 mM) e estocada a -20°C. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 3 minutos; 28 (CicA2) ou 30 (CicE2) ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e extensão final de 72°C por 5 minutos. As reações de PCR foram normalizadas a partir da cromatina dos controles positivos (INPUT). Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL) em transiluminador ultravioleta (Eagle Eye™ II, Stratagene). Foram usados os seguintes oligonucleotídeos (IDT, Integrated DNA Technologies):

| | | |
|--------------------|------------|---|
| CicA2 (209 pb): | Senso | 5' - GTG AGT CAC AGG ACA ATT GGG ACA - 3' |
| | Anti-senso | 5' - TAG GCA GGA GCG TAT GGA TCT GAA - 3' |
| CicE2 5' (239 pb): | Senso | 5' - CAC GGA GAG ATT CTT AAG CAC GGT - 3' |
| | Anti-senso | 5' - TCC AAG AGC GGG CTG TGG AGA A - 3' |
| CicE2 3' (299 pb): | Senso | 5' - TCT CCA AAT TGG CGC GGA A - 3' |
| | Anti-senso | 5' - CGT TAC TAG AAG GTG GCC TAA ACC - 3' |

3.21. Análise estatística

A análise estatística dos valores observados em animais selvagens e deficientes e entre os grupos controles e tratados foi determinada através do teste de Student's (teste t) para comparações simples. Para comparações múltiplas, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas

através do programa GraphPad InStat[®] versão 3.00 (GraphPad Software Inc.). Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram construídos através do programa GraphPad Prism[®] versão 3.03 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

Para avaliar a contribuição de cada compartimento celular durante os fenômenos biológicos estudados, linfonodos totais foram isolados a partir de diversas linhagens de camundongos isogênicos. As populações celulares de interesse foram purificadas através de colunas magnéticas e o grau de pureza foi avaliado através de citometria de fluxo (Figura 5). Antes de qualquer procedimento de purificação, os linfonodos totais apresentaram uma proporção característica de 2:1 entre células T e B, respectivamente (Figura 5, painel superior). Da mesma forma, o compartimento T apresentou uma proporção de 2:1 entre células CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 5, painel superior). A frequência relativa de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ após os procedimentos de purificação foi sempre superior a 95% das células isoladas (Figura 5, painéis inferiores). Todos os experimentos foram realizados com animais não sensibilizados e células indiferenciadas (animais e células “naive”), salvo os casos indicados. As análises demonstradas na figura 5 são representativas de todos os experimentos realizados.

4.1. A participação do NFAT1 na diferenciação de linfócitos

4.1.1. Linfócitos T CD8⁺ produzem IFN- γ após o estímulo do TCR

As proteínas da família NFAT foram inicialmente descritas como fatores de transcrição que regulam a produção de diferentes citocinas em linfócitos (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Com o objetivo de identificar os compartimentos linfocitários produtores de IFN- γ , diferentes populações celulares foram isoladas de camundongos selvagens (NFAT1^{+/+}) ou deficientes para o fator de transcrição NFAT1 (NFAT1^{-/-}), uma vez que esta proteína está intimamente relacionada com a produção de citocinas. As células isoladas foram estimuladas *in vitro* por 48 horas através de anticorpos específicos contra a molécula de superfície CD3 (anti-CD3). Em seguida, os sobrenadantes destas culturas foram recolhidos e a presença de IFN- γ foi detectada por ELISA (Figuras 6A-D). A produção de IFN- γ por células

NFAT1^{-/-} foi sempre reduzida quando comparada com células de animais selvagens, independente do compartimento celular analisado (Figuras 6A-D). Quando analisadas individualmente, a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ apresentou a maior capacidade de produção de IFN- γ e a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ a menor (Figuras 6A-D). Os níveis parciais de IFN- γ observados em culturas de linfonodos totais e linfócitos T CD3⁺ se referem provavelmente aos linfócitos T CD8⁺ presentes nestas culturas (Figuras 6A e 6B, respectivamente). Para determinar a competência de células T CD8⁺ na produção de IFN- γ em relação às células T CD4⁺, linfócitos T CD3⁺ foram isolados de linfonodos de camundongos C57Bl/6 e estimulados *in vitro* durante 48 horas com anti-CD3. Os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos para células CD4⁺ ou CD8⁺ e a presença de IFN- γ intracelular foi avaliada por citometria de fluxo. As análises demonstraram que as células T CD8⁺ e não as células T CD4⁺ são as principais produtoras de IFN- γ durante o estímulo primário de linfócitos T (Figura 6E). Vale reforçar que a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ demonstrou-se totalmente dependente de NFAT1, uma vez que células T CD8⁺ NFAT1^{-/-} são incompetentes para a produção desta citocina (Figura 6D).

Com o objetivo de caracterizar os mecanismos moleculares da produção de IFN- γ nestas células, linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos C57Bl/6 e estimulados *in vitro* por 72 horas através de diferentes estímulos (Figura 7). Conforme observado anteriormente, células T CD8⁺ produziram grandes quantidades de IFN- γ quando estimuladas através do TCR (anti-CD3), mas a presença do co-estímulo anti-CD28 não alterou esta produção (Figura 7A). Além disso, a administração das citocinas IL-12 e IL-18, clássicas indutoras de IFN- γ em outros tipos celulares, não induziu a produção de IFN- γ nestas células, mas amplificou a produção dependente do estímulo por TCR (Figuras 7A e 7B). Este resultado sugere um papel secundário para estas citocinas durante a produção de IFN- γ em células T CD8⁺. Um dos principais eventos celulares após a ativação de linfócitos através do TCR é o aumento dos níveis intracelulares de

Ca^{2+} . Para avaliar a importância do Ca^{2+} na produção de IFN- γ , o ionóforo de Ca^{2+} Ionomicina (Iono) foi administrado por 72 horas a linfócitos T CD8^+ e se mostrou capaz de induzir a produção de IFN- γ nestas células (Figura 7C). Em contrapartida, a administração do éster de forbol PMA não foi capaz de estimular a produção de IFN- γ nem de potencializar os efeitos induzidos pela Ionomicina (Figura 7C). A expressão de IFN- γ em linfócitos T CD8^+ foi ainda avaliada através do ensaio de proteção a RNase (RPA). Novamente, a indução de IFN- γ em células T CD8^+ mostrou-se totalmente dependente do estímulo por TCR (Figura 7D). Além disso, tanto a expressão quanto a produção de IFN- γ nestas células foram sempre bloqueadas pela administração da droga imunossupressora Ciclosporina A (CsA) (Figura 7). O somatório destas evidências indica o envolvimento de proteínas da família NFAT durante a regulação da produção de IFN- γ em linfócitos T CD8^+ , visto que: i) a produção de IFN- γ é totalmente dependente do estímulo por TCR e do influxo intracelular de Ca^{2+} ; ii) a administração de CsA bloqueia a produção desta citocina; e iii) células T CD8^+ deficientes para o fator de transcrição NFAT1 são incompetentes para a produção de IFN- γ .

4.1.2. NFAT1 é essencial para a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8^+

Os fatores de transcrição da família NFAT são encontrados em diversos tipos celulares (Rao *et al.*, 1997; Horsley e Pavlath, 2002; Macián, 2005). Contudo, não existiam até o presente momento evidências de que linfócitos T CD8^+ apresentavam a proteína NFAT1. Para responder a esta questão, linfócitos T CD8^+ foram isolados de linfonodos de camundongos C57Bl/6, e avaliados para a presença de NFAT1 (Figura 8). Células T CD8^+ não estimuladas (PBS) apresentaram o fator de transcrição NFAT1 na sua forma inativa (fosforilada), que se tornava ativa (desfosforilada) após o tratamento com o ionóforo de Ca^{2+} (Iono) (Figura 8A). Novamente, a administração de Ciclosporina A (CsA) bloqueou a ativação da proteína NFAT1 (Figura 8A). A localização nuclear desta proteína foi avaliada por imunofluorescência que revelou a

capacidade de translocação nuclear de NFAT1 após o tratamento com Ionomicina e a reversão do fenômeno (exportação ao citoplasma) após a administração de CsA (Figuras 8A e 8B). Para testar a hipótese de que o NFAT seria capaz de transativar o promotor de IFN- γ em células CD8⁺, a linhagem celular CTLL-R8⁺ foi inicialmente avaliada para a presença da proteína NFAT1 (Figura 9). Conforme observado em células primárias, a linhagem T citotóxica CTLL-R8⁺ também apresentou a proteína NFAT1, que foi capaz de ser ativada após o tratamento com Ionomicina e bloqueada por CsA (Figura 9A). Além da ativação de NFAT1, a simples adição do ionóforo de Ca²⁺ induziu a produção de IFN- γ nesta linhagem que foi bloqueada novamente pela administração de CsA (Figura 9B). A administração do éster de forbol PMA não foi capaz de induzir nem de potencializar a produção de IFN- γ destas células (Figura 9B).

A funcionalidade das proteínas da família NFAT foi avaliada através de ensaios de transativação com gene repórter de luciferase, fusionado ao promotor murino de IL-2 que contém 3 sítios de ligação para proteínas NFAT (3xNFAT-Luc) (Figura 9C). As células CTLL-R8⁺ transfectadas com o promotor de IL-2 e ativadas com PMA e Ionomicina foram capazes de transativar o gene da luciferase (Figura 9D). Este resultado indicou que proteínas NFAT intracelulares são funcionais e capazes de transativar promotores-alvos na linhagem celular CTLL-R8⁺. Em seguida, foi avaliada a capacidade de proteínas NFAT transativarem o promotor murino de IFN- γ fusionado ao gene repórter da luciferase. As células CTLL-R8⁺ foram transfectadas com diferentes construções do promotor proximal de IFN- γ , contendo 3, 2, 1 ou nenhum sítio de ligação para os membros da família NFAT (posições -100, -160 e -280) (Figura 10A). A administração de Ionomicina se mostrou suficiente para induzir a transativação do promotor de IFN- γ (pIFN- γ -538) que contém 3 sítios de ligação para NFAT (Figura 10B). Novamente, a simples administração de PMA ou ainda a sua associação com Ionomicina foram incapazes de induzir/potencializar a atividade do gene repórter em células CTLL-R8⁺ (Figura 10B). A adição de Ciclosporina A reprimiu totalmente a transativação desta região promotora

sob a indução de quaisquer tratamentos (Figura 10B). Construções parciais da região promotora de IFN- γ contendo 1 ou nenhum sítio de ligação para NFAT (pIFN- γ -108 e pIFN- γ -39, respectivamente) resultaram na diminuição da ativação do gene repórter quando ativados com Ionomicina (Figura 10C). Mutações individuais ou combinadas em 2 sítios de ligação para NFAT no promotor de IFN- γ (pIFN- γ -538N160; pIFN- γ -538N280; pIFN- γ -538N160/280; mutações nas posições -160 e -280) reduziram a metade a transativação do gene da luciferase em células CTLL-R8⁺ (Figura 10D). Novamente, a transativação das diversas construções do promotor de IFN- γ se mostrou sensível ao tratamento com Ciclosporina A (Figuras 10B-D). Até mesmo a construção que apresenta mutações em 2 sítios de ligação para NFAT (pIFN- γ -538N160/280) se mostrou sensível ao tratamento com CsA, indicando que o sítio preservado na posição -100 pode ainda exercer um papel importante na transativação do promotor de IFN- γ em células T CD8⁺ (Figura 10D).

A prova inequívoca da participação de NFAT1 durante a regulação da expressão de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ foi avaliada em animais deficientes para este fator de transcrição. Linfócitos T CD3⁺ isolados de camundongos NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} foram estimulados *in vitro* durante 48 horas com anti-CD3. Novamente, os linfócitos T CD8⁺ representaram a principal fonte de produção de IFN- γ durante o estímulo primário de linfócitos T (Figura 11A, painel esquerdo). De forma consistente com os resultados anteriores, a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ mostrou-se dependente do fator de transcrição NFAT1, visto que a ausência desta proteína ocasionou uma redução de 70% na frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Figura 11A, painel inferior). A produção de IFN- γ também foi avaliada durante o tempo de estimulação do TCR em linfócitos T CD8⁺ de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. Após 72 horas de estímulo, a produção de IFN- γ se mostrou reduzida em 10 vezes na ausência do fator de transcrição NFAT1 (Figura 11B). Considerando a importância do fator de transcrição Eomesodermina (Eomes) durante a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺, células T CD8⁺ de

animais selvagens ou deficientes para NFAT1 foram investigadas para a expressão deste gene por RT-PCR (Figura 12). Conforme descrito anteriormente, o estímulo do TCR induziu a expressão de Eomes em células T CD8⁺ (Figura 12). Contudo, não foram observadas diferenças na expressão de Eomes quando linfócitos T CD8⁺ NFAT1^{-/-} foram comparados com linfócitos T CD8⁺ selvagens, afastando a hipótese do envolvimento de Eomes na produção de IFN- γ neste modelo (Figura 12).

4.1.3. Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ induz a diferenciação do tipo Th1 in vitro e controla a inflamação alérgica in vivo

Inicialmente, a citocina IL-12 foi caracterizada como o principal fator necessário para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1 (Seder *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2003). Contudo, diversos trabalhos demonstraram que a citocina IFN- γ também pode exercer um papel fundamental durante o desenvolvimento deste fenótipo tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Boehm *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2003). Com o objetivo de avaliar a influência do IFN- γ produzido por células T CD8⁺ durante a geração de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1, células T CD4⁺ foram co-cultivadas e estimuladas com linfócitos T CD8⁺ de animais normais ou deficientes para IFN- γ (Figura 13A). As células T CD4⁺ que foram cultivadas na presença de linfócitos T CD8⁺ competentes para a produção de IFN- γ foram capazes de produzir altos níveis de IFN- γ e níveis indetectáveis de IL-4 durante o estímulo secundário *in vitro* quando comparadas com células T CD4⁺ que foram cultivadas na presença de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ^{-/-} (Figura 13B). Este resultado indica que o IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ durante o estímulo primário pode consolidar o desenvolvimento do fenótipo Th1 de linfócitos T CD4⁺ *in vitro*.

Para caracterizar a relevância biológica do IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ durante a geração de respostas imunes *in vivo*, utilizou-se um modelo murino de pleurisia

alérgica. Disfunções alérgicas são normalmente caracterizadas por: i) um infiltrado acentuado de eosinófilos no tecido inflamado, ii) um aumento dos níveis séricos de IgE, e iii) um perfil de produção de citocinas do tipo Th2 (altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13) dependente de linfócitos T CD4⁺ (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001). Diversos trabalhos demonstraram que citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-12, podem contrabalançar ou mesmo suprimir respostas imunes do tipo Th2 encontradas em doenças alérgicas (Iwamoto *et al.*, 1993; Cohn *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 1999). Para testar a hipótese de que o IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ é capaz de modular respostas Th1/Th2 e controlar a migração de eosinófilos *in vivo*, foi utilizado um modelo murino de inflamação alérgica (Figura 14). Camundongos de diferentes linhagens foram sensibilizados na pata com o antígeno ovalbumina (OVA) e desafiados na pleura com o mesmo antígeno após 14 dias (Figura 14A). Passadas 24 horas, a cavidade pleural foi acessada para a contagem de eosinófilos e os linfonodos drenantes da pata foram avaliados *in vitro* para o perfil de citocinas produzidas (Figura 14A). Conforme observado anteriormente, camundongos NFAT1^{-/-} apresentaram mais eosinófilos na cavidade pleural após o desafio com OVA do que animais selvagens (Figura 14B; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Viola *et al.*, 1998). A deleção de linfócitos T CD8⁺ em animais selvagens (NFAT1^{+/+} + anti-CD8) induziu um acúmulo de eosinófilos na cavidade pleural em um nível semelhante ao observado em camundongos deficientes para NFAT1, sustentando a hipótese formulada anteriormente (Figura 14B). Além disso, tanto animais deficientes do compartimento T CD8⁺ (CD8 α ^{-/-}) quanto animais que não produzem IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) também apresentaram eosinofilia após o desafio com OVA quando comparados com seus respectivos animais controles (Figura 14B).

Para compreender o padrão da resposta imune gerada neste modelo, os linfonodos drenantes da pata destes animais foram estimulados *in vitro* durante 48 horas com anti-CD3 para avaliação do perfil de citocinas produzidas (Figura 15). Todos os animais que apresentaram eosinofilia *in vivo* (camundongos NFAT1^{+/+} + anti-CD8, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{-/-} e IFN γ ^{-/-}) apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ quando comparados com seus respectivos animais

controles (Figura 15). De forma interessante, a deleção de células T CD8⁺ em animais NFAT1^{+/+} gerou uma diminuição na produção de IFN- γ que não foi acompanhada por um aumento na produção de IL-4 (Figura 15). Da mesma maneira, os níveis de IL-4 produzidos por animais CD8 α ^{-/-} não foram diferentes daqueles produzidos por animais selvagens (Figura 15). Apesar do incontestável envolvimento de citocinas do tipo Th2 durante a evolução de respostas alérgicas (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001), sugere-se que a ausência de IFN- γ (ou mesmo do fenótipo Th1) também possa favorecer o estabelecimento do quadro alérgico *in vivo*. Somados, estes resultados indicam que o IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ de forma dependente do fator de transcrição NFAT1 previne a migração de eosinófilos para o sítio inflamatório e influencia o balanço de respostas imunes do tipo Th1/Th2 em doenças alérgicas *in vivo*.

4.2. A participação do NFAT1 na proliferação de linfócitos

4.2.1. Ausência de NFAT1 induz a hiperproliferação linfocitária durante o desafio *in vitro*

Além do consolidado papel na regulação de genes de citocinas, as proteínas da família NFAT foram recentemente relacionadas com a proliferação celular em diferentes tipos celulares (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). Com o objetivo de avaliar o papel do NFAT1 no potencial proliferativo de linfócitos, camundongos selvagens ou deficientes para NFAT1 foram sensibilizados na pata com o antígeno ovalbumina (OVA) e desafiados *in vitro* após 14 dias (Figuras 16-19). Os linfonodos drenantes da pata (poplíteos e inguinais) foram isolados e estimulados *in vitro* com OVA ou anti-CD3 durante os tempos indicados (Figuras 16A e 16B, respectivamente). Após o desafio com OVA, linfócitos NFAT1^{-/-} foram capazes de proliferar mais do que linfócitos selvagens ao longo do tempo de estímulo (Figura 16A). Para avaliar o tempo de replicação celular, linfonodos totais de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram marcados com CFSE e desafiados *in vitro* com anti-CD3 (Figura 16B). Após 42 horas de estímulo, metade das células NFAT1^{-/-} já havia passado pelas fases do ciclo celular ao menos

uma vez (primeira divisão), ao passo que as células selvagens permaneciam ainda sem se dividir (Figura 16B). Com o decorrer do tempo de estímulo, as diferenças se tornaram ainda mais acentuadas e mais linfócitos NFAT1^{-/-} foram observados na segunda, terceira e quarta passagem do ciclo celular quando comparados com linfócitos NFAT1^{+/+} (Figura 16B).

Para caracterizar melhor a hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-}, os diferentes compartimentos celulares foram analisados individualmente através de marcação com CFSE. O fenômeno de hiperproliferação linfocitária não se mostrou restrito a um compartimento celular específico, sendo observado tanto em linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos B (Figura 17). Contudo, os linfócitos B NFAT1^{-/-} apresentaram uma diferença de proliferação bastante pronunciada quando comparados com linfócitos B selvagens (Figura 17). Após 72 horas de estímulo, a maior parte das células B NFAT1^{-/-} se encontrou na terceira, quarta e quinta passagem do ciclo celular, ao passo que os linfócitos B selvagens ainda se encontraram na primeira e segunda passagem ou mesmo sem se dividir (Figura 17). Conforme descrito anteriormente, linfócitos de animais NFAT1^{-/-} apresentam uma resposta imunológica do tipo Th2 quando estimulados *in vitro*, caracterizada pela alta produção de IL-4 (Figura 18A; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Considerando a possível influência da citocina IL-4 como um fator de crescimento que favorece a hiperproliferação dos linfócitos NFAT1^{-/-}, linfonodos totais de animais NFAT1^{-/-} foram desafiados *in vitro* com OVA na presença de concentrações crescentes de anticorpos neutralizantes para IL-4 (anti-IL-4) (Figura 18B). A hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-} não foi alterada após o tratamento com anti-IL-4, sugerindo que o fenômeno de hiperproliferação não é dependente desta citocina mas de outro mecanismo intrínseco da própria célula (Figura 18B).

A progressão do ciclo celular é ditada pela ativação de diversos complexos protéicos, onde as ciclinas desempenham um papel fundamental na unidirecionalidade e especificidade das diferentes fases do ciclo (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). Uma vez que genes de ciclinas são precisamente regulados durante a transcrição gênica e apresentam sítios de ligação

para a proteína NFAT em suas regiões promotoras, a expressão de diversas ciclinas foi avaliada em linfócitos normais ou deficientes para o fator de transcrição NFAT1 (Figura 19). Animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados e os linfonodos drenantes foram desafiados *in vitro* com OVA após 14 dias. A expressão dos genes de ciclinas foi avaliada através do ensaio de proteção a RNase (RPA) e indicou que linfócitos NFAT1^{-/-} apresentam um aumento na expressão das ciclinas A2, B1, E e F (Figura 19). Desta forma, o somatório destas evidências indica o envolvimento do fator de transcrição NFAT1 durante a progressão celular de linfócitos, visto que a ausência de NFAT1 provoca: i) um aumento do potencial proliferativo de linfócitos; ii) um encurtamento do tempo de ciclo celular; e iii) uma superexpressão de genes de ciclinas.

4.2.2. NFAT1 é um repressor da proliferação celular em linfócitos

Para reforçar a hipótese de que o fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação de linfócitos, linfonodos totais de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} não sensibilizados (“naive”) foram avaliados durante o estímulo primário *in vitro* (Figuras 20 e 21). Sustentando os resultados observados no desafio de animais sensibilizados, linfócitos deficientes para NFAT1 proliferaram mais do que linfócitos normais durante o estímulo primário com anti-CD3 (Figura 20A). Da mesma forma, estes linfócitos apresentaram um encurtamento do tempo de ciclo celular quando analisados através da marcação com CFSE (Figura 20B). Quase a metade dos linfócitos NFAT1^{-/-} já havia alcançado a primeira divisão do ciclo celular, enquanto todos os linfócitos selvagens ainda permaneciam sem se dividir após 48 horas de estímulo primário *in vitro* (Figura 20B). Além disso, um enriquecimento de linfócitos em fases S e G₂/M foi observado em células NFAT1^{-/-} através da marcação com Iodeto de Propídeo (Figura 21). Após 48 horas de estímulo, linfócitos deficientes para NFAT1 apresentaram mais células em fases S e G₂/M (32% e 16%, respectivamente) quando comparados com linfócitos normais (27% e 12%) (Figura 21). Este conjunto de resultados reforça a participação de NFAT1 como um repressor da progressão celular inicial de linfócitos.

Trabalhos recentes têm sugerido o envolvimento de fatores de transcrição da família NFAT nos processos de ciclo celular e tumorigênese em diferentes tipos celulares (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). De fato, a expressão aumentada de ciclinas em linfócitos deficientes para NFAT1 indica a participação desta proteína durante a regulação destes genes, seja de forma direta ou indireta (Figura 19). Vale ressaltar que a expressão de ciclinas é controlada durante o momento da transcrição gênica (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). Além disso, foi também demonstrado que a expressão de ciclinas pode ser influenciada pelo tratamento com Ciclosporina A, indicando a participação de proteínas NFAT (Tomono *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001). Somadas, estas evidências sugerem um possível envolvimento de NFAT na regulação da expressão de ciclinas. Uma análise de bioinformática em regiões regulatórias de genes de ciclinas revelou a presença de 1 e 4 sítios de ligação para NFAT nos promotores murinos de ciclina A2 e E2, respectivamente. Ensaios de ligação e transativação destas regiões foram realizados para avaliar a influência do NFAT1 na regulação destes genes (Figuras 22-28).

4.2.3. NFAT1 se liga ao promotor e reprime a expressão de ciclina A2

Com o objetivo de identificar regiões regulatórias relevantes, a atividade do promotor proximal de ciclina A2 foi mapeada através de ensaios de transativação. Sequências parciais do promotor murino de ciclina A2 foram fusionadas ao gene repórter da luciferase (Ciclina A2-Luc) e transfectadas em células Jurkat (Figura 22A). Os resultados indicaram tanto a presença de uma região regulatória negativa quanto a presença de uma região regulatória positiva no promotor proximal de ciclina A2 (Figura 22B). A deleção da região -576/-302 levou a um aumento da atividade do gene repórter (construções plasmidiais CicA2 -302 e CicA2 -862 Δ -576,-302), caracterizando a presença da região regulatória negativa neste promotor. Por outro lado, a deleção da região -302/-24 levou a uma diminuição da expressão da luciferase (construção plasmidial CicA2 -24), sugerindo a presença de uma sequência regulatória positiva (Figura 22B).

Uma vez que o NFAT1 funciona como um repressor do ciclo celular em linfócitos, a região regulatória negativa identificada por ensaios de transativação foi investigada para a presença de possíveis sítios de ligação para a proteína NFAT. De fato, um sítio de ligação consenso para NFAT (TTTCC/GGAAA) foi encontrado na posição -460 do promotor murino de ciclina A2 (*M. musculus*, *Mm*) (Figura 23). Interessantemente, este sítio se localiza na região regulatória negativa do promotor de ciclina A2 (-576/-302) e está conservado na mesma posição no genoma de rato (*R. norvegicus*, *Rn*), mas não no genoma de humanos (*H. sapiens*, *Hs*) (Figura 23).

A capacidade de ligação de NFAT1 ao promotor murino de ciclina A2 foi avaliada tanto *in vitro* quanto *in vivo* por ensaios de gel de retardo (EMSA) e imunoprecipitação de cromatina (ChIP), respectivamente (Figuras 24 e 25). A proteína NFAT1 recombinante foi capaz de se ligar tanto ao sítio consenso encontrado no promotor murino de IL-2, quanto ao novo sítio identificado no promotor murino de ciclina A2 (Figura 24A, linhas 1 e 2, respectivamente). Mutações no sítio consenso de ligação para NFAT (GGAAA/ACTCT) impediram a ligação de NFAT1 nesta região do promotor de ciclina A2 (Figura 24A, linha 3). Além disso, ensaios de competição com oligonucleotídeos não marcados radioativamente demonstraram que a ligação de NFAT1 ao promotor de ciclina A2 pode ser inibida tanto pela sequência do promotor de IL-2 quanto pelo próprio promotor de ciclina A2 (Figura 24A). Contudo, esta ligação não foi afetada pela competição com o promotor de ciclina A2 mutado para o sítio de ligação de NFAT (Figura 24A). Extratos nucleares de células Jurkat apresentaram uma proteína capaz de se ligar na sequência específica do promotor de ciclina A2 que contém o sítio de ligação para NFAT (Figura 24B). Além disso, a formação deste complexo de DNA-proteína foi induzida após a ativação com ionóforo de Ca^{2+} (Iono) e bloqueada através da administração de Ciclosporina A (CsA), caracterizando um possível envolvimento de proteínas NFAT nesta ligação (Figura 24B).

Posteriormente, ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) avaliaram a capacidade de NFAT1 se ligar *in vivo* ao promotor de ciclina A2 (Figura 25). Um par de oligonucleotídeos foi desenhado de maneira a englobar o sítio de ligação para NFAT encontrado

na posição -460 do promotor murino de ciclina A2 (Figura 25A). Linfócitos T CD4⁺ foram isolados de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} e estimulados *in vitro* durante 7 dias. Após este período, as células foram cultivadas na ausência de estímulos ou estimuladas *in vitro* com PMA e Ionomicina (PMA + Iono) durante 4 horas (Figuras 25B e 25C). A ativação de linfócitos T CD4⁺ NFAT1^{+/+} (PMA + Iono) induziu a ligação de NFAT1 ao promotor de ciclina A2, fato não observado em células deficientes para este fator de transcrição (Figura 25B). Além disso, o tratamento com Ciclosporina A foi capaz de reverter totalmente a ligação de NFAT1 ao promotor de ciclina A2 em linfócitos selvagens (Figura 25C).

Uma vez confirmada a interação de NFAT1 com o promotor de ciclina A2, tornou-se fundamental avaliar as consequências desta interação durante a regulação da expressão deste gene (Figura 26). Inicialmente, células Jurkat foram transfectadas com o promotor murino de IL-2 que apresenta 3 sítios de ligação para NFAT, fusionado ao gene repórter da luciferase (3xNFAT-Luc) (Figura 26A). Células Jurkat, que apresentam NFAT1 endógeno, foram capazes de transativar o promotor de IL-2 quando estimuladas com PMA e Ionomicina (Figura 26B; Vetor). A superexpressão de NFAT1 em células Jurkat induziu um aumento na atividade da luciferase quando estas células foram tratadas com PMA e Ionomicina (Figura 26B; NFAT1). Reforçando o envolvimento de NFAT neste fenômeno, o tratamento com Ciclosporina A foi capaz de bloquear totalmente a atividade do gene repórter (Figura 26B). Em seguida, as células Jurkat foram transfectadas com o promotor da ciclina A2, contendo o sítio de ligação para NFAT na posição -460 (CicA2 -576) (Figura 26C). Surpreendentemente, o tratamento das células com PMA e Ionomicina levou a uma repressão de aproximadamente 70% da atividade do gene repórter da luciferase quando comparada com células não tratadas (PBS) (Figura 26D; Vetor). A superexpressão de NFAT1 reprimiu ainda mais os níveis de expressão do gene repórter quando as células foram tratadas com PMA e Ionomicina (Figura 26D; NFAT1). Novamente, o tratamento com CsA reverteu o fenômeno observado, restaurando os níveis da atividade do promotor de ciclina A2 (Figura 26D). Este conjunto de resultados demonstra claramente que a

proteína NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor de ciclina A2 tanto *in vitro* quanto *in vivo* e funciona como um repressor da expressão deste gene. Estes dados sugerem que o fator de transcrição NFAT1 funciona como um repressor direto da progressão celular de linfócitos através da regulação da expressão de genes de ciclo celular.

Análises de bioinformática também identificaram 4 sítios de ligação para NFAT (TTTCC ou GGAAA) em uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2 (posições -215, -325, -480 e -555 em relação ao início de tradução) (Figura 27). Dentre os 4 sítios encontrados no promotor murino de ciclina E2, somente 2 deles (posições -215 e -480) estão conservados tanto no genoma de rato (*R. norvegicus*, *Rn*) como no genoma de humanos (*H. sapiens*, *Hs*) (Figura 27). Os outros dois sítios (posições -325 e -555) estão conservados somente no genoma de rato (Figura 27). Ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) avaliaram a capacidade de ligação de NFAT1 nesta região regulatória (Figura 28). Os pares de oligonucleotídeos usados foram desenhados de maneira a englobar todos os sítios de ligação para NFAT (Figura 28A). A distância entre os quatro sítios induziu uma análise fragmentada em dois grupos, cada um contendo dois sítios e nomeados como sítios proximais (E2 3'; amplicon de 299 pb englobando os sítios -215 e -325) e distais (E2 5'; amplicon de 239 pb englobando os sítios -480 e -555) do promotor de ciclina E2 (Figura 28A). Linfócitos T CD4⁺ foram isolados de animais NFAT1^{+/+} e estimulados *in vitro* durante 7 dias. Em seguida, as células foram cultivadas na ausência de estímulos ou estimuladas *in vitro* com PMA e Ionomicina (PMA + Iono) durante 4 horas. O fator de transcrição NFAT1 foi capaz de se ligar à região proximal do promotor de ciclina E2 (CicE2 3') após o tratamento com PMA e Ionomicina, mas não a região distal (CicE2 5') (Figura 28B, painéis direito e esquerdo, respectivamente). Contudo, não se pode afirmar se a ligação de NFAT1 ocorre especificamente em um dos dois sítios (ou mesmo nos dois) identificados nesta região regulatória do promotor de ciclina E2 (sítios -215 e -325) (Figura 28A).

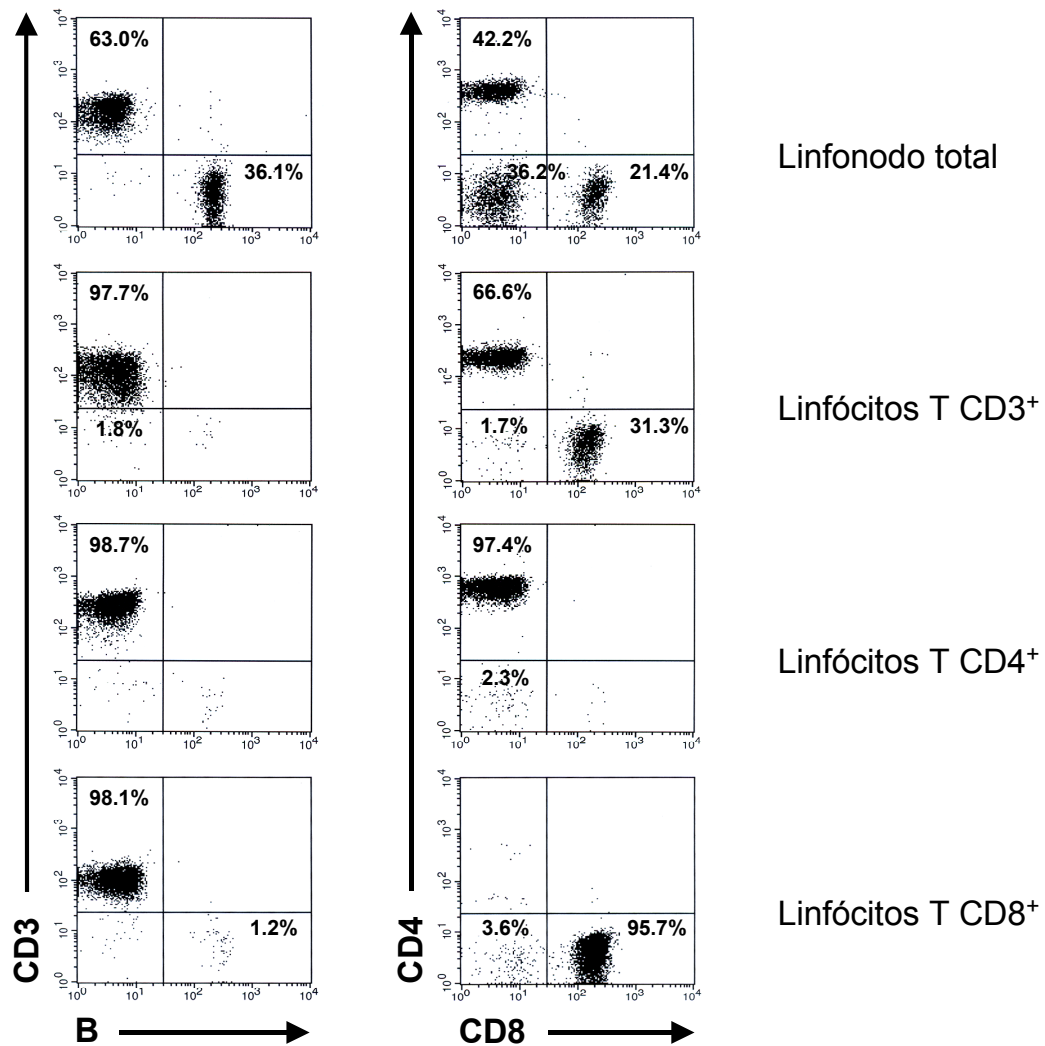


Figura 5: Frequência celular de diferentes populações linfocitárias avaliadas por citometria de fluxo. Linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados de animais C57Bl/6 e marcados diretamente para as moléculas de superfície celular (painel superior) ou purificados em diferentes populações linfocitárias através de separação por coluna magnética e, em seguida, marcados para avaliação do grau de pureza (painéis inferiores). Os anticorpos para marcação de superfície foram utilizados da seguinte forma: anti-B220-FITC e anti-CD3-PE (painéis esquerdos) ou anti-CD8-FITC e anti-CD4-PE (painéis direitos). Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante. Os resultados são representativos de todos os experimentos realizados com as diferentes linhagens de camundongos.

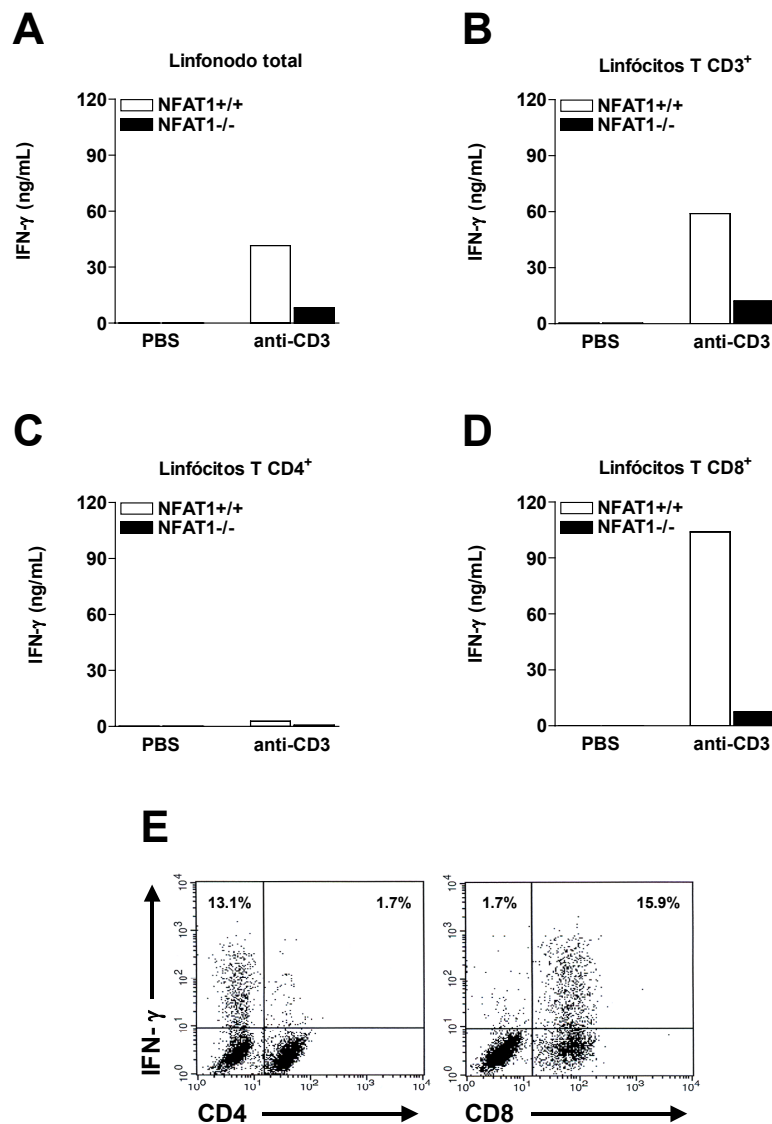


Figura 6: Linfócitos T CD8⁺ representam a principal fonte de IFN-γ durante o estímulo primário de células T. (A-D) Diferentes compartimentos celulares foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. As células (1×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ por ELISA. (A) Linfonodo total; (B) Linfócitos T CD3⁺; (C) Linfócitos T CD4⁺; e (D) Linfócitos T CD8⁺. (E) Linfócitos T CD3⁺ foram isolados de camundongos C57Bl/6. As células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e marcadas tanto para moléculas de superfície (anti-CD4-FITC ou anti-CD8-FITC) quanto para citocina intracelular (IFN- γ -PE). Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

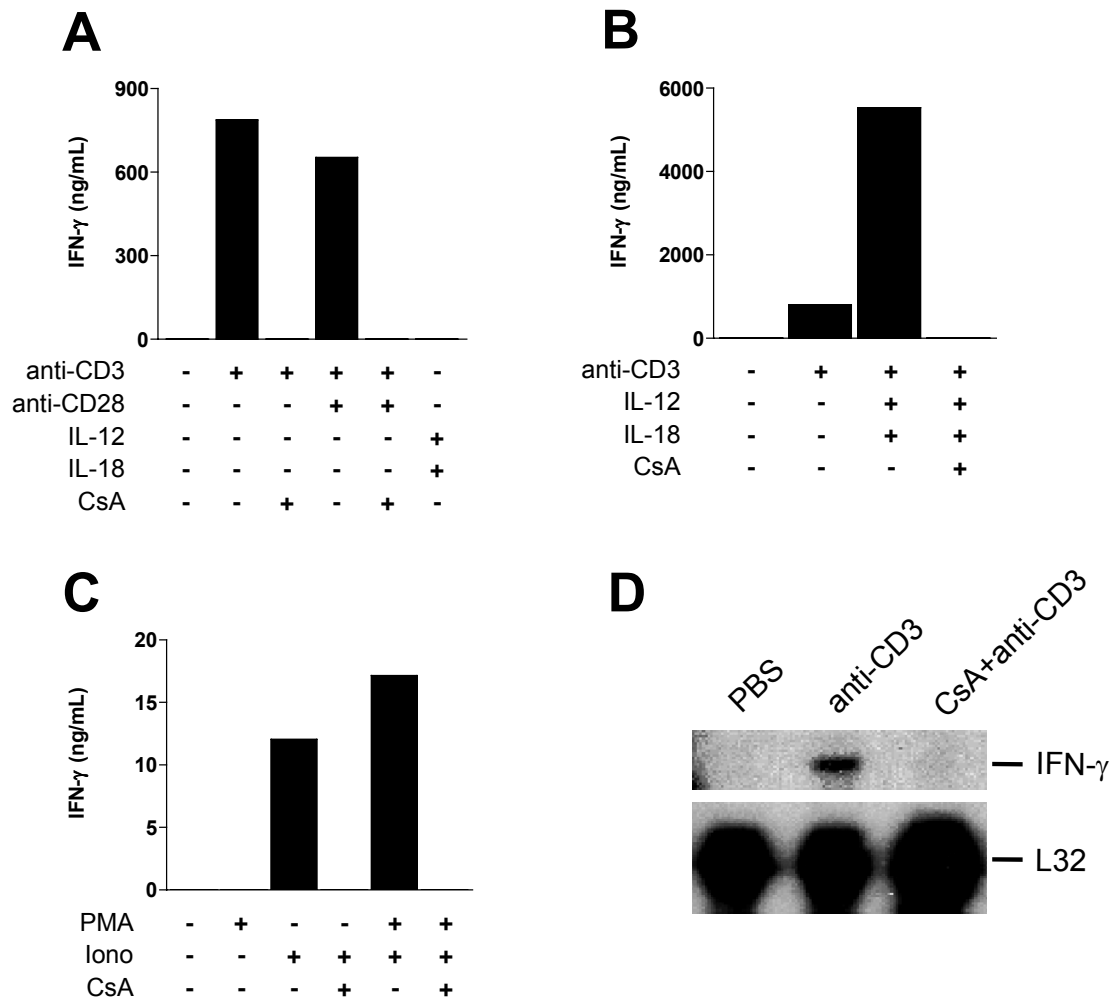


Figura 7: Linfócitos T CD8⁺ produzem IFN- γ após o estímulo do TCR. Linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos C57Bl/6. (A-C) As células (1×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 72 horas conforme indicado: anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g/mL}$); anti-CD28 (5.0 $\mu\text{g/mL}$); IL-12 (10 ng/mL); IL-18 (50 ng/mL); PMA (10 nM); Ionomicina (Iono; 1.0 μM). A adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μM) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ por ELISA. (D) As células (2×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 6 horas através de anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g/mL}$). A adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μM) ocorreu 15 minutos antes do estímulo com anti-CD3. O RNA total foi extraído e a expressão de IFN- γ foi avaliada através do ensaio de proteção a RNase (RPA). A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão do gene ribossomal constitutivo L32. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de no mínimo 2 experimentos independentes.

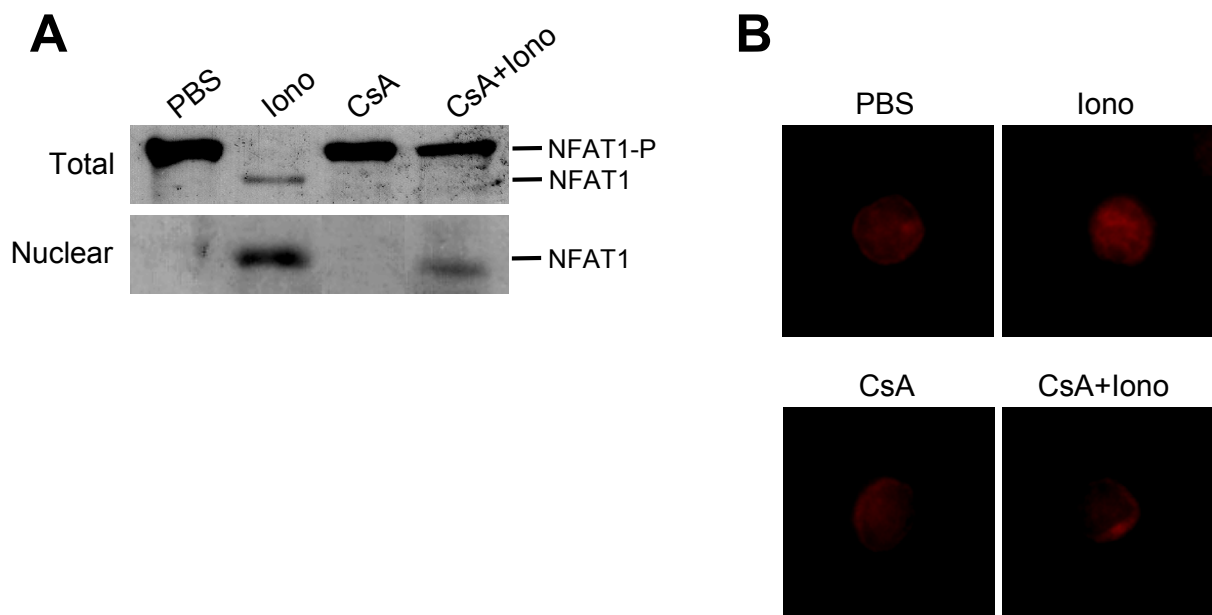


Figura 8: NFAT1 é ativado e translocado para o núcleo de linfócitos T CD8⁺ após o influxo de Ca²⁺. Linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos C57Bl/6 e cultivados sem estímulos (PBS) ou estimulados *in vitro* por 15 minutos com Ionomicina (Iono; 1.0 μ M). A adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com Ionomicina. (A) Extratos protéicos totais ou nucleares (painéis superior e inferior, respectivamente) foram obtidos a partir de células T CD8⁺ (2×10^6) e analisados por Western blot usando anticorpo policlonal anti-NFAT1 (anti-67.1). NFAT1, NFAT1 desfosforilado; NFAT1-P, NFAT1 fosforilado. (B) As células (2×10^5) foram fixadas, permeabilizadas e a proteína NFAT1 foi localizada por imunofluorescência através do anticorpo policlonal anti-NFAT1 (anti-67.1) e anticorpo secundário conjugado a rodamina. As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 100x. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 2 experimentos independentes.

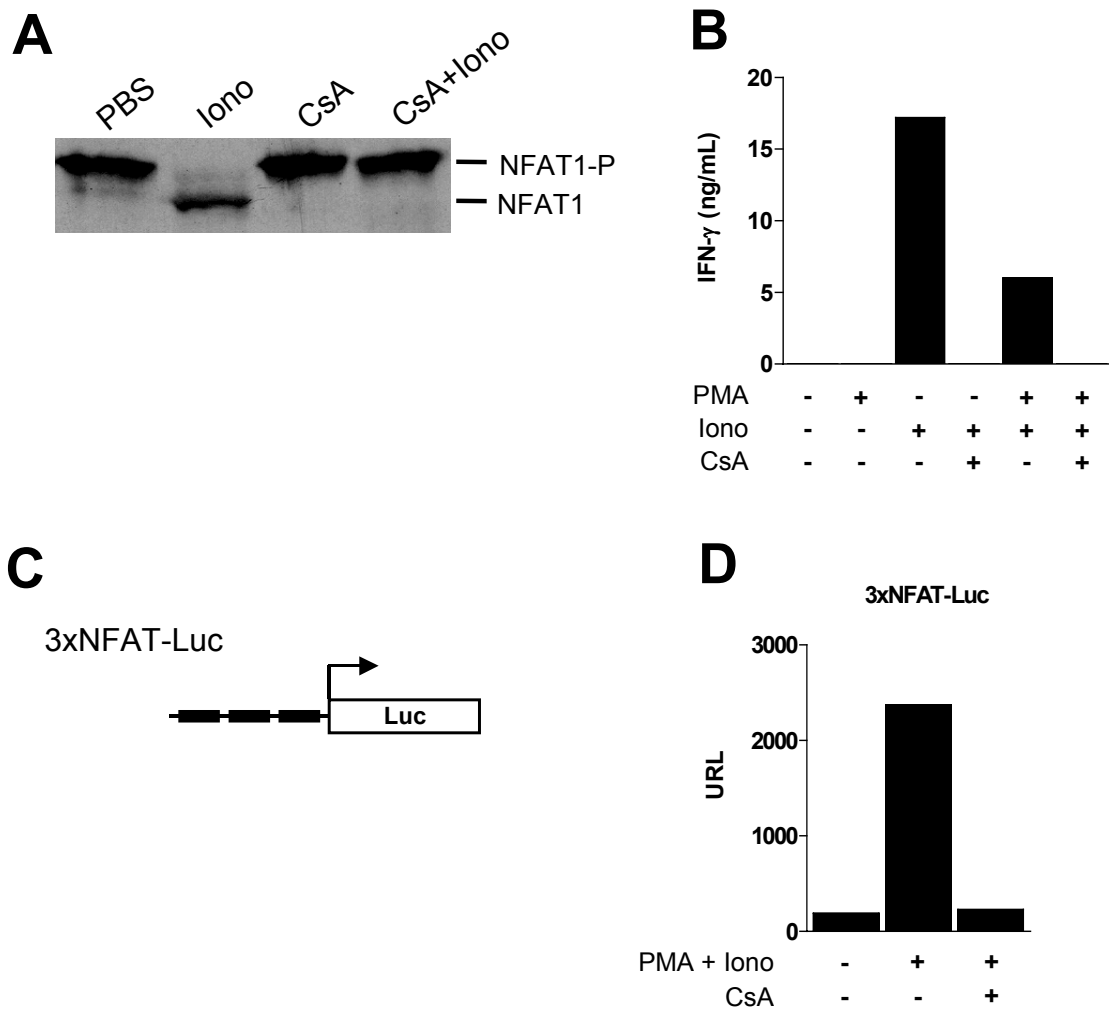


Figura 9: Influxo de Ca^{2+} induz a transativação e a produção de IFN- γ na linhagem celular CTLL-R8 $^{+}$. (A) Células CTLL-R8 $^{+}$ (2×10^6) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 15 minutos com Ionomicina (Iono; 1.0 μM). Em seguida, o extrato protéico total foi obtido e analisado por Western blot usando anticorpo policlonal anti-NFAT1 (anti-67.1). NFAT1, NFAT1 desfosforilado; NFAT1-P, NFAT1 fosforilado. (B) Células CTLL-R8 $^{+}$ (1×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 72 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (Iono; 1.0 μM). Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ por ELISA. (C) Esquema representativo do promotor murino de IL-2 fusionado ao gene repórter de luciferase (Luc) contendo 3 sítios de ligação para a proteína NFAT (3xNFAT-Luc). (D) Células CTLL-R8 $^{+}$ (2×10^6) foram eletroporadas com a construção 3xNFAT-Luc (5.0 μg). Após 24 horas, as células foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 16 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (Iono; 1.0 μM). Em seguida, as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi dosada através de luminômetro e expressa em unidades relativas de luz (URL). Em todos os experimentos, a adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μM) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Todos os resultados são representativos de 3 experimentos independentes.

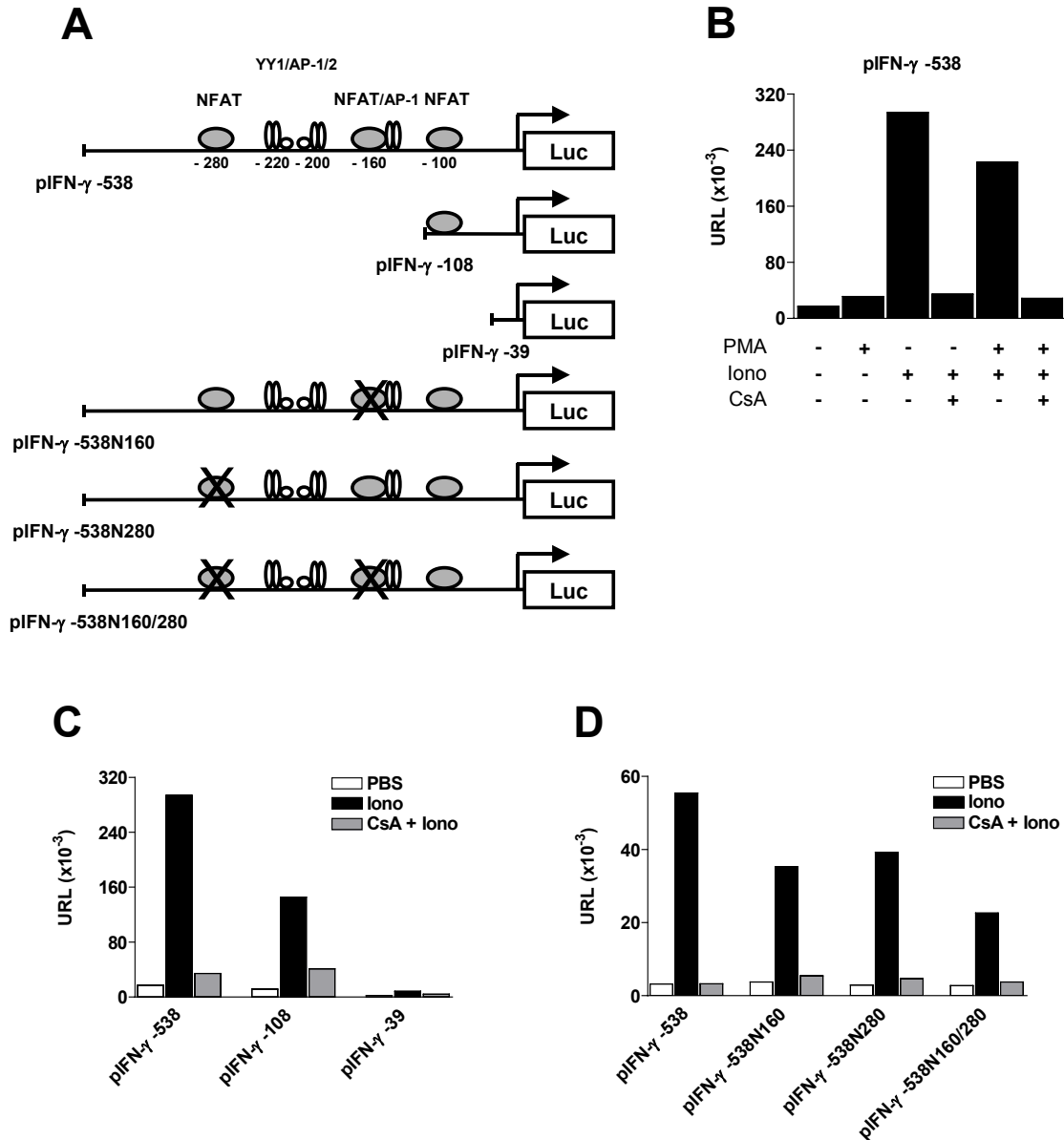


Figura 10: NFAT transativa o promotor murino de IFN- γ na linhagem celular CTLL-R8⁺.

(A) Esquema representativo das diferentes construções do promotor murino de IFN- γ fusionado ao gene repórter de luciferase (Luc) contendo sítios de ligação para a proteína NFAT: pIFN- γ -538 (promotor proximal de IFN- γ); pIFN- γ -108; pIFN- γ -39; pIFN- γ -538N160 (mutação pontual na posição -160); pIFN- γ -538N280 (mutação pontual na posição -280); pIFN- γ -538N160/280 (mutação dupla nas posições -160 e -280). Sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição estão indicados: NFAT, YY1, AP-1, AP-2. (B-D) Células CTLL-R8⁺ (2×10^6) foram eletroporadas com diferentes construções do promotor de IFN- γ (5.0 μ g) conforme indicado. Após 24 horas, as células foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 16 horas com PMA (10 nM) e/ou Ionomicina (Iono; 1.0 μ M). A adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Em seguida, as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi dosada através de luminômetro e expressa em unidades relativas de luz (URL). Os resultados são representativos de no mínimo 2 experimentos independentes.

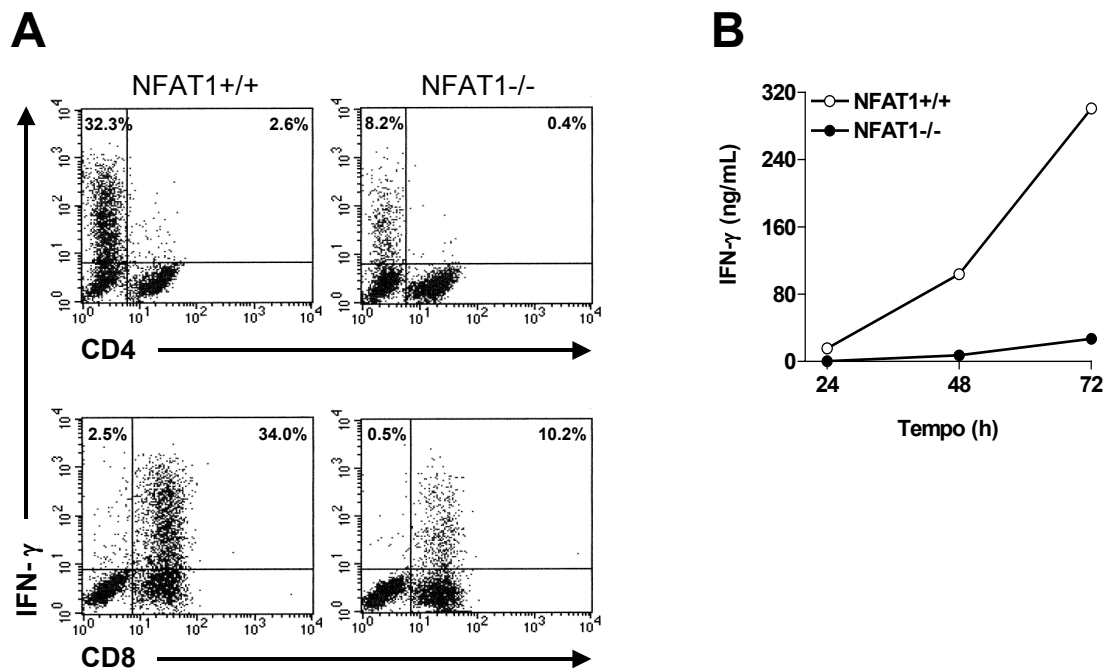


Figura 11: NFAT1 é essencial para a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺. (A) Linfócitos T CD3⁺ foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. As células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* por 72 horas com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g/mL}$) e marcadas tanto para moléculas de superfície (anti-CD4-FITC ou anti-CD8-FITC) quanto para citocina intracelular (IFN- γ -PE). Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante. (B) Linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} e as células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g/mL}$) durante os tempos indicados. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ por ELISA. Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

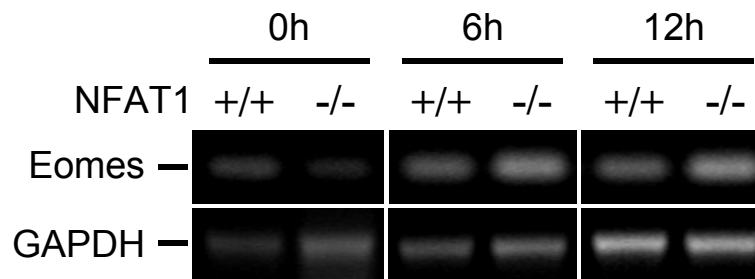


Figura 12: Expressão de Eomesodermina é semelhante entre linfócitos T CD8⁺ de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. Linfócitos T CD8⁺ foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} e as células (2×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante os tempos indicados. Em seguida, o RNA total foi extraído e a expressão de Eomesodermina (Eomes) foi detectada por RT-PCR. A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão do gene constitutivo de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 2 experimentos independentes.

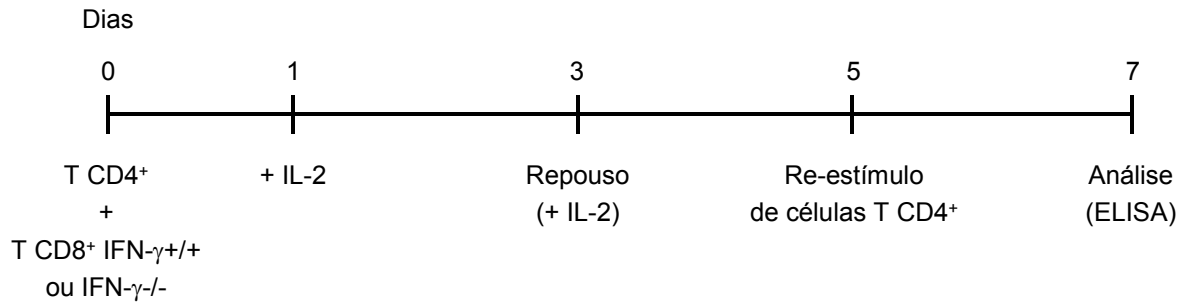
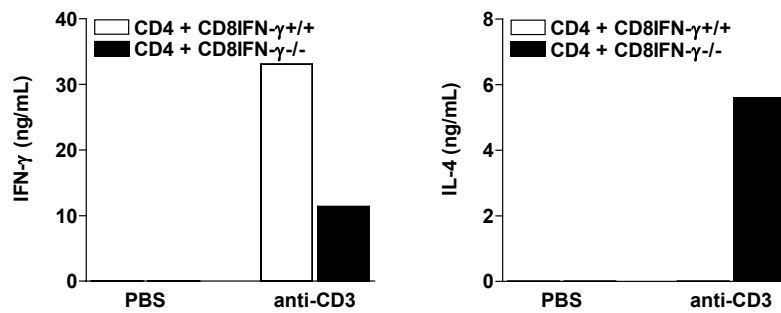
A**B**

Figura 13: Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ induz a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o tipo Th1. (A) Esquema representativo do protocolo de diferenciação de linfócitos T CD4⁺ na presença de linfócitos T CD8⁺. (B) Linfócitos T CD4⁺ (3×10^6 células/poço) foram isolados de camundongos C57Bl/6 e estimulados *in vitro* por 72 horas com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) juntamente com linfócitos T CD8⁺ (1.5×10^6 células/poço) de animais normais (IFN- γ ^{+/+}) ou deficientes (IFN- γ ^{-/-}) para IFN- γ . No final de 3 dias, as células foram cultivadas na ausência de estímulos e na presença de IL-2 (20 U/mL) por 48 horas (Repouso). Em seguida, os linfócitos T CD4⁺ foram novamente purificados e cultivados sem estímulos (PBS) ou estimulados *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ e IL-4 por ELISA. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 2 experimentos independentes.

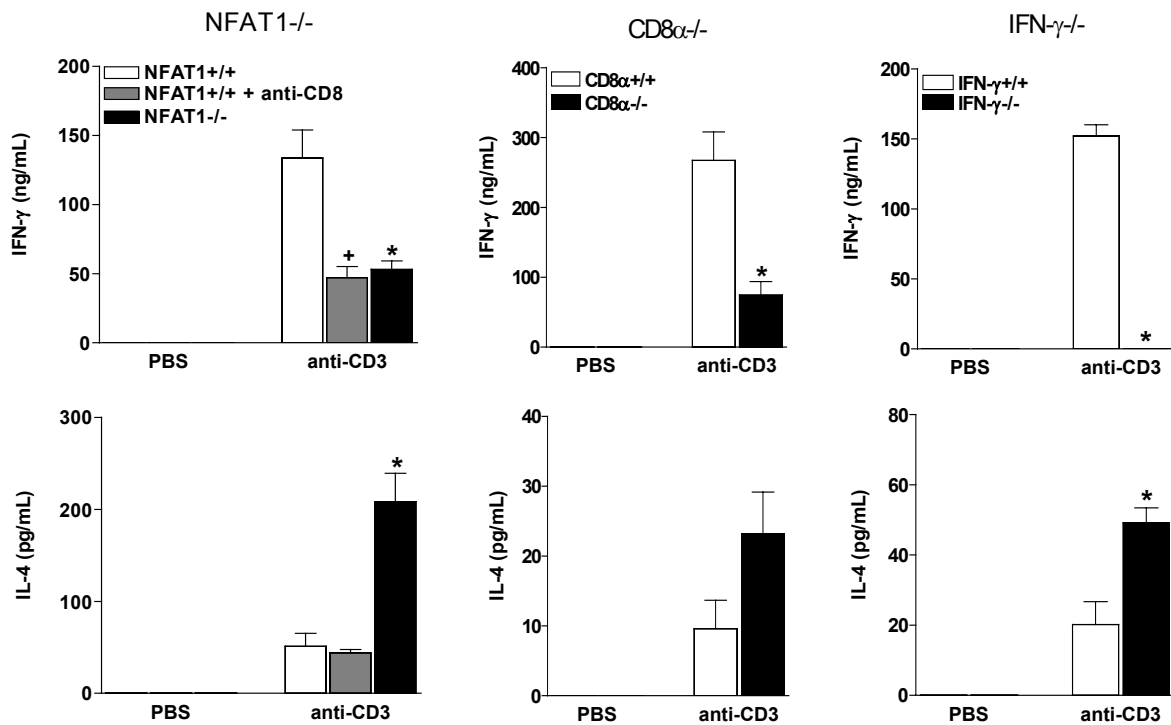


Figura 15: Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ regula o padrão de citocinas durante a resposta alérgica *in vivo*. Diferentes linhagens de camundongos (NFAT1, CD8 α e IFN- γ) foram sensibilizadas por via subcutânea na pata com ovalbumina (OVA; 200 μ g) na presença de adjuvante completo de Freund (CFA). Após 14 dias, os animais foram desafiados na pleura com PBS ou OVA (12 μ g). Em 24 horas, os linfonodos drenantes da pata (poplíteos e inguinais) foram isolados, e as células (2×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 48 horas com anti-CD3 (1.0 μ g/mL). Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IFN- γ e IL-4 por ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (n = 5) e são representativos de 2 experimentos independentes. *, estatisticamente diferente de animais selvagens desafiados com OVA (p < 0.05); +, estatisticamente diferente de animais selvagens deletados de linfócitos T CD8⁺ (NFAT1+/+ + anti-CD8) e desafiados com OVA (p < 0.05).

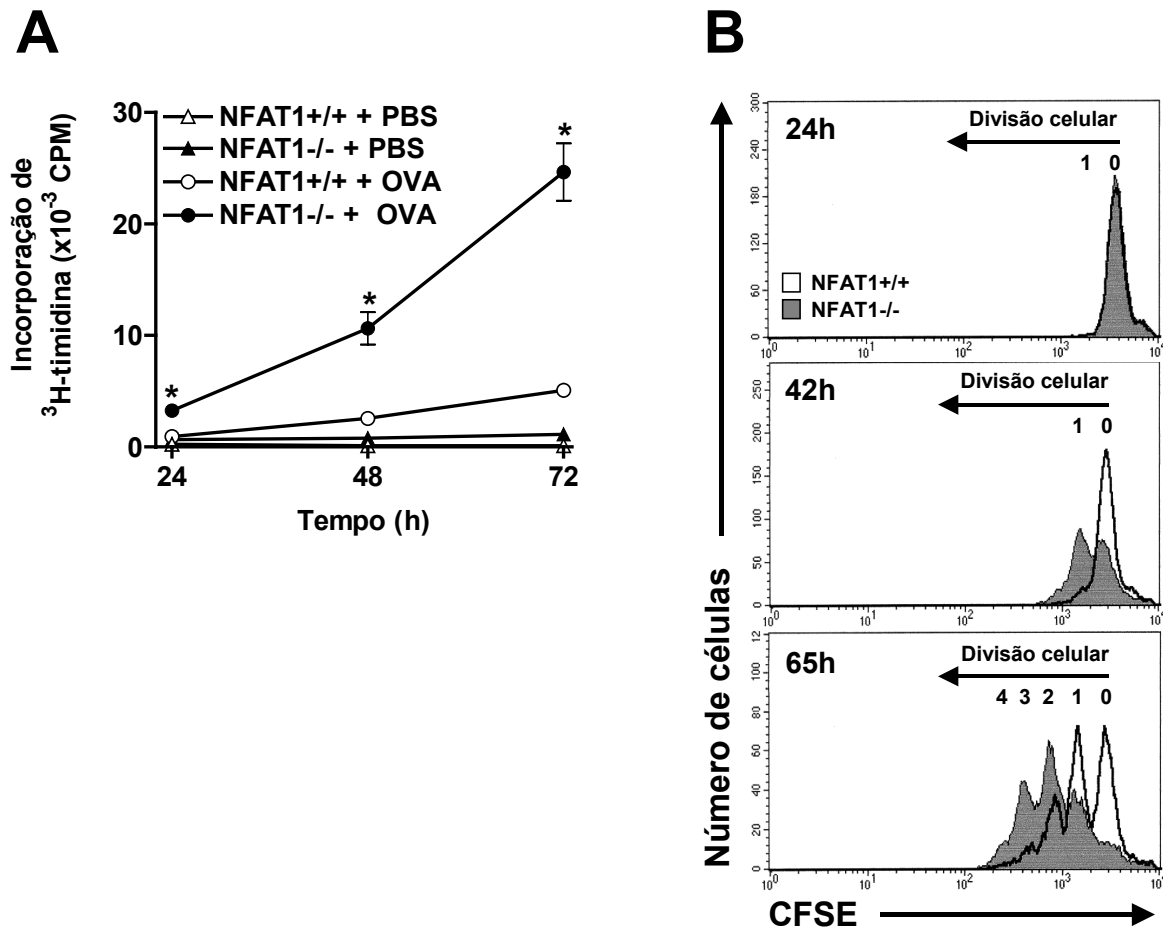


Figura 16: Linfócitos NFAT1^{-/-} hiperproliferam durante o desafio *in vitro*. Camundongos selvagens ou deficientes para NFAT1 foram sensibilizados por via subcutânea na pata com ovalbumina (OVA; 200 µg) na presença de adjuvante completo de Freund (CFA). Após 14 dias, os linfonodos drenantes (poplíteos e inguinais) foram isolados e as células cultivadas *in vitro* conforme descrito a seguir. (A) Linfonodos totais (2×10^5 células/poço) foram cultivados sem estímulos (PBS) ou estimulados *in vitro* com OVA (0.5 mg/mL) na presença de ³H-timidina (5.0 µCi/mL) por 12 horas e recolhidos nos tempos indicados. Em seguida, a incorporação de ³H-timidina foi dosada através de um contador de partículas β e expressa em contagens por minuto (CPM). Os resultados estão expressos em média ± EPM (n = 3) e são representativos de 3 experimentos independentes. *, estatisticamente diferente de animais selvagens (NFAT1^{+/+}) desafiados com OVA (p < 0.05). (B) Linfonodos totais (1×10^7 /mL) foram marcados com CFSE (5.0 µM) por 15 minutos a 37°C. As células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 µg/mL) e analisadas por citometria de fluxo durante os tempos indicados. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

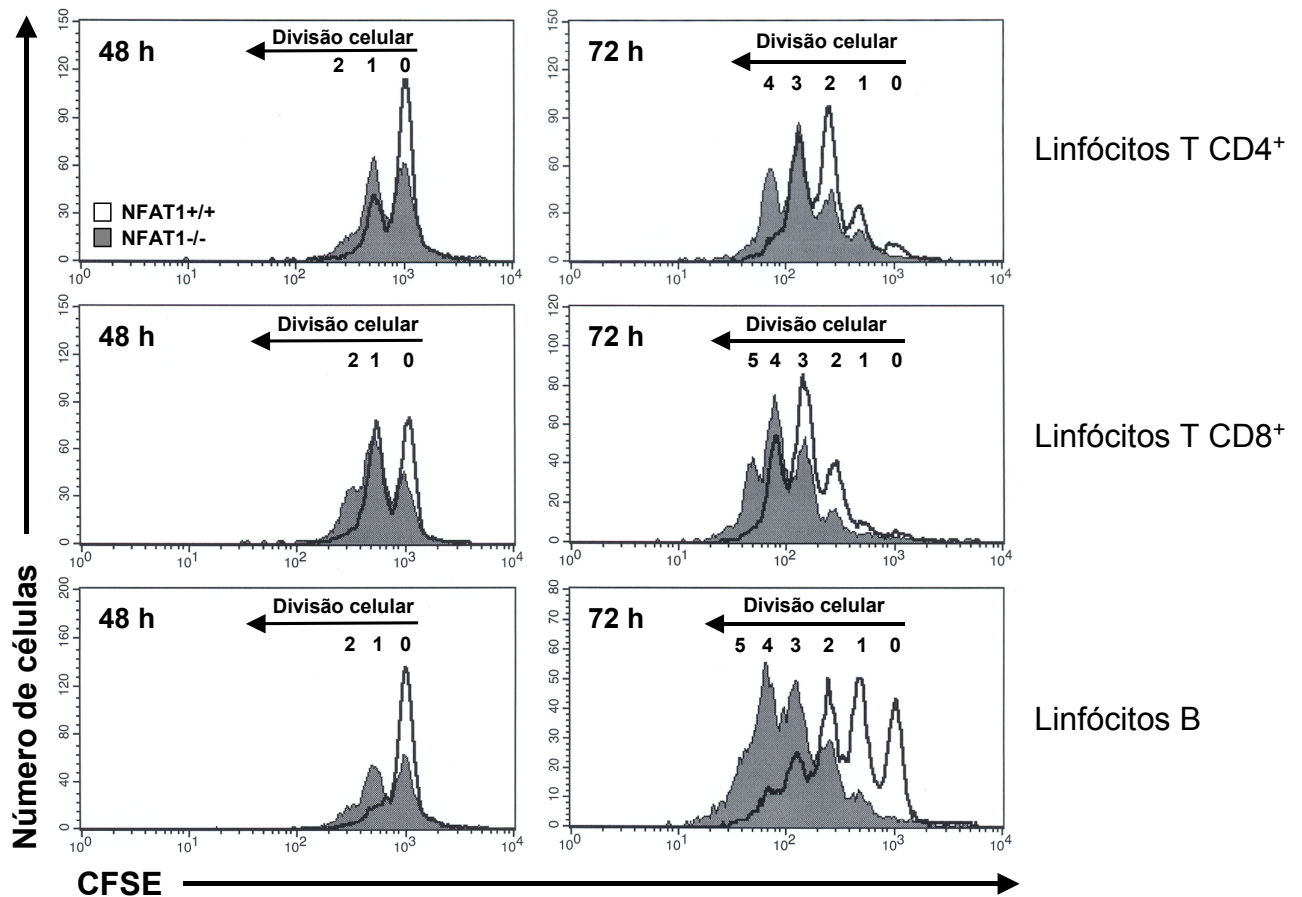


Figura 17: Hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-} não está restrita a um compartimento celular específico. Camundongos selvagens ou deficientes para NFAT1 foram sensibilizados por via subcutânea na pata com ovalbumina (OVA; 200 μ g) na presença de adjuvante completo de Freund (CFA). Após 14 dias, os linfonodos drenantes (poplíteos e inguinais) foram isolados e as células (1×10^7 /mL) foram marcadas com CFSE (5.0 μ M) por 15 minutos a 37°C. As células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 μ g/mL) durante os tempos indicados. Após o tempo de estímulo, as células foram marcadas para as moléculas de superfície com anticorpos anti-CD4-PE (painel superior), anti-CD8-PE (painel mediano) ou anti-B220-PE (painel inferior) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

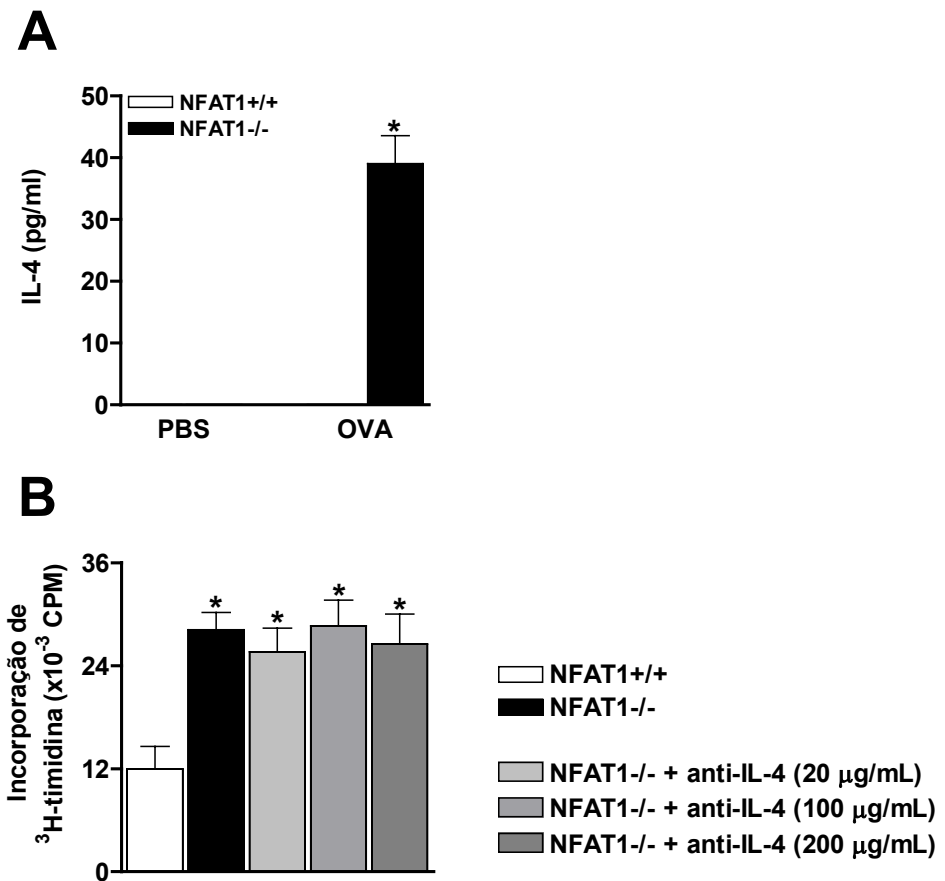


Figura 18: Hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-} independente da alta produção de IL-4.

Camundongos selvagens ou deficientes para NFAT1 foram sensibilizados por via subcutânea na pata com ovalbumina (OVA; 200 µg) na presença de adjuvante completo de Freund (CFA). Após 14 dias, os linfonodos drenantes (poplíteos e inguinais) foram isolados e as células foram cultivadas *in vitro* conforme descrito a seguir. (A) As células (2×10^6 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* com OVA (0.5 mg/mL) por 72 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos livres de células e testados para a presença de IL-4 por ELISA. (B) As células (2×10^5 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com OVA (0.5 mg/mL) na ausência ou na presença de anticorpo anti-IL-4 (11B11; 20, 100 ou 200 µg/mL). As células foram cultivadas na presença de ³H-timidina (5.0 µCi/mL) por 12 horas e recolhidas após 72 horas de estímulo. Em seguida, a incorporação de ³H-timidina foi dosada através de um contador de partículas β e expressa em contagens por minuto (CPM). Os resultados estão expressos em média ± EPM (n = 3) e são representativos de 3 experimentos independentes. *, estatisticamente diferente de animais selvagens (NFAT1^{+/+}) desafiados com OVA (p < 0.05).

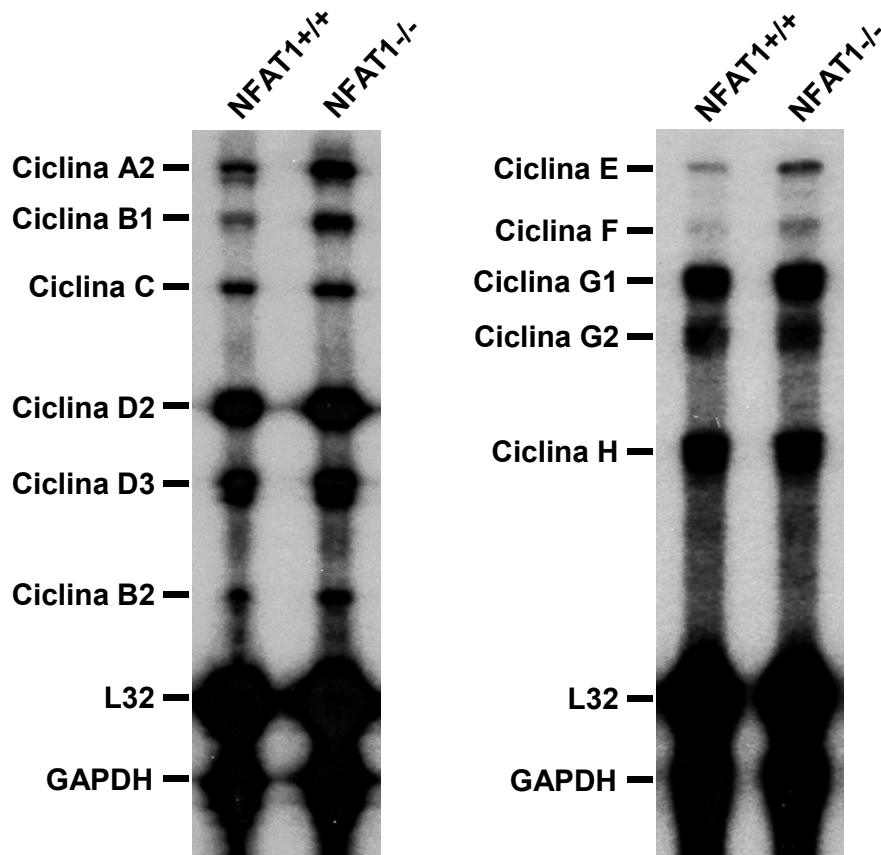


Figura 19: Linfócitos NFAT1^{-/-} superexpressam diferentes genes de ciclinas. Camundongos selvagens ou deficientes para NFAT1 foram sensibilizados por via subcutânea na pata com ovalbumina (OVA; 200 µg) na presença de adjuvante completo de Freund (CFA). Após 14 dias, os linfonodos drenantes (poplíteos e inguinais) foram isolados e as células (2×10^7 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com OVA (0.5 mg/mL) por 24 horas. Em seguida, o RNA total foi extraído e a expressão dos genes de ciclinas foi avaliada através do ensaio de proteção a RNase (RPA). A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão dos genes constitutivos ribossomal L32 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

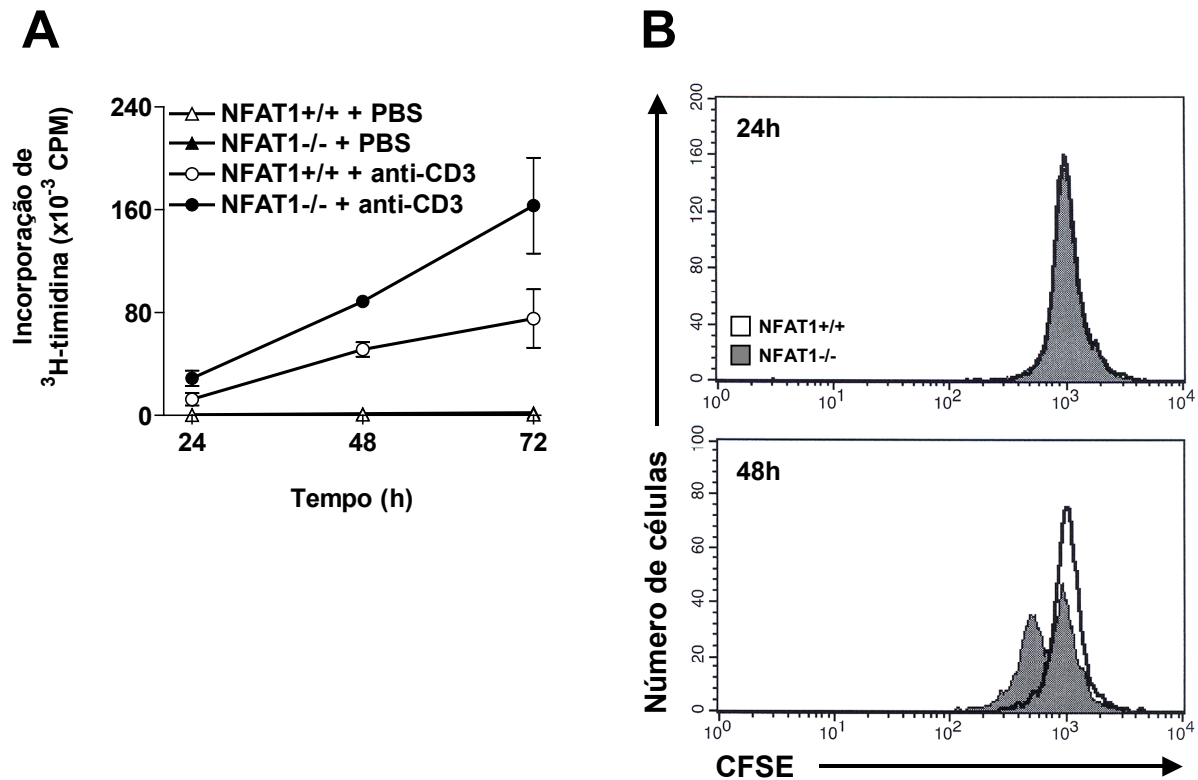


Figura 20: Linfócitos NFAT1^{-/-} hiperproliferam durante o estímulo primário *in vitro*. Linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados de animais selvagens ou deficientes para NFAT1 e as células foram cultivadas *in vitro* conforme descrito a seguir. (A) As células (2×10^5 células/poço) foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante os tempos indicados. As células foram cultivadas na presença de ³H-timidina (5.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) por 12 horas e recolhidas nos tempos indicados. Em seguida, a incorporação de ³H-timidina foi dosada através de um contador de partículas β e expressa em contagens por minuto (CPM). (B) As células ($1 \times 10^7/\text{mL}$) foram marcadas com CFSE (5.0 μM) por 15 minutos a 37°C. Em seguida, as células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisadas por citometria de fluxo durante os tempos indicados. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

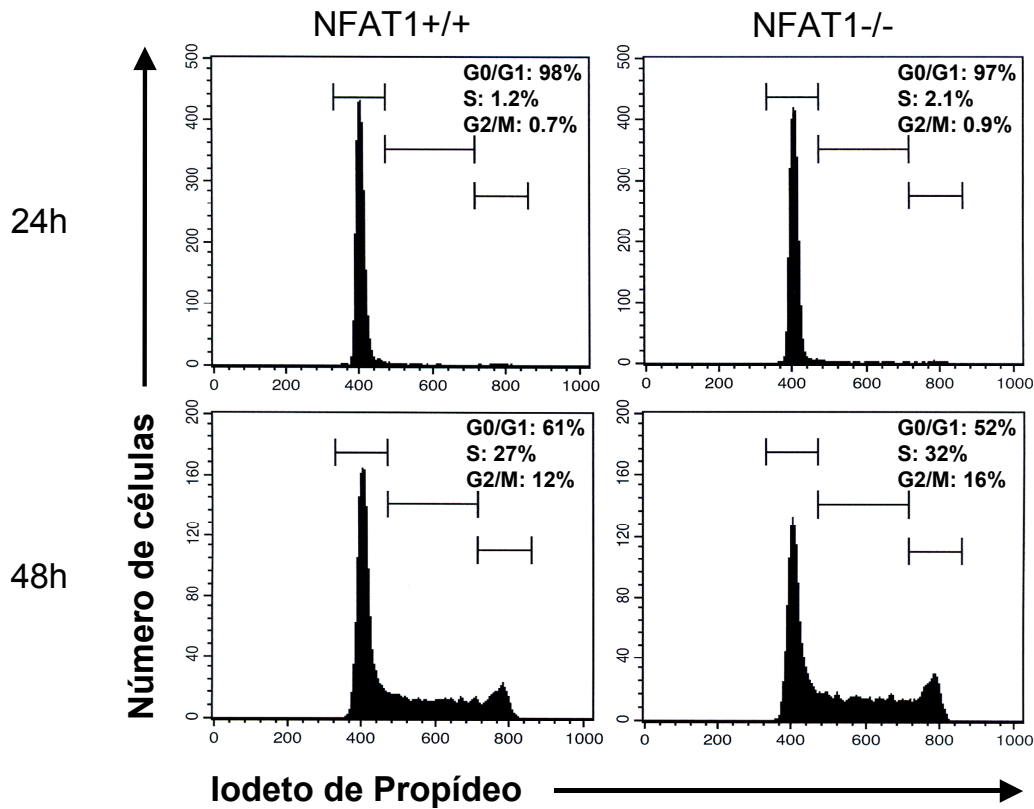


Figura 21: Enriquecimento de linfócitos NFAT1^{-/-} em fases S e G₂/M do ciclo celular após o estímulo primário *in vitro*. Linfonodos totais (inguinais, braquiais, axilares e cervicais superficiais) foram isolados de animais selvagens ou deficientes para NFAT1. As células (1×10^6 células/poço) foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante os tempos indicados. Em seguida, as células foram marcadas com Iodeto de Propídeo por 15 minutos a 4°C, e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

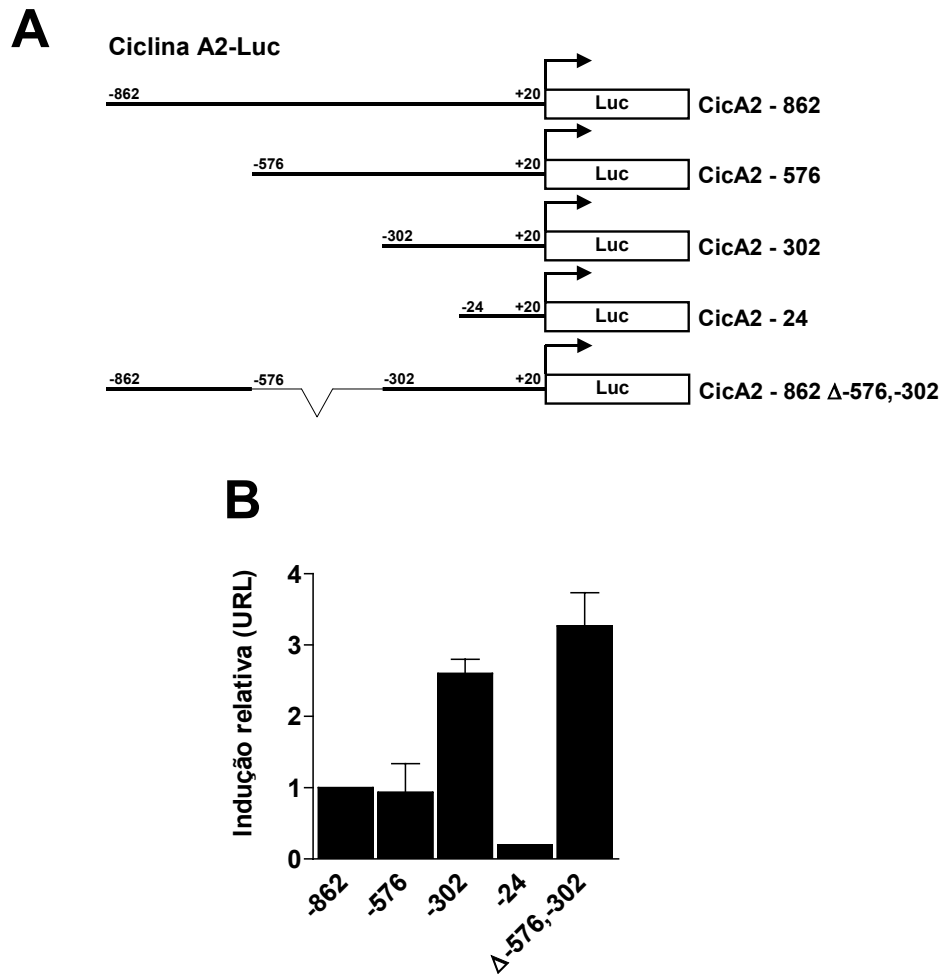


Figura 22: Identificação de uma região repressora no promotor murino de ciclina A2. (A) Esquema representativo das diferentes construções do promotor murino de ciclina A2 (CicA2), fusionado ao gene repórter de luciferase (Luc): CicA2 -862; CicA2 -576; CicA2 -302; CicA2 -24; CicA2 -862 Δ -576,-302 (deleção entre os sítios -576 e -302). (B) Células Jurkat (3×10^6) foram eletroporadas com diferentes construções do promotor de ciclina A2 ($3.0 \mu\text{g}$) conforme indicado. Após 24 horas, as células foram estimuladas *in vitro* por 16 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (Iono; $1.0 \mu\text{M}$). Em seguida, as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi dosada através de luminômetro e expressa em unidades relativas de luz (URL). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.



Figura 23: Localização de um sítio de ligação para NFAT na região repressora do promotor murino de ciclina A2. Uma sequência genômica parcial do promotor murino de ciclina A2 (entre os sítios -576 e -302) foi alinhada com sequências genômicas dos promotores de ciclina A2 de outros organismos através do programa ClustalW versão 1.82. Um sítio de ligação para o fator de transcrição NFAT (TTTCC/GGAAA) foi identificado na posição -460 do promotor murino através do programa MatInspector versão 5.0. Os sítios que apresentam similaridade de 66% (ou maior) entre os organismos foram marcados por caixas pretas. *Mm*, *M. musculus*; *Rn*, *R. norvegicus*; *Hs*, *H. sapiens*.

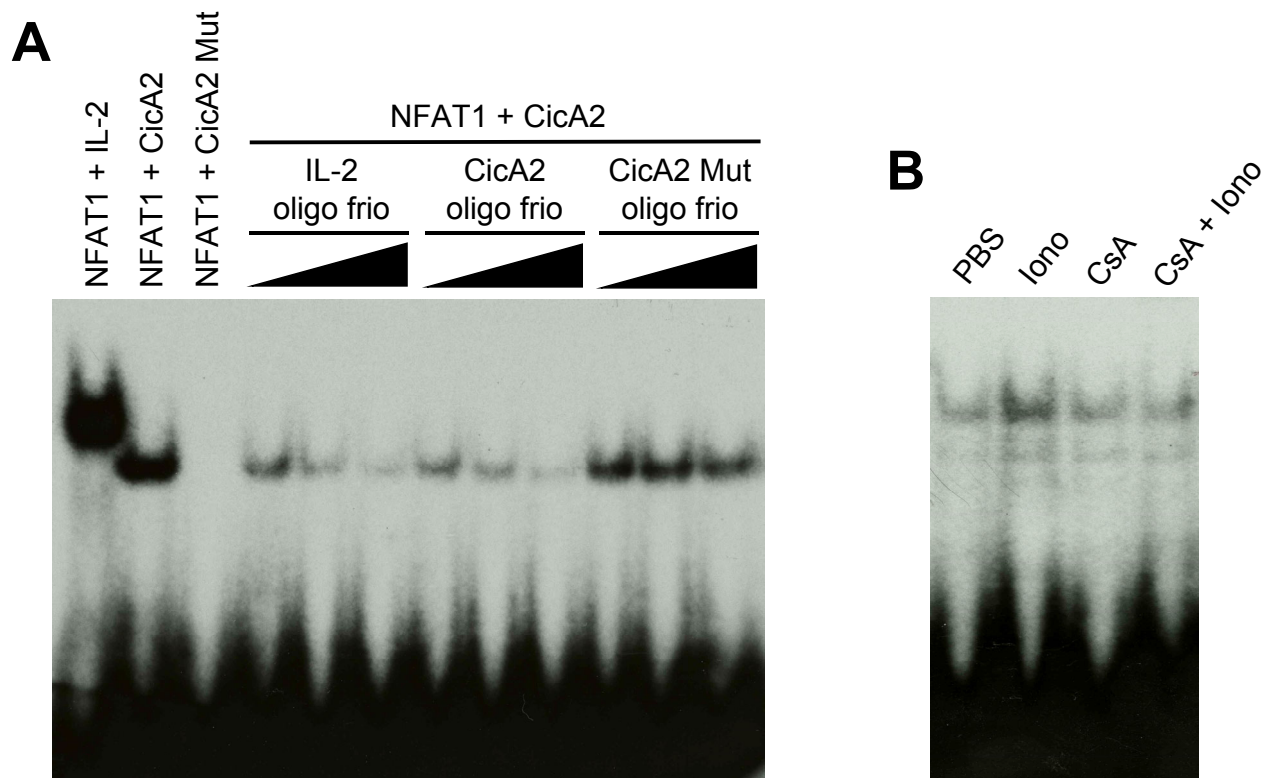


Figura 24: NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor murino de ciclina A2 *in vitro*. (A) O domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína NFAT1 foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente com oligonucleotídeos marcados radioativamente (IL-2; CicA2; CicA2 Mut). Os complexos DNA-proteína foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 4% e visualizados por exposição a autoradiograma. Ensaio de competição foram realizados com oligonucleotídeos não marcados radioativamente (oligo frio) conforme indicado. (B) Extratos nucleares protéicos foram obtidos a partir de células Jurkat (2×10^7) cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* por 1 hora com Ionomicina (Iono; $1.0 \mu\text{M}$). A adição de Ciclosporina A (CsA; $1.0 \mu\text{M}$) ocorreu 15 minutos antes do tratamento com Ionomicina. Em seguida, os extratos protéicos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente com o oligonucleotídeo do promotor de ciclina A2 (CicA2) marcado radioativamente. Os complexos DNA-proteína foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 4% e visualizados por exposição a autoradiograma. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes.

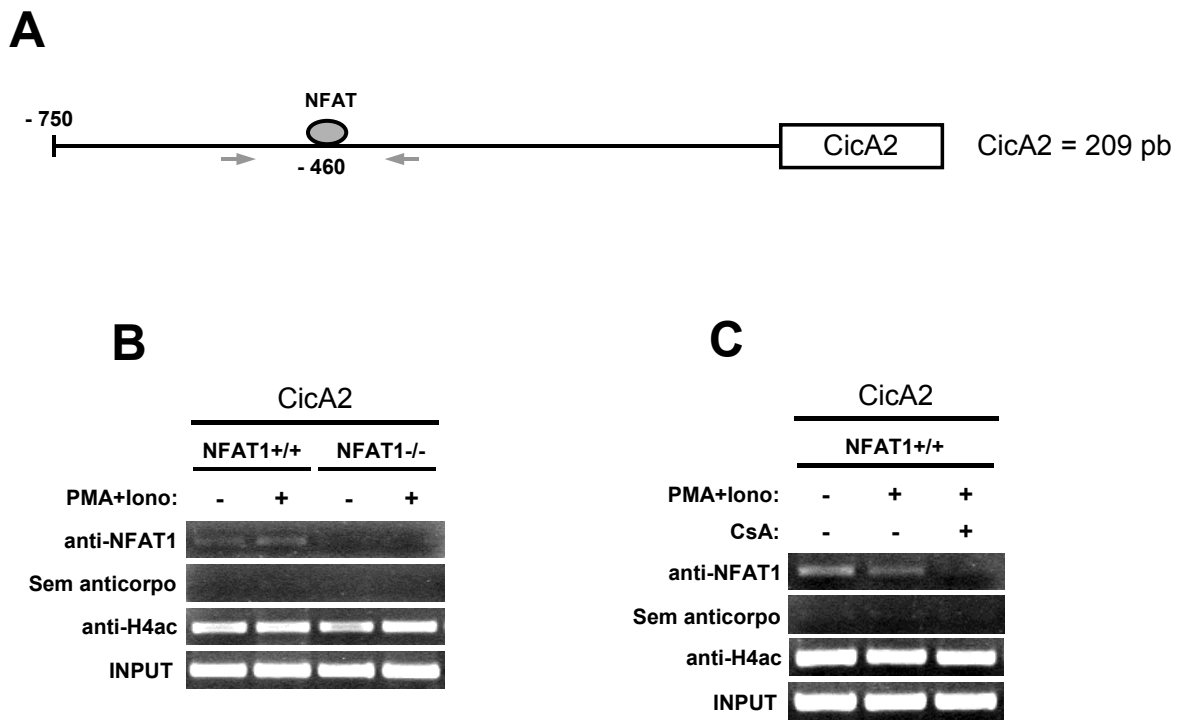


Figura 25: NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor murino de ciclina A2 *in vivo*. (A) Esquema representativo do par de oligonucleotídeos (setas) englobando o sítio de ligação para NFAT no promotor murino de ciclina A2. O tamanho do produto de PCR está indicado: CicA2 209 pb. (B) Linfócitos T CD4⁺ foram isolados de camundongos NFAT1+/+ e NFAT1-/- e estimulados *in vitro* por 7 dias com anti-CD3 (0.25 µg/mL). Após 1 semana, as células (6x10⁷) foram cultivadas sem estímulos ou tratadas *in vitro* por 4 horas conforme indicado: PMA (10 nM); Ionomicina (Iono; 1.0 µM); Ciclosporina A (CsA; 1.0 µM). Em seguida, a cromatina foi isolada, fragmentada e imunoprecipitada através de anticorpos anti-NFAT1 (anti-67.1 e anti-T2B1) ou anti-histona H4 acetilada (anti-H4ac). Antes da imunoprecipitação, a cromatina isolada foi referida como controle positivo (INPUT). O controle negativo da imunoprecipitação foi realizado na ausência de quaisquer anticorpos (Sem anticorpo). A cromatina imunoprecipitada foi usada como molde para a reação de PCR realizada com o par de oligonucleotídeos indicado. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL) através de transiluminador. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 2 animais e são representativos de 2 experimentos independentes.

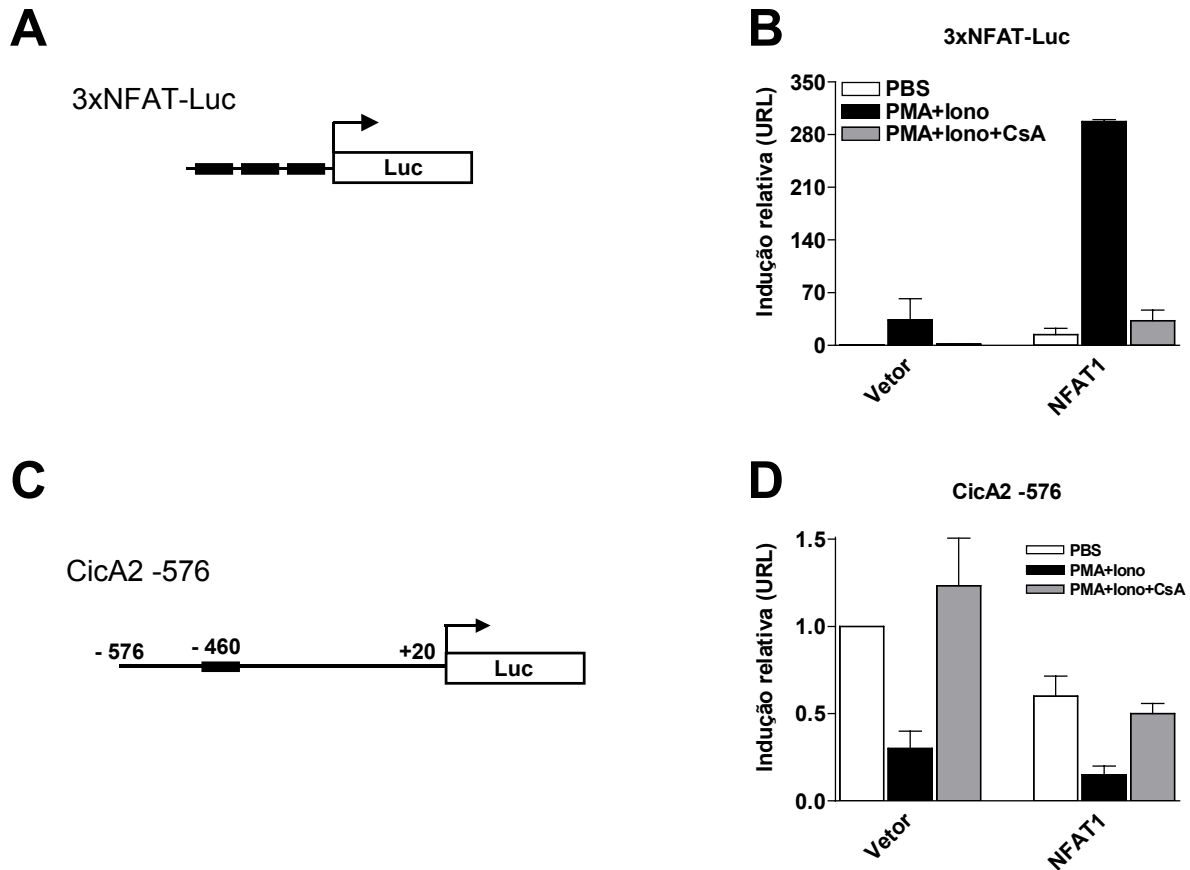


Figura 26: NFAT1 é um repressor da expressão do promotor murino de ciclina A2. (A) Esquema representativo do promotor murino de IL-2 fusionado ao gene repórter de luciferase (Luc) contendo 3 sítios de ligação para a proteína NFAT (3xNFAT-Luc). (B) Células Jurkat (3×10^6) foram co-transfectadas com a construção 3xNFAT-Luc (5.0 μ g) e um vetor de expressão controle (Vetor) ou um vetor de expressão para NFAT1 (NFAT1) (30 μ g). (C) Esquema representativo do promotor murino de ciclina A2 fusionado ao gene repórter de luciferase (Luc) contendo 1 sítio de ligação para a proteína NFAT na posição -460 (CicA2 -576). (D) Células Jurkat (3×10^6) foram co-transfectadas com a construção CicA2 -576 (5.0 μ g) e um vetor de expressão controle (Vetor) ou um vetor de expressão para NFAT1 (NFAT1) (30 μ g). (B e D) Passadas 24 horas da transfecção, as células foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 16 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (Iono; 1.0 μ M). A adição de Ciclosporina A (CsA; 1.0 μ M) ocorreu 15 minutos antes de qualquer outro tratamento. Em seguida, as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi dosada através de luminômetro e expressa em unidades relativas de luz (URL). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

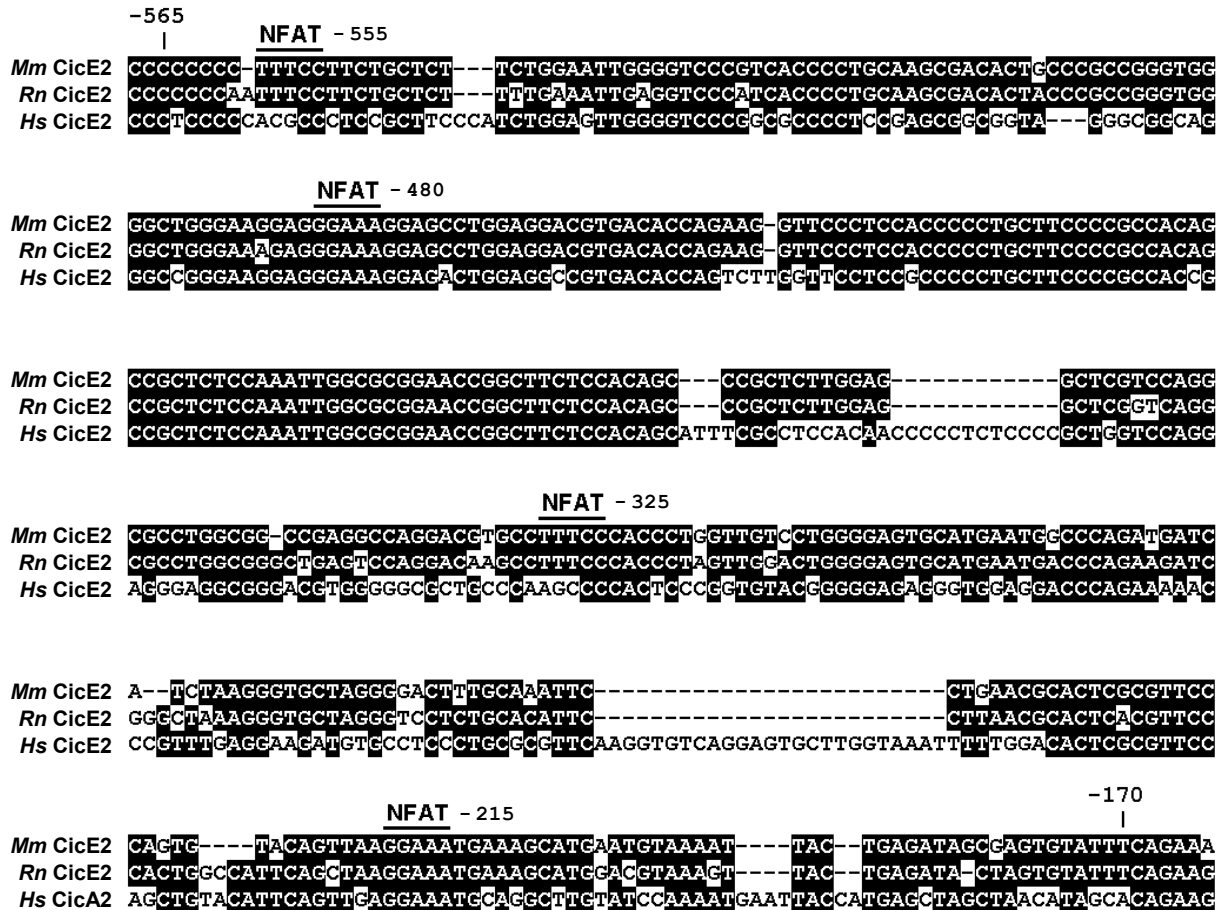


Figura 27: Localização de quatro sítios de ligação para NFAT em uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2. Uma sequência genômica parcial do promotor murino de ciclina E2 (entre os sítios -565 e -170) foi alinhada com sequências genômicas dos promotores de ciclina E2 de outros organismos através do programa ClustalW versão 1.82. Quatro sítios de ligação para o fator de transcrição NFAT (GGAAA ou TTTCC) foram identificados nas posições -215, -325, -480 e -555 em uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2 através do programa MatInspector versão 5.0. Os sítios que apresentam similaridade de 66% (ou maior) entre os organismos foram marcados por caixas pretas. O início de tradução do gene de ciclina E2 foi considerado como o sítio +1. *Mm*, *M. musculus*; *Rn*, *R. norvegicus*; *Hs*, *H. sapiens*.

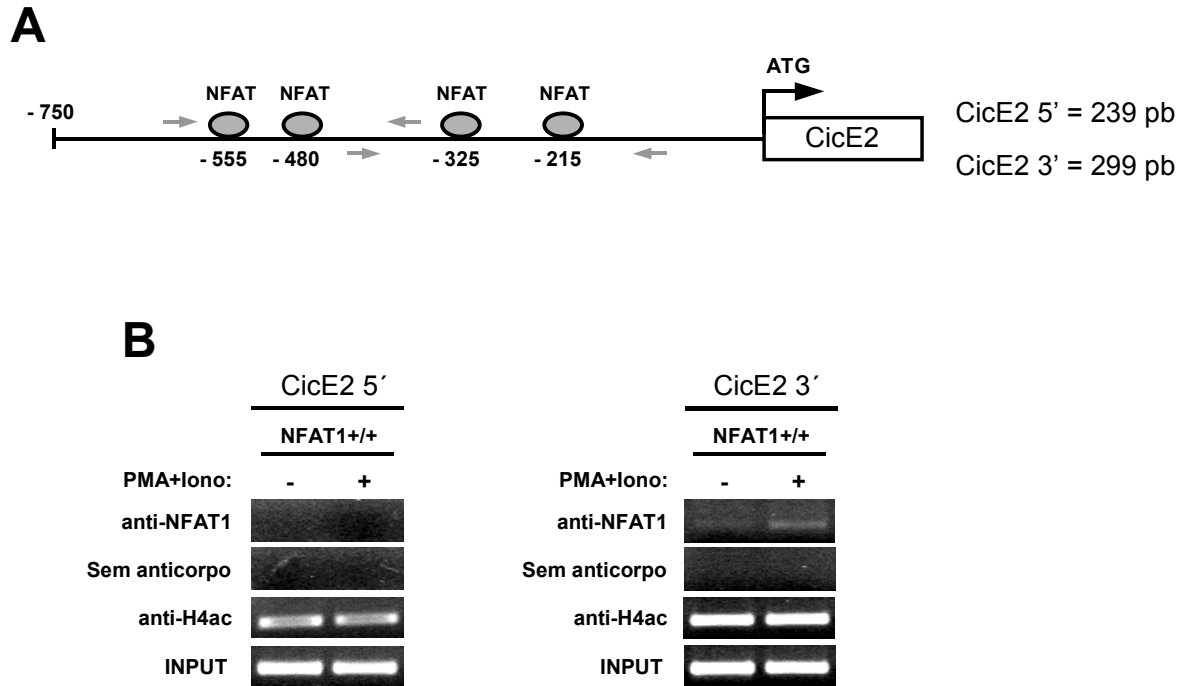


Figura 28: NFAT1 é capaz de se ligar a uma região regulatória do promotor murino de ciclina E2 *in vivo*. (A) Esquema representativo dos pares de oligonucleotídeos (setas) englobando os sítios de ligação para NFAT na região regulatória do promotor murino de ciclina E2. Os tamanhos dos produtos de PCR estão indicados: CicE2 5' 239 pb (sítios distais); CicE2 3' 299 pb (sítios proximais). O início de tradução do gene de ciclina E2 (ATG) foi considerado como o sítio +1. (B) Linfócitos T CD4⁺ foram isolados de camundongos NFAT1+/+ e estimulados *in vitro* por 7 dias com anti-CD3 (0.25 µg/mL). Após 1 semana, as células (6x10⁷) foram cultivadas sem estímulos ou estimuladas *in vitro* por 4 horas com PMA (10 nM) e Ionomicina (Iono; 1.0 µM). Em seguida, a cromatina foi isolada, fragmentada e imunoprecipitada através de anticorpos anti-NFAT1 (anti-67.1 e anti-T2B1) ou anti-histona H4 acetilada (anti-H4ac). Antes da imunoprecipitação, a cromatina isolada foi referida como controle positivo (INPUT). O controle negativo da imunoprecipitação foi realizado na ausência de quaisquer anticorpos (Sem anticorpo). A cromatina imunoprecipitada foi usada como molde para a reação de PCR realizada com os pares de oligonucleotídeos indicados. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo (0.5 µg/mL) através de transiluminador. Os resultados foram obtidos a partir de um conjunto de 2 animais e são representativos de 2 experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

Os fatores de transcrição da família NFAT participam de diversos fenômenos biológicos celulares. Neste trabalho, foi demonstrado que a proteína NFAT1 é capaz de controlar a diferenciação e a proliferação de linfócitos. Mais especificamente, que o NFAT1 induz a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ e reprime a expressão de ciclina A2 em linfócitos. Por ser um fator de transcrição, o NFAT1 regula a expressão destes genes durante a etapa de transcrição gênica, onde pode atuar como ativador ou repressor transcricional. De maneira geral, estes mecanismos de regulação se refletem tanto na geração da resposta imune (diferenciação) quanto na progressão do ciclo celular (proliferação). Nesta seção, serão discutidos alguns dos mecanismos e efeitos biológicos relacionados com a participação de NFAT1 nos processos de diferenciação e proliferação linfocitária.

Diversos fatores de transcrição são capazes de regular a expressão de IFN- γ em linfócitos, como NF κ B, NFAT, AP-1, YY1, STAT4 e T-bet (Sica *et al.*, 1997; Sweetser *et al.*, 1998; Carter e Murphy, 1999; Szabo *et al.*, 2002). A maior parte deles foi caracterizada em linhagens celulares ou em linfócitos T CD4⁺ e pouco se sabe sobre sua influência em linfócitos T CD8⁺. Inicialmente, efeitos parciais na expressão de IFN- γ foram atribuídos às proteínas NF κ B e STAT4 (Sica *et al.*, 1997; Carter e Murphy, 1999). A identificação de T-bet, o regulador central do fenótipo Th1, demonstrou que a produção de IFN- γ é totalmente dependente deste fator em células T CD4⁺ (Szabo *et al.*, 2000 e 2002). Contudo, linfócitos T CD8⁺ produzem níveis normais de IFN- γ na ausência desta proteína, indicando que T-bet não regula a produção de IFN- γ nestas células (Szabo *et al.*, 2002). Recentemente, o fator de transcrição Eomesodermina se mostrou responsável pela produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ ativados, mas sua expressão em células T CD8⁺ indiferenciadas (“naive”) é relativamente baixa (Pearce *et al.*, 2003). Ainda assim, todos estes fatores de transcrição são ativados por vias de sinalização de citocinas e

portanto dependem exclusivamente do microambiente em que as células se encontram, e não do estímulo do complexo TCR (primeiro sinal). A ativação de T-bet e Eomesodermina é dependente de IFN- γ , ao passo que a ativação de STAT4 é dependente de IL-12 (Szabo *et al.*, 2003; Pearce *et al.*, 2003). Por outro lado, os fatores de transcrição da família NFAT são rapidamente ativados após a estimulação do TCR e representam fortes candidatos à regulação inicial de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ (Rao *et al.*, 1997; Macián, 2005).

De fato, o promotor de IFN- γ apresenta 3 sítios de ligação para NFAT em sua região proximal. A integridade destes sítios é necessária para a produção de IFN- γ em linhagens celulares e linfócitos T (Sica *et al.*, 1997; Sweetser *et al.*, 1998). A ausência da proteína NFAT1 compromete a produção de IFN- γ em células T CD4⁺ (Kiani *et al.*, 2001). Além destes 3 sítios, uma região regulatória distal do promotor de IFN- γ também foi identificada como alvo de ligação para NFAT1 e T-bet em células T CD4⁺ (Lee *et al.*, 2004). Contudo, nenhuma evidência havia indicado até o momento a importância de proteínas NFAT na produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺. A simples indução do influxo de Ca²⁺ foi suficiente para ativar NFAT1 e estimular a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ (Figuras 7-9). Além disso, linfócitos T CD8⁺ deficientes para NFAT1 não produzem IFN- γ quando ativados através do TCR (Figura 11). Desta forma, pode-se concluir que o fator de transcrição NFAT1 é essencial para a produção de IFN- γ durante o estímulo primário de linfócitos T CD8⁺ indiferenciados (“naive”). O IFN- γ é uma citocina fundamental durante a geração de uma resposta imune eficiente e pode atuar na resolução de doenças alérgicas, no controle de infecções causadas por parasitas intracelulares e na formação de uma resposta imune anti-tumoral (Kemeny, 1998; Harty *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2002).

O IFN- γ é imprescindível para a imunidade adaptativa, principalmente como modulador da resposta Th1/Th2 no momento do reconhecimento antigênico (Szabo *et al.*, 2003). Esta citocina é capaz de induzir a produção de IL-12 em células APC (Hayes *et al.*, 1995; Ma *et al.*,

1996) e a expressão do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) em células T CD4⁺, tornando-as sensíveis a IL-12 produzida pela APC (Mullen *et al.*, 2001; Afkarian *et al.*, 2002). Estes dois mecanismos são cruciais para o desenvolvimento do fenótipo Th1 (Seder *et al.*, 1993; Bradley *et al.*, 1996; Wenner *et al.*, 1996). Algumas células mielóides, como as células dendríticas e os macrófagos, representam fontes primárias de IFN- γ e IL-12 durante a imunidade inata (Boehm *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2003). Além disso, células NK também podem funcionar como fontes de IFN- γ durante a diferenciação Th1 (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). No estímulo primário de células T, linfócitos T CD8⁺ representam a principal fonte de IFN- γ , mas não células T CD4⁺ (Figuras 6E e 11A). Esta produção de IFN- γ por células T CD8⁺ solidifica o desenvolvimento do fenótipo Th1 de células T CD4⁺ (Figuras 13 e 15). De fato, foi demonstrado que a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ induz diretamente a polarização Th1 e também a produção de IL-12 em APCs (Das *et al.*, 2001). Portanto, o compartimento celular T CD8⁺ representa uma fonte inicial de IFN- γ durante a resposta imune adaptativa que é capaz de induzir e/ou reforçar a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1.

O IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ também pode inibir a migração de eosinófilos, modulando a inflamação alérgica *in vivo* (Figura 14; Kemeny, 1998). A transferência de linfócitos T CD8⁺ reprime o infiltrado eosinofílico e a secreção de muco em modelos murinos de inflamação alérgica (Suzuki *et al.*, 1999 e 2002). Os animais deficientes para NFAT1 apresentam baixos níveis de citocinas Th1, altos níveis de citocinas Th2 e uma grande quantidade de eosinófilos na cavidade pleural quando desafiados com OVA (Figuras 14 e 15; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Uma vez que a produção de IFN- γ em células T CD8⁺ é dependente de NFAT1, a eosinofilia observada em camundongos NFAT1^{-/-} pode ser uma consequência da incapacidade de gerar uma resposta Th1 eficiente (ou mesmo de bloquear a resposta Th2) através da produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺. Animais deficientes para IFN- γ ou para o compartimento celular T CD8⁺ também apresentam grandes quantidades de eosinófilos na

cavidade pleural se comparados com animais controles (Figura 14; Coyle *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2002). Igualmente, animais deficientes para T-bet produzem baixos níveis de IFN- γ e desenvolvem alergia espontaneamente (Finotto *et al.*, 2002). Em humanos, uma deficiência na produção de IFN- γ predispõe ao desenvolvimento de quadros alérgicos (Leonard *et al.*, 1997; Renzi *et al.*, 1999). Portanto, o IFN- γ e os linfócitos T CD8⁺ são controladores da migração de eosinófilos e da resposta imune Th *in vivo* (Figuras 13-15; Kemeny, 1998). Alguns autores propõem que a indução de respostas Th1 confere proteção contra doenças de base Th2 como asma e alergia. Entretanto, outros trabalhos demonstraram que linfócitos T CD8⁺ e fatores de transcrição da família NFAT podem funcionar como indutores da inflamação alérgica, contrariando as evidências anteriores (Hamelmann *et al.*, 1996; Diehl *et al.*, 2004; Miyahara *et al.*, 2004).

Os efeitos supressores do IFN- γ na alergia podem ser explicados através de diversos mecanismos. É mais provável que o IFN- γ atue nos momentos iniciais do desenvolvimento do fenótipo Th1 e/ou da repressão do fenótipo Th2 de células T CD4⁺ indiferenciadas (“naive”) (Szabo *et al.*, 2003). Além disso, o IFN- γ também pode reprimir a produção de citocinas Th2 em células já diferenciadas, inibindo indiretamente alguns de seus efeitos, como o recrutamento e a ativação de eosinófilos (Iwamoto *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 2000; Elser *et al.*, 2002). Contudo, alguns trabalhos demonstram que o IFN- γ também pode inibir diretamente a ativação, a diferenciação e a infiltração de eosinófilos para o local da inflamação. A eotaxina (CCL11) é uma quimiocina fundamental para o recrutamento de eosinófilos, ao passo que a quimiocina Mig (“Monokine Induced by IFN- γ ” ou CXCL9) apresenta um efeito contrário (Wills-Karp, 1999; Renault, 2001). O IFN- γ é capaz de reprimir o receptor de eotaxina (CCR3) e induzir a produção de Mig, impedindo assim a migração e a diferenciação de eosinófilos para o sítio inflamatório (Lamkhioed *et al.*, 2003; Fulkerson *et al.*, 2004). O IFN- γ pode ainda modular a troca de classe de imunoglobulina em linfócitos B (Boehm *et al.*, 1997). Através da inibição da produção de

IgE, o IFN- γ diminui a liberação de mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos. Além disso, o IFN- γ também pode favorecer a produção de IgG frente a IgE, facilitando a fagocitose de antígenos (Boehm *et al.*, 1997; Sehra *et al.*, 2003). Por último, o IFN- γ pode ainda exercer um papel pró-apoptótico no quadro alérgico. Alguns trabalhos demonstram que o IFN- γ induz a morte de linfócitos T e eosinófilos através da expressão de caspase-8 e CD95 (Fas), suprimindo a evolução da inflamação alérgica (Luttmann *et al.*, 2000; Refaeli *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2003).

Além de modular respostas alérgicas, o IFN- γ é fundamental durante o controle de infecções causadas por patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Listeria* e *Leishmania* (Dalton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). A resistência ou suscetibilidade à infecção por *L. major* está diretamente relacionada com a resposta imune protetora do tipo Th1 ou com a resposta indutora de doença Th2, respectivamente (Reiner e Locksley, 1995; Sacks e Noben-Trauth, 2002). Diversos trabalhos demonstraram a importância do IFN- γ durante a resolução da infecção por *L. major*, seja na ativação de macrófagos ou na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (Scott, 1991; Wang *et al.*, 1994; Reiner e Locksley, 1995). Da mesma maneira, animais deficientes para o fator de transcrição NFAT1 produzem níveis reduzidos de IFN- γ e são suscetíveis à infecção por *L. major* (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Recentemente, o envolvimento de linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção por *L. major* foi confirmado. Após a ativação, estas células produzem altos níveis de IFN- γ , induzindo a diferenciação Th1 e inibindo a resposta Th2 de células T CD4⁺ (Farrell *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 1993; Belkaid *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2004). O IFN- γ produzido por linfócitos T CD8⁺ também é capaz de controlar infecções virais e infecções causadas por outros patógenos, como *Plasmodium* e *Trypanosoma*, agentes causadores da malária e doença de Chagas, respectivamente (Good e Doolan, 1999; Harty *et al.*, 2000; Martin e Tarleton, 2004). Resultados contrários indicam que a resolução da infecção por *L. major* não depende de células T CD8⁺

(Wang *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1998). Mesmo assim, tanto a ativação de linfócitos T CD8⁺ quanto a consequente produção de IFN- γ são consideradas peças centrais para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias efetivas contra diversos patógenos (Zinkernagel, 2003).

Diversos trabalhos já demonstraram o papel do IFN- γ na supressão de tumores. O IFN- γ pode regular o crescimento e a sobrevivência de células tumorais, inibir a angiogênese, e ainda induzir uma resposta imune anti-tumoral (Ikeda *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004). De fato, a ausência de IFN- γ , ou uma das moléculas envolvidas em sua via de sinalização (IFN- γ R e STAT1, salvo T-bet), confere maior suscetibilidade ao aparecimento de tumores em camundongos, sejam eles espontâneos ou induzidos por carcinógenos (Kaplan *et al.*, 1998; Shankaran *et al.*, 2001; Street *et al.*, 2001 e 2002; Peng *et al.*, 2004). Da mesma forma, animais deficientes para NFAT1 são mais suscetíveis à formação de sarcomas induzidos pelo carcinógeno metilcolantreno (MCA) quando comparados com animais selvagens (Werneck e Viola, dados não mostrados). O IFN- γ apresenta função anti-proliferativa e pró-apoptótica em células tumorais já que induz através de STAT1 a expressão de CDKIs (p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}) e moléculas de morte celular (caspase-1 e Fas/FasL), respectivamente (Chin *et al.*, 1996 e 1997; Mandal *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). Durante a resposta imune anti-tumoral, o IFN- γ exerce uma série de funções efetoras. Entre elas, destaca-se a ativação de células NK, NKT, CTLs e macrófagos, o aumento da imunogenicidade tumoral e a modulação da resposta imune Th (Ikeda *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004). Pouco se sabe sobre a origem do IFN- γ durante a imunidade anti-tumoral. Até o momento, as células NK e os linfócitos T $\gamma\delta$ e T CD8⁺ representam as principais fontes (Shankaran *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2003; Street *et al.*, 2004). Uma vez que a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ é dependente de NFAT1, esta proteína poderia exercer um papel indireto na supressão de tumores a partir de células T CD8⁺ ou outros compartimentos celulares. Contudo, poucas evidências sugerem que os fatores de transcrição NFAT estejam

envolvidos com o potencial citotóxico ou anti-tumoral (Haddad *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 2001). Independente desta hipótese, um número crescente de trabalhos indica a participação direta de NFAT tanto na proliferação celular como no processo tumorigênico. O papel das proteínas NFAT nestes fenômenos será discutido a seguir.

Os membros da família NFAT são reguladores da proliferação em diversos tipos celulares, como queratinócitos, adipócitos, células musculares e linfócitos (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002; Neal e Clipstone, 2003; Lipskaia e Lompré, 2004). Apesar de serem ativadas pela mesma via de sinalização (Ca^{2+} /calcineurina), as proteínas NFAT1-4 regulam a progressão celular de maneira diferente. Enquanto o fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação, os membros NFAT2, 3 e 4 aceleram a progressão do ciclo celular (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). Neste trabalho, foi demonstrado que a presença da proteína NFAT1 retarda a proliferação de linfócitos tanto no estímulo primário quanto no desafio *in vitro* (Figuras 16 e 20). O efeito supressor de NFAT1 durante a progressão celular não parece estar restrito ao compartimento linfocitário. A expressão de NFAT1 em células CHO (células epiteliais do ovário de hamster, “Chinese Hamster Ovary cells”) reprime a proliferação celular *in vitro* e reduz a frequência de células em fase S do ciclo celular (Carvalho e Viola, dados não mostrados). De fato, a ausência de NFAT1 também induz o crescimento desordenado de células do tecido cartilaginoso e a esplenomegalia *in vivo* (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 2000; Rengarajan *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que o NFAT1 é um controlador ubíquo e um repressor da proliferação em diferentes tipos celulares. Por outro lado, a ausência de NFAT2 compromete a proliferação de linfócitos, de células musculares e células endoteliais, dificultando a repopulação de órgãos linfóides e a formação de vasos sanguíneos e válvulas cardíacas (Ranger *et al.*, 1998a; Yoshida *et al.*, 1998; Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). Além disso, a expressão da proteína NFAT2 constitutivamente ativa induz a proliferação, a transformação e o crescimento tumoral de adipócitos *in vivo* (Neal e Clipstone, 2003). Estas evidências comprovam a dualidade da família NFAT durante a regulação da

proliferação celular. Enquanto a proteína NFAT1 exerce um papel supressor, a proteína NFAT2 apresenta um papel oncogênico.

Estas diferenças também se refletem na regulação da expressão de genes relacionados com o ciclo celular. Neste trabalho, a ausência de NFAT1 levou a um aumento na expressão de ciclinas A2, E, B1 e F em linfócitos (Figura 19). Mais especificamente, a proteína NFAT1 reprimiu diretamente a expressão de ciclina A2 (Figuras 24-26). O NFAT1 também é capaz de reprimir a expressão de CDK4 em linfócitos T ou ainda de induzir a expressão do inibidor p21^{WAF1/CIP1} em queratinócitos (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002). Por outro lado, a ativação de NFAT2 leva à expressão de ciclinas D1 e D2 e do proto-oncogene c-Myc em adipócitos (Neal e Clipstone, 2003). Estes resultados indicam claramente que membros da família NFAT podem atuar como ativadores ou repressores transcricionais em momentos diferentes. Contudo, não existem até o momento evidências definitivas que justifiquem este fenômeno. Mesmo assim, algumas hipóteses podem explicar as diferenças observadas e serão discutidas a seguir.

Apesar de apresentarem alta similaridade estrutural, as proteínas NFAT divergem entre si através de seus domínios de transativação TAD localizados nas regiões N e C terminal da proteína (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). Estas regiões são responsáveis pela interação de NFAT com outros fatores de transcrição. Desta forma, o status de ativador ou repressor poderia ser determinado pelo parceiro transcricional com o qual a proteína NFAT interage em um dado momento (Macián, 2005). De fato, proteínas NFAT interagem com fatores de transcrição que funcionam como ativadores (AP-1, EGR, GATA-3 e T-bet) ou repressores (YY1 e p21) da transcrição gênica (Jain *et al.*, 1992; Decker *et al.*, 1998; Sweetser *et al.*, 1998; Avni *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Khanna *et al.*, 2005; Macián, 2005). Outra hipótese considera a interação de NFAT com complexos protéicos remodeladores de cromatina. Alguns trabalhos demonstram que proteínas NFAT podem interagir com complexos protéicos acetiladores (HAT, “Histone Acetyltransferase”) ou desacetiladores (HDAC “Histone

Deacetylase”) de histonas, determinando a disponibilidade física de certas regiões promotoras (García-Rodríguez e Rao, 1998; Avots *et al.*, 1999; Avni *et al.*, 2002; Baksh *et al.*, 2002). Desta forma, as proteínas NFAT podem determinar de maneira seletiva as sequências regulatórias que serão ativadas ou reprimidas durante a transcrição. Finalmente, uma terceira hipótese pode ser embasada nos mecanismos de ativação e repressão das próprias proteínas NFAT. Apesar de serem ativadas pela mesma via de sinalização (Ca^{2+} /calcineurina), as proteínas NFAT1-4 podem ser reprimidas de maneira diferente (Mácian, 2005). A manutenção de NFAT no citoplasma da célula é dependente de fosforilações constantes que são executadas por proteínas cinases, como JNK, CK-1, p38 (Chow *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Gomez del Arco *et al.*, 2000). É possível, portanto, que algumas proteínas cinases sejam capazes de fosforilar e inativar membros específicos da família NFAT. Sustentando esta hipótese, as proteínas MAP cinases p38 e JNK são capazes de fosforilar os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT2, respectivamente (Chow *et al.*, 1997; Gomez del Arco *et al.*, 2000).

Até o momento, não existiam evidências do envolvimento de proteínas NFAT na regulação de ciclinas. Neste trabalho, foi demonstrado que o NFAT1 é capaz de se ligar aos promotores de ciclinas A2 e E2, e reprimir a expressão de ciclina A2 (Figuras 24-28). Durante o ciclo celular, as ciclinas E e A participam ativamente de diversas etapas que vão desde a transição G_1/S (ciclinas E e A), passando pela progressão de S (ciclina A), até chegar à transição G_2/M (ciclina A) (Sherr, 1996; Sherr e Roberts, 2004). A ciclina E regula a transição G_1/S quando associada a CDK2 (Hwang e Clurman, 2005). As ciclinas E, representadas pelos membros E1 e E2, são encontradas em quase todos os tipos celulares e normalmente ambos os membros são expressos ao mesmo tempo em uma célula. Depois de fosforilada pelo complexo ciclina D-CDK4/6, a proteína Rb libera o fator de transcrição E2F que induz a expressão de ciclina E (Harbour e Dean, 2000; Sherr e Roberts, 2004). As ciclinas E são portanto expressas no final da fase G_1 , atingem a expressão máxima na transição G_1/S e são finalmente degradadas no início da fase S (Ekholm e Reed, 2000; Hwang e Clurman, 2005). De maneira geral, os

complexos ciclina E-CDK2 sustentam a fosforilação de Rb iniciada pelo complexo ciclina D-CDK4/6 e fosforilam o inibidor p27^{KIP1}, determinando a entrada em fase S (Sherr e Roberts, 2004; Hwang e Clurman, 2005). Além disso, as ciclinas E também participam do início da replicação do DNA e da duplicação dos centrômeros. Animais deficientes para as ciclinas E1 ou E2 são viáveis, se desenvolvem normalmente e apresentam uma progressão normal do ciclo celular, questionando a real importância destas proteínas durante a proliferação (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). Contudo, a ausência das duas ciclinas impede a entrada das células em ciclo (saída de G₀) e dificulta o início da replicação (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). O aumento da expressão de ciclina E pode ser considerado um fator prognóstico em diversos tipos de cânceres humanos, como mama, pulmão e leucemias, sendo correlacionado com o estágio avançado da doença em alguns casos (Keyomarsi *et al.*, 1994 e 2002; Scuderi *et al.*, 1996; Fukuse *et al.*, 2000). Como dito anteriormente, a expressão de ciclina E é ativada pelo fator de transcrição E2F, mas também pode ser regulada por outras proteínas (Botz *et al.*, 1996; Geng *et al.*, 1996; Hwang e Clurman, 2005). Ainda não existem evidências do envolvimento de NFAT na regulação de ciclinas E. Contudo, neste trabalho o fator de transcrição NFAT1 foi capaz de se ligar a uma região regulatória do promotor de ciclina E2 (Figura 28), indicando a existência de algum mecanismo de regulação gênica ainda não descrito. De fato, a expressão de NFAT1 reprimiu a expressão de ciclina E e reduziu a frequência de células CHO em fase S (Carvalho e Viola, dados não mostrados), sugerindo um defeito na transição G₁/S que pode estar associada à diminuição da formação do complexo ciclina E-CDK2.

Por sua vez, as ciclinas A regulam a passagem da célula pela fase S e pela transição G₂/M através da associação com CDK2 ou CDK1, respectivamente (Yam *et al.*, 2002). Depois de fosforilada, a proteína Rb libera o fator de transcrição E2F que também induz a expressão de ciclina A (Harbour e Dean, 2000; Sherr e Roberts, 2004). Assim, as ciclinas A podem ser detectadas pela primeira vez no final da fase G₁. Os níveis de expressão da ciclina A aumentam durante a fase S e são mantidos até o início da mitose, quando esta ciclina é degradada (Yam *et*

al., 2002; Sherr e Roberts, 2004). O complexo ciclina A-CDK2 fosforila alguns substratos necessários para a replicação do DNA e garante que a duplicação ocorra uma única vez nesta etapa. Já o complexo ciclina A-CDK1 parece estabilizar a ciclina B durante o início da mitose (Yam *et al.*, 2002). A família das ciclinas A também é composta por 2 membros (A1 e A2). A ciclina A1 é expressa preferencialmente na linhagem germinativa, enquanto que a ciclina A2 começa a ser expressa no início do desenvolvimento embrionário e é a principal ciclina A encontrada em células somáticas (Yam *et al.*, 2002). Animais deficientes para a ciclina A1 são viáveis, apesar dos machos serem estéreis por causa de uma interrupção no processo de espermatogênese (Liu *et al.*, 1998). Por outro lado, animais deficientes para a ciclina A2 são letais durante a embriogênese, indicando que esta proteína é essencial para a divisão celular normal (Murphy *et al.*, 1997). O aumento da expressão de ciclina A2 não parece ser um fator prognóstico tão evidente para o câncer, mas pode estar relacionado com o carcinoma hepatocelular e o sarcoma (Chao *et al.*, 1998; Huuhtanen *et al.*, 1999). Já o aumento da expressão de ciclina A1 está associado com leucemias e linfomas (Yang *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2001). Assim como a ciclina E, a expressão de ciclina A é induzida principalmente pelo fator de transcrição E2F, mas também pode ser regulada por outros diversos fatores de transcrição (Blanchard, 2000; Yam *et al.*, 2002). Este trabalho indica, pela primeira vez, que um fator de transcrição da família NFAT controla diretamente a expressão de ciclinas. A proteína NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor e reprimir a expressão de ciclina A2, retardando a proliferação celular de linfócitos (Figuras 24-26) e diminuindo a frequência de células em fase S e G₂/M (Figura 21).

As proteínas NFAT também podem influenciar outros fenômenos biológicos relacionados com a tumorigênese, como a apoptose, a angiogênese e o potencial metastático de tumores (Latinis *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Jauliac *et al.*, 2002). De fato, as proteínas NFAT regulam direta ou indiretamente a expressão de diversas moléculas envolvidas com os processos tumorigênicos, como c-Myc, COX-2, FasL, Bcl-2, ciclina D, CDK4, p21^{WAF1/CIP1} e CD40L

(Latinis *et al.*, 1997; Oukka *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002; Neal e Clipstone, 2003; Grumont *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2005). Alguns trabalhos sugerem que proteínas da família NFAT podem se comportar como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. Contudo, estas evidências foram observadas até o momento em linhagens celulares, culturas primárias *in vitro*, ou mesmo modelos murinos de experimentação *in vivo*. A participação de proteínas NFAT durante o processo de tumorigênese em humanos ainda requer uma investigação mais criteriosa. Recentemente, ampliações do gene *nfat1* foram encontradas não só em linhagens celulares de câncer de pâncreas mas também em amostras de pacientes com câncer pancreático (Holzmann *et al.*, 2004). Estudos de genômica funcional e a utilização de novas ferramentas de biologia molecular podem contribuir para esta busca (Segal *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÕES

- A proteína NFAT1 participa da diferenciação e da proliferação de linfócitos. Este fator de transcrição pode funcionar diretamente como um ativador ou um repressor da expressão gênica nestas células.

- O fator de transcrição NFAT1 induz a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ após o estímulo do TCR. Este IFN- γ produzido por células T CD8⁺ é importante durante a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1.

- A produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ pode modular a resposta imune Th1/Th2 e controlar a migração de eosinófilos em um modelo de inflamação alérgica *in vivo*.

- O fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação linfocitária. Este fator de transcrição se liga diretamente a regiões regulatórias dos promotores murinos de ciclina A2 e E2.

- O fator de transcrição NFAT1 reprime diretamente a expressão de ciclina A2 e pode funcionar como um fator supressor do ciclo celular de linfócitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 3: 549-557.

Amasaki Y, Masuda ES, Imamura R, Arai K-I, Arai N (1998). Distinct NFAT family proteins are involved in the nuclear NFAT-DNA binding complexes from human thymocyte subsets. *J Immunol*, 160: 2324-2333.

Ansel KM, Lee DU, Rao A (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*, 4: 616-623.

Ansel KM, Greenwald RJ, Agarwal S, Bassing CH, Monticelli S, Interlandi J, Djuretic IM, Lee DU, Sharpe AH, Alt FW, Rao A (2004). Deletion of a conserved *Il4* silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol*, 5: 1251-1259.

Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*, 3: 643-651.

Avots A, Buttmann M, Chuvpilo S, Escher C, Smola U, Bannister AJ, Rapp UR, Kouzarides T, Serfling E (1999). CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10: 515-524.

Bach EA, Aguet M, Scheiber RD (1997). The IFN- γ : a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 15: 563-591.

Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF, Burakoff SJ (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell*, 10: 1071-1081.

Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene*, 9: 71-79.

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 275: 1930-1934.

Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D (2002). CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol*, 168: 3992-4000.

Blanchard J-M (2000) Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem Pharmacol*, 60: 1179-1184.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*, 15: 749-795.

Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Dürr P (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol*, 16: 3401-3409.

Bradley LM, Dalton DK, Croft M (1996). A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J Immunol*, 157: 1350-1358.

Cantrell D (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*, 14: 259-274.

Carter LL, Murphy KM (1999). Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon γ production from CD4⁺ versus CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 189: 1355-1360.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21: 2933-2942.

Carvalho LDS. *Caracterização do envolvimento do fator de transcrição NFAT1 na regulação do ciclo celular e na tumorigênese*. Tese de Doutorado. UFRJ, Rio de Janeiro, 2005. 153 p.

Chao Y, Shih Y-L, Chiu J-H, Chau G-Y, Lui W-Y, Yang WK, Lee S-D, Huang T-S (1998). Overexpression of cyclin A but not Skp2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 58: 985-990.

Chin YE, Kitagawa M, Su W-CS, You Z-H, Iwamoto Y, Fu X-Y (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} mediated by STAT1. *Science*, 272: 719-722.

Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu X-Y (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 17: 5328-5337.

Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*, 278: 1638-1641.

Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, Konig T, Avots A, Schmitt E, Berberich-Siebelt F, Schimpl A, Serfling E (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity*, 16: 881-895.

Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K (1999). T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med*, 190: 1309-1318.

Constant SL, Bottomly K (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15: 297-322.

Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS, Anderson GP (1996). Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory

response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol*, 156: 2680-2685.

Crabtree GR, Clipstone NA (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem*, 63: 1045-1083.

Dalton KD, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science*, 259: 1739-1742.

Das G, Sheridan S, Janeway Jr. CA (2001). The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. *J Immunol*, 167: 2004-2010.

Decker EL, Skerka C, Zipfel PF (1998). The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem*, 273: 26923-26930.

Diehl S, Krahl T, Rinaldi L, Norton R, Irvin CG, Rincón M (2004). Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J Immunol*, 172: 3597-3603.

Dow SW, Schwarze J, Heath TD, Potter TA, Gelfand EW (1999). Systemic and local interferon γ gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum Gene Ther*, 10: 1905-1914.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21: 137-148.

Duque J, Fresno M, Iñiguez MA (2005). Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 280: 8686-8693.

Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE (1996). Targeted disruption of the mouse STAT1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84: 443-450.

Dyson N (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12: 2245-2262.

Ekholm SV, Reed SI (2000). Regulation of G₁ cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 676-684.

Elser B, Lohoff M, Kock S, Giaisi M, Kirchhoff S, Krammer PH, Li-Weber M (2002). IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity*, 17: 703-712.

Evan GI, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.

Farrell JP, Muller I, Louis JA (1989). A role for Lyt-2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. *J Immunol*, 142: 2052-2056.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FHY, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*, 295: 336-338.

Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H (2000). Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 60: 242-244.

Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doepker MP, Kavanaugh JL, Mishra A, Witte DP, Zhang H, Farber JM, Yang M, Foster PS, Rothenberg ME (2004). Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 1987-1992.

Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z (2003). $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon γ in tumor immunity. *J Exp Med*, 198: 433-442.

García-Rodríguez C, Rao A (1998). Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med*, 187: 2031-2036.

Garfin DE (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 182: 425-441.

Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 12: 1173-1180.

Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout III WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, 114: 431-443.

Germain RN (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-299.

Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179.

Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol*, 4: 900-911.

Goldrath AW, Bevan MJ (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402: 255-262.

Gómez del Arco P, Martínez-Martínez S, Maldonado JL, Ortega-Pérez I, Redondo JM (2000). A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem*, 275: 13872-13878.

Good MF, Doolan DL (1999). Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*, 11: 412-419.

Grumont R, Lock P, Mollinari M, Shannon FM, Moore A, Gerondakis S (2004). The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF- κ B-dependent *c-myc* expression. *Immunity*, 21: 19-30.

Haddad P, Wagnier A, Bourge JF, Sasportes M, Paul P (1993). A promoter element of the human serine esterase granzyme B gene controls specific transcription in activated T cells. *Eur J Immunol*, 23: 625-629.

Hall M, Peters G (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 68: 67-108.

Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, Larsen GL, Gelfand EW (1996). Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med*, 183: 1719-1729.

Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98: 859-869.

Harbour JW, Dean DC (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14: 2393-2409.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW (2000). CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*, 18: 275-308.

Hayes MP, Wang J, Norcross MA (1995). Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon- γ of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*, 86: 646-650.

Hernández GL, Volpert OV, Íñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med*, 193: 607-620.

Ho SN, Thomas DJ, Timmerman LA, Li X, Francke U, Crabtree GR (1995). NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J Biol Chem*, 270: 19898-19907.

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*, 4: 397-405.

Hoeijmakers JHJ (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev*, 17: 2205-2232.

Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Döhner H, Lichter P, Gress T, Bentz M (2004). Genomic DNA-Chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res*, 64: 4428-4433.

Horsley V, Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol*, 156: 771-774.

Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M (1993). Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science*, 259: 1742-1745.

Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M (1998). Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun*, 66: 3968-3970.

Huet X, Rech J, Plet A, Vié A, Blanchard J-M (1996). Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 16: 3789-3798.

Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Böhling TO, Wiklund TA, Tukiainen EJ, Virolainen M, Tribukait B, Andersson LC (1999). Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness. *Cancer Res*, 59: 2885-2890.

Hwang HC, Clurman BE (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24: 2776-2786.

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 95-109.

Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 275: 23627-23635.

Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S (1993). Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, 177: 573-576.

Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A (1992). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature*, 365: 801-804.

Janeway Jr. CA, Bottomly K (1994). Signals and signs for lymphocyte response. *Cell*, 76: 275-285.

Janeway Jr. CA (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 7461-7468.

Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002). The role of NFAT transcription factor in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol*, 4: 540-544.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, Döffinger R, Altare F, Girdlestone J, Emile JF, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius VA, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD,

Casanova JL (1999). A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*, 21: 370-378.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7556-7561.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ (1996a). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382: 174-177.

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ (1996b). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4: 313-319.

Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432: 316-323.

Kemeny DM (1998). CD8⁺ T cells in atopic disease. *Curr Opin Immunol*, 10: 628-633.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res*, 54: 380-385.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS (2002). Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*, 347: 1566-1575.

Khanna AK, Plummer M, Nilakantan V, Pieper GM (2005). Recombinant p21 protein inhibits lymphocyte proliferation and transcription factors. *J Immunol*, 174: 7610-7617.

Kiani A, Viola JPB, Lichtman AH, Rao A (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving the transcription factor NFAT1. *Immunity*, 7: 849-860.

Kiani A, Rao A, Aramburu J (2000). Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*, 12: 359-372.

Kiani A, Garcia-Cózar FJ, Habermann I, Laforsch S, Aebischer T, Ehninger G, Rao A (2001). Regulation of interferon- γ gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood*, 98: 1480-1488.

Kodama T, Kuribayashi K, Nakamura H, Fujita M, Fujita T, Takeda K, Dakhama A, Gelfand EW, Matsuyama T, Kitada O (2003). Role of interleukin-12 in the regulation of CD4⁺ T cell apoptosis in a mouse model of asthma. *Clin Exp Immunol*, 131: 199-205.

Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 11: 520-526.

Lamkhioed B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Delespesse, Renzi PM (2003). The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34⁺ progenitor cells. *J Immunol*, 170: 537-547.

Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem*, 272: 31427-31434.

Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A (2004). A distal enhancer in the interferon- γ (IFN- γ) locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem*, 279: 4802-4810.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14: 233-258.

Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW (1997). Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 368-375.

Lewis RS (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19: 497-521.

Liao C, Wang XY, Wei HQ, Li SQ, Merghoub T, Pandolfi PP, Wolgemuth DJ (2001). Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6853-6858.

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 15137-15142.

Lipskaia L, Lompré AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell*, 96: 55-68.

Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet*, 20: 377-380.

Loh C, Shaw KT-Y, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA, Rao A (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem*, 271: 10884-10891.

Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432: 307-315.

Lundberg AS, Weinberg RA (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 18: 753-761.

Luo C, Burgeon E, Rao A (1996a). Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J Exp Med*, 184: 141-147.

Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, Rao A (1996b). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol*, 16: 3955-3966.

Luttmann W, Dauer E, Schmidt S, Marx O, Hossfeld M, Matthys H, Virchow JC Jr (2000). Effects of interferon- γ and tumour necrosis factor- α on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand J Immunol*, 51: 54-59.

Lyakh L, Ghosh P, Rice NR (1997). Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol*, 17: 2475-2484.

Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G (1996). The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J Exp Med*, 183: 147-157.

Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, 20: 2476-2489.

Macián F (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5: 472-484.

Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R (1998). Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21^{WAF1} and p27^{Kip1} that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene*, 16: 217-225.

Martin D, Tarleton R (2004). Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev*, 201: 304-317.

Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T_H1 priming. *Nat Immunol*, 5: 1260-1265.

Massagué J (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432: 298-306.

Masuda E, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K-I, Arai N (1995). NFATx, a novel member of the NFAT family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol*, 15: 2697-2706.

Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 14: 2066-2076.

McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A (1994). The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- α gene transcription. *J Biol Chem*, 269: 30445-30450.

Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD (1996). Targeted disruption of the *Stat1* gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84: 431-442.

Meyerson M, Harlow E (1994). Identification of G₁ kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*, 14: 2077-2086.

Miyahara N, Takeda K, Kodama T, Joetham A, Taube C, Park J-W, Miyahara S, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW (2004). Contribution of antigen-primed CD8⁺ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J Immunol*, 172: 2549-2558.

Morgan DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-134.

Mosmann TR, Li L, Sad S (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol*, 9: 87-92.

Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL (2001). Role of T-bet in commitment of T_H1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 292: 1907-1910.

Müller I, Kropf P, Etges RJ, Louis JA (1993). Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. *Infect Immun*, 61: 3730-3738.

Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*, 18: 451-494.

Murphy KM, Reiner SL (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2: 933-944.

Murphy M, Stinnakre M-G, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Brechot C, Sobczak-Thépot J (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet*, 15: 83-86.

Neal JW, Clipstone NA (2003). A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem*, 278: 17246-17254.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M (1996). A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*, 335: 1941-1949.

Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG, Potter PC (1997). Reduced interferon- γ but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 662-668.

Nurse P (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100: 71-78.

Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JPB, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*, 6: 539-550.

Oukka M, Ho IC, De la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9: 295-304.

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*, 11: 961-971.

Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J*, 22: 4794-4803.

Pavletich NP (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287: 821-828.

Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao C, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter

CA, Reiner SL (2003). Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor *Eomesodermin*. *Science*, 302: 1041-1043.

Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*, 14: 13-20.

Peng SL, Townsend MJ, Hecht JL, White IA, Glimcher LH (2004). T-bet regulates metastasis rate in a murine model of primary prostate cancer. *Cancer Res*, 64: 452-455.

Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee Y-C, Ford RJ (2005). Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood*, 106: 3940-3947.

Rainio E-M, Sandholm J, Koskinen PJ (2002). Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol*, 168: 1524-1527.

Ranger AM, Hodge MR, Gravallesse EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby M, Glimcher LH (1998a). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity*, 8: 125-134.

Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH (1998b). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*, 9: 627-635.

Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravallesse EM, Glimcher MJ, Glimcher LH (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med*, 191: 9-22.

Rao A, Luo C, Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15: 707-747.

Refaeli Y, Parijs LV, Alexander SI, Abbas AK (2002). Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*, 196: 999-1005.

Reiner SL, Locksley RM (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13: 151-177.

Ren S, Rollins BJ (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117: 239-251.

Renauld J-C (2001). New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*, 54: 577-589.

Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczek RA, Ashwell JD, Glimcher LH (2000). Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*, 12: 293-300.

Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH (2002) NFATc2 and NFATc3 regulate T_H2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve T_H cells. *Nat Immunol*, 3: 48-54.

Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, Drblik SP, Bérubé D, Gagnon MF, Spier S (1999). Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 1417-1422.

Sacks D, Noben-Trauth N (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2: 845-858.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY.

San-Antonio B, Íñiguez MA, Fresno M (2002). Protein kinase C ζ phosphorylates nuclear factor of activated T cells and regulates its transactivating activity. *J Biol Chem*, 277: 27073-27080.

Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP (2001). Cross talk among calcineurin Sp1/Sp3 and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9575-9580.

Scott P (1991). IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, 147: 3149-3155.

Scuderi R, Palucka KA, Pokrovskaja K, Björkholm M, Wiman KG, Pisa P (1996). Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood*, 87: 3360-3367.

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10188-10192.

Seder RA, Paul WE (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol*, 12: 635-673.

Seder RA, Ahmed R (2003). Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*, 4: 835-842.

Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D (2005). From signatures to models: understanding cancer using microarrays. *Nat Genet*, 37: S38-S45.

Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, Haegeman A, Matthys P, Tagawa Y, Pauwels R, Grooten J (2003). Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc γ R and IFN- γ . *J Immunol*, 171: 2080-2089.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410: 1107-1111.

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241: 202-205.

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677.

Sherr CJ (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116: 235-246.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev*, 13: 1501-1512.

Sherr CJ, Roberts JM (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18: 2699-2711.

Shresta S, Pham CTN, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*, 10: 581-587.

Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA (1997). Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J Biol Chem*, 272: 30412-30420.

Smits VAJ, Medema RH (2001). Cheking out the G₂/M transition. *Biochim Biophys Acta*, 1519: 1-12.

Street SEA, Cretney E, Smyth MJ (2001). Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97: 192-197.

Street SEA, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ (2002). Supression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon γ . *J Exp Med*, 196: 129-134.

Street SEA, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ (2004). Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and $\gamma\delta$ T cells. *J Exp Med*, 199: 879-884.

Suzuki M, Taha R, Ihaku D, Hamid Q, Martin JG (1999). CD8⁺ T cells modulate late allergic airway responses in Brown Norway rats. *J Immunol*, 163: 5574-5581.

Suzuki M, Maghni K, Molet S, Shimbara A, Hamid QA, Martin JG (2002). IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J Allergy Clin Immunol*, 109: 803-809.

Sweetser MT, Hoey T, Sun YL, Weaver WM, Price GA, Wilson CB (1998). The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J Biol Chem*, 273: 34775-34783.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100: 655-669.

Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH (2002). Distinct effects of T-bet in T_H1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 295: 338-342.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 21: 713-758.

Takizawa CG, Morgan DO (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 658-665.

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DAA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382: 171-174.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680.

Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H, Kiss Z (1998). Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 353: 374-378.

Uzonna JE, Joyce KL, Scott P (2004). Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 199: 1559-1566.

Vindelov LL (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 24: 227-242.

Viola JPB, Kiani A, Bozza PT, Rao A (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, 91: 2223-2230.

Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Medicine*, 10: 789-799.

von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F, Klein L (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev*, 191: 62-78.

Wang Z-E, Reiner SL, Hatam F, Heinzl FP, Bouvier J, Truck CW, Locksley RM (1993). Targeted activation of CD8 cells and infection of β 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol*, 151: 2077-2086.

Wang Z-E, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM (1994). CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*, 179: 1367-1371.

Weiss A (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*, 73: 209-212.

Weiss A, Littman DR (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76: 263-274.

Wenner CA, Güler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM (1996). Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol*, 156: 1442-1447.

Wills-Karp M (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*, 17: 255-281.

Xanthoudakis S, Viola JPB, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272: 892-895.

Xu M, Sheppard K-A, Peng C-Y, Yee AS, Piwnicka-Worms H (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 14: 8420-8431.

Xu X, Fu X-Y, Plate J, Chong AS (1998). IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*, 58: 2832-2837.

Yam CH, Fung TK, Poon RYC (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1317-1326.

Yang R, Nakamaki T, Lübbert M, Said J, Sakashita A, Freyaldenhoven BS, Spira S, Huynh V, Müller C, Koefler HP (1999). Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood*, 93: 2067-2074.

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell*, 20: 539-550.

Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity*, 8: 115-124.

Zheng W, Flavell RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89: 587-596.

Zhou B, Cron RQ, Wu B, Genin A, Wang Z, Liu S, Robson P, Baldwin HS (2002). Regulation of the murine *Nfatc1* gene by NFATc2. *J Biol Chem*, 277: 10704-10711.

Zhou B-BS, Elledge SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439.

Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot J-C, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, 93: 851-861.

Zinkernagel RM (2003). On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol*, 21: 515-546.

8. APÊNDICES

8.1. Artigos originais

Apêndice 8.1.1. Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA, Viola JPB (2002). NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J*, 16: 1940-1942.

NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression

Mauricio S. Caetano,^{*,‡} Adriana Vieira-de-Abreu,^{*,§} Leonardo K. Teixeira,^{*} Miriam B.F. Werneck,^{*} Marcello A. Barcinski,^{*,†} and João P.B. Viola^{*}

^{*}Division of Experimental Medicine, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil; [†]Department of Parasitology, São Paulo University (USP), São Paulo, SP, Brazil

[‡]Present address: Laboratory of Immunity Biology, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[§]Present address: Laboratory of Immunopharmacology, Department of Physiology and Pharmacodynamics, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corresponding author: João P.B. Viola, Divisão de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Praça Cruz Vermelha, 23 - 6^o andar, Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20230-130. E-mail: jpviola@inca.gov.br

ABSTRACT

Upon antigen stimulation, lymphocytes enter in cell cycle and proliferate, and most of the activated T cells die by apoptosis. Many of the proteins that regulate lymphocyte activation are under the control of transcription factors belonging to the NFAT family. As previously demonstrated, NFATC2^{-/-} mice consistently showed a marked increase in lymphocyte proliferation. Here, we evaluate the role of NFATC2 in regulating lymphocyte proliferation and its involvement in the control of cell cycle progression during lymphocyte activation. NFATC2^{-/-} lymphocytes, including CD4⁺ T cells and B cells, hyperproliferated upon stimulation when compared with NFATC2^{+/+} cells. Analysis of cell death demonstrated that NFATC2^{-/-} lymphocytes displayed an increased rate of apoptosis after antigen stimulation in addition to the hyperproliferation. Cell cycle analysis after antigen stimulation showed that NFATC2^{-/-} cultures contained more cycling cells when compared with NFATC2^{+/+} cultures, which is related to a shortening in time of cell division upon activation. Furthermore, hyperproliferation of NFATC2^{-/-} lymphocytes is correlated to an overexpression of cyclins A2, B1, E, and F. Taken together, our results suggest that the NFATC2 transcription factor plays an important role in the control of cell cycle during lymphocyte activation and may act as an inhibitor of cell proliferation in normal cells.

Key words: NFAT • T cell • proliferation • apoptosis

In response to antigen stimulation, lymphocytes proliferate, differentiate, and acquire their effector functions, and most of the activated T cells die by apoptosis. It has been shown that T-cell differentiation and activation-induced cell death are dependent on the cell cycle

progression (1–5). Naive lymphocytes are quiescent and require stimulation to progress in the cell cycle. T cell receptor (TCR) engagement with antigen initiates a series of signal transduction events that lead to a cellular response. Indeed, increase of intracellular free Ca^{2+} is central for T-cell activation by antigen and other stimuli that cross-link the TCR (6). Several observations demonstrate that Ca^{2+} signal stimulates gene transcription associated with the cell cycle progression and also promotes the transition from G1 to S phase (7, 8). Furthermore, accumulating evidence suggests that calcineurin, the Ca^{2+} /calmodulin-activated serine phosphatase, plays a major role in the regulation of cell cycle progression by acting in the early stages of the G1 phase of the cell cycle (9, 10).

Lymphocyte activation is coordinated by an interacting network of transcription factors that determine the expression of different effector proteins that regulate the immune response. Many of the proteins that regulate lymphocyte proliferation and differentiation are under the control of proteins belonging to the NFAT family of transcription factors. The NFAT family encodes five different classes of proteins; NFATC1 (also called NFATc or NFAT2), NFATC2 (NFATp or NFAT1), NFATC3 (NFATx or NFAT4), NFATC4 (NFAT3), and NFAT5 (TonE-BP or NFATL1) (11–13). The NFAT proteins are normally activated by stimulation of receptors coupled to Ca^{2+} mobilization, including the antigen receptors on T and B cells (11). At least four of these proteins are regulated by calcineurin, which is the direct target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 (11, 14). Binding sites for NFAT proteins are present in the promoter regions of diverse activation-inducible genes, including those encoding cytokines IL-2, IL-4, IL-5, and IFN- γ as well as cell surface proteins CD40L, CTLA-4, and FasL (11, 15, 16). Much evidence suggests that the NFAT family of transcription factors plays an ubiquitous role in cell differentiation (17). However, the specific role of each member of the NFAT family in the control of gene transcription during cell activation and differentiation is not completely clear.

Although different NFAT family members are considered to have a redundant function in gene expression control, data generated by gene disruption experiments suggest that these proteins may have distinct roles in cell physiology (17, 18). Unexpectedly, targeted disruption of NFATC1 resulted in an embryonic lethal phenotype as a result of defective cardiac valve development (19, 20). Complementing RAG-1- or RAG-2-deficient blastocysts with homozygous NFATC1 $^{-/-}$ mutant ES cell lines demonstrated that T and B cells from chimeric mice showed reduced proliferation of peripheral lymphocytes when compared with wild-type mice (20, 21). In an *in vitro* model of Th differentiation, the chimeric mice displayed a decreased production of IL-4 but normal production of IFN- γ , demonstrating an impaired Th2 response in mutant T cells (20, 21). These results suggest that NFATC1 is an important positive regulator of Th2 cytokine expression.

NFATC2 $^{-/-}$ mice developed normally and did not exhibit any obvious behavioral deficiencies (22, 23). However, NFATC2 $^{-/-}$ mice consistently showed a marked increase in their immune response (22, 23). NFATC2 $^{-/-}$ mice showed an enhanced Th2 development in both *in vivo* and *in vitro* models of Th differentiation, as evidenced by increased levels of IL-4 production (22, 24, 25). Furthermore, cells from lymph nodes and spleen hyperproliferated in response to different antigen stimulations (23); likewise, CD4^+ T cells and B cells hyperproliferated *in vitro* in response to anti-CD3 and anti-IgM antibodies, respectively (22). Although all data on the control

of gene expression by NFATC2 were consistent with the idea that NFATC2 played a positive role in gene transcription (11), the results from NFATC2^{-/-} mice suggested that this transcription factor might play a negative role in the regulation of gene expression in the immune response. Given the importance of lymphocyte activation during the immune response, it is of considerable interest to understand the mechanisms by which NFAT transcription factors exert their profound effects on cell proliferation and differentiation.

In this work, we evaluated the role of NFATC2 in cell cycle progression control during lymphocyte activation, using the NFATC2^{-/-} mice as a model system. We have found that the hyperproliferative phenotype of NFATC2^{-/-} lymphocytes is neither restricted to one specific lymphocyte subset nor dependent on IL-4. Furthermore, NFATC2^{-/-} cells presented an increased rate of apoptosis in addition to the hyperproliferation. Cell cycle analysis showed that NFATC2^{-/-} cells presented a deregulated cell cycle control, which is related to an overexpression of some cyclin genes. Finally, our results suggest that NFATC2 transcription factor play an important role in the control of cell cycle during lymphocyte activation and may act as a negative regulator of cell cycle progression in normal cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sensitization

Control wild-type (NFATC2^{+/+}) and NFATC2-deficient (NFATC2^{-/-}) mice were generated as previously described (23). Eight- to 12-week-old NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice, bred and maintained independently, were used in all experiments. Mice were sensitized in the hind footpad with one s.c. injection of 0.1 ml of ovalbumin (OVA, 200 µg) emulsified in complete Freund's adjuvant as previously described (23, 25). Animals were maintained in the Brazilian National Cancer Institute (INCA) animal facility. Animals are maintained and treated according to the animal care guidelines of the Council for International Organizations of Medical Sciences.

Cell culture

All cell cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine, streptomycin-penicillin, nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, HEPES, 2-mercaptoethanol (all from Gibco-BRL, Rockville, MD). Single-cell suspensions were prepared from draining lymph nodes of the sensitized footpad as previously described (23, 25).

Proliferation assay

Cells (2×10^5 cells/well) were plated and left unstimulated or stimulated with different concentrations of OVA (0.1, 0.3, or 0.5 mg/ml); plate-bound anti-CD3 antibody (2C11; 1 µg/ml); or PMA (10 nM) plus ionomycin (1 µM) for different time periods (24, 48, and 72 h) as indicated and pulsed with ³H-thymidine (5 µCi/ml) for 12 h. Cells were then harvested, and ³H-thymidine incorporation was analyzed. For IL-4-neutralizing experiments, cells were *in vitro* stimulated with OVA (0.5 mg/ml) for 72 h in the absence or in the presence of 20, 100, and 200 µg/ml of anti-IL-4 antibody as indicated, and then ³H-thymidine incorporation was analyzed.

Anti-IL-4 antibody was purified from culture hybridoma cells (11B11) by chromatography over protein-G (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Activity of purified anti-IL-4 antibody was tested for binding to IL-4 by ELISA and for neutralization of IL-4 by inhibiting *in vitro* differentiation of CD4⁺ cells toward Th2, favoring Th1 immune response as previously described (24).

ELISA

Cells (2×10^6 cells/well) were *in vitro* stimulated with OVA (0.5 mg/ml) for 72 h, and the cell-free supernatant was assessed for IL-4 protein level according to the manufacturer's instructions (BD-Pharmingen, San Diego, CA).

Flow cytometry

Cells were stained with specific fluorochrome-labeled antibody as previously described (24), washed, and either fixed with 1% paraformaldehyde or analyzed directly. Labeled monoclonal antibodies anti-CD4, -CD8, and -CD45R (B220) were used (all from BD-Pharmingen). For analysis of apoptosis, cells were stained with annexin-V-FITC (BD-Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Labeled cells were analyzed on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer.

Cell cycle analysis

Cell cycle phases were analyzed as previously described (26). In brief, cells (4×10^5 cells/well) were left unstimulated or *in vitro* stimulated with OVA (0.5 mg/ml) and were collected at the indicated time periods (24, 48, and 72 h). Cells were then stained with propidium iodide in the presence of NP-40 and analyzed by flow cytometry. For analysis of cellular replication, lymph node cells (10^7 cells/ml) were labeled with 0.5 μ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at 37°C. Staining was stopped by adding an equal volume of DMEM with 10% FCS. The cells were immediately washed, incubated in culture medium for 30 min at 37°C, and then left unstimulated or *in vitro* stimulated with 1 μ g/ml of plate-bound anti-CD3 at 2×10^5 cells/well (2C11; BD-Pharmingen). At indicated times (24, 42, and 65 h), cells were analyzed by flow cytometry.

RNA gene expression

Cells (2×10^7 cells) were left unstimulated or *in vitro* stimulated with OVA (0.5 mg/ml) and were collected at the indicated times. Total RNA was immediately extracted with Trizol according to the manufacturer's instructions (Gibco-BRL, Rockville, MD). mRNA expression in total cellular RNA from each sample was analyzed with a multiple probe RNase protection assay kit (Ribo-Quant, BD-Pharmingen). For analysis of expression of genes related to cell cycle, mCYC-1 (cyclin-A2, -B1, -C, -D1, -D2, -D3, -A1, and -B2) and mCYC-2 (cyclin-E, -F, -G1, -G2, -I, and -H) multiprobe sets were used. RNA loading was estimated by measuring the intensities of two housekeeping genes encoding GAPDH and L32. Transcript levels were quantified by densitometry of the autoradiograms, with exposures within the linear range using SigmaGel software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

Statistical analysis

Statistical analysis of values from wild-type and NFATC2^{-/-}, and between control and treated groups, was determined using an unpaired Student's *t* test for single comparison or an ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls for multiple comparisons. *P*<0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

As shown in [Figure 1A](#), lymphocytes from NFATC2^{-/-} mice proliferate more in an antigen dose-dependent manner when compared with lymphocytes from NFATC2^{+/+} mice. In a time course assay, the maximum difference in proliferation upon antigen stimulation between NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} lymphocytes was observed at 72 h after antigen stimulation ([Fig. 1B](#)). Furthermore, NFATC2^{-/-} lymphocytes also hyperproliferate compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes after a polyclonal stimulation that bypasses antigen presentation, such as anti-CD3 antibody or PMA plus ionomycin (data not shown). These results demonstrate that the hyperproliferative phenotype presented by NFATC2^{-/-} cells is dependent on stimulation but might be independent of antigen presentation and costimulation provided by antigen presenting cells (APCs).

To better characterize the hyperproliferative phenotype presented by NFATC2^{-/-} mice, we analyzed the lymphocyte subsets that might be involved with this phenomenon. NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice did not show any significant differences in the number of CD4⁺, CD8⁺, and B lymphocytes in lymph nodes before or after sensitization with OVA (data not shown). However, after *in vitro* stimulation with OVA, all lymphocyte subsets, including CD4⁺, CD8⁺, and B cells, were increased in NFATC2^{-/-} cultures when compared with NFATC2^{+/+} cultures ([Fig. 2](#)). Moreover, in the first 24 h, the most significant difference was observed in CD4⁺ cells ([Fig. 2](#)). These results suggest that the hyperproliferative phenotype presented by NFATC2^{-/-} cells is not restricted to a specific lymphocyte subpopulation; however, CD4⁺ cells could play a major role in this phenomenon.

It has been shown that CD4⁺ T cells from NFATC2^{-/-} mice present a preferential differentiation through a Th2 phenotype, characterized by an overexpression of IL-4 (22, 24, 25). Because IL-4 is a potent growth factor for Th2 and B cells, we evaluated the involvement of IL-4 in the hyperproliferation observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes. As shown in [Figure 3A](#), lymphocytes from NFATC2^{-/-} mice produce more IL-4 after *in vitro* antigen stimulation when compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes. However, proliferation assays demonstrated that NFATC2^{-/-} cells still proliferate more than NFATC2^{+/+} cells, even in presence of neutralizing anti-IL-4 antibody ([Fig. 3B](#)). This result demonstrates that the hyperproliferation observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes is IL-4-independent.

Upon activation, T cells proliferate and die by apoptosis. This active form of apoptosis requires TCR stimulation and involves some death signals, including Fas/FasL engagement (27). In fact, lymphoproliferative disorders have been linked to defects in T-cell apoptosis in mice that possess nonfunctional Fas or FasL genes (28–30). Because NFAT transcription factors regulate

expression of the FasL gene (15, 16), one explanation for the hyperproliferation phenotype of NFATC2^{-/-} mice would be a defect in apoptosis of NFATC2^{-/-} lymphocytes. To address this question, we analyzed cell death. Surprisingly, NFATC2^{-/-} cultures contained an increased number of dead cells after *in vitro* stimulation with antigen when compared with NFATC2^{+/+} cultures (Fig. 4A). Furthermore, NFATC2^{-/-} cultures also contained more annexin-V-positive cells than NFATC2^{+/+} cultures upon antigen stimulation (Fig. 4B). Analysis of gene expression showed that NFATC2^{-/-} lymphocytes had no impairment of FasL gene expression (Barboza and Viola, unpublished observations). These results demonstrate that the lymphocyte hyperproliferation of NFATC2^{-/-} mice is not related to diminished apoptosis and, conversely, that NFATC2^{-/-} cells show an enhanced cell death rate in addition to hyperproliferation.

Upon activation, lymphocytes initiate cell cycle progression and proliferate. Accumulating evidence indicates that active apoptosis is related to the cell cycle. Indeed, it has been shown that T cells are more susceptible to apoptosis in late G1 or S phase of the cell cycle (4, 31–33). Based on these results, we asked whether hyperproliferation of NFATC2^{-/-} lymphocytes might be due to cell cycle deregulation. In fact, cell cycle analysis of lymph node cells stimulated *in vitro* with antigen demonstrated that NFATC2^{-/-} cultures contained an increased cell number in S-G2/M phases when compared with NFATC2^{+/+} cultures at 72 h (Fig. 5A). Furthermore, in a time course analysis, NFATC2^{-/-} cultures contained more cells in S-G2/M phases at 48 and 72 h after OVA stimulation (Fig. 5B).

These data suggest that the NFATC2^{-/-} cell hyperproliferation might be related to an altered cell cycle in NFATC2^{-/-} lymphocytes. One possibility to explain these results would be that NFATC2^{-/-} lymphocytes showed a shortening of time to cell division upon activation. To investigate this hypothesis, we assessed cellular replication by analysis of NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} lymphocytes labeled with CFSE. As shown in Figure 6, only NFATC2^{-/-} cultures contained cells in the first cell division after 42 h of *in vitro* stimulation with anti-CD3. Furthermore, NFATC2^{-/-} cultures also contained more cells at 2, 3, and 4 divisions when compared with NFATC2^{+/+} cultures after 65 h of stimulation (Fig. 6). These results suggested that hyperproliferation of NFATC2^{-/-} lymphocytes could be related to an altered cell cycle due to a shortening in time of cell division by these cells.

The cell cycle is controlled by a family of protein kinases, which has its activities regulated in response to cellular signals. Complexes of cyclin with cyclin-dependent kinase (CDK) play a central role in the control of cell cycle progression. The expression of specific cyclins dictate formation of distinct cyclin/CDK complexes at different points of the cell cycle. Because cyclins are regulated at the gene expression level, they could represent important candidates for transcriptional control by the NFATC2 transcription factor. To investigate the role of NFATC2 in the expression of cyclin genes, we analyzed cyclin mRNA expression by RNase protection assay. As shown in Figure 7A and 7B, NFATC2^{-/-} lymphocytes present an overexpression of cyclins A2, B1, E, and F when compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes after antigen stimulation. Note that no differences in cyclin expression were observed in unstimulated cells from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice (data not shown). Overexpression of these cyclins support the evidence that the NFATC2^{-/-} lymphocyte hyperproliferation is related to a deregulation in cell cycle control.

DISCUSSION

In this work, we evaluated the role of NFATC2 transcription factor in the regulation of cell cycle progression during lymphocyte activation. Our results demonstrated that NFATC2^{-/-} lymphocytes display an enhanced proliferative response to antigen, suggesting that the NFATC2 transcription factor might exert an inhibitory effect on normal lymphocytes during antigen stimulation. Furthermore, the hyperproliferation observed in NFATC2^{-/-} mice is not restricted to one specific lymphocyte subpopulation. Our data also provide evidence that the hyperproliferation observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes is not dependent on APC, because these lymphocytes continue to hyperproliferate upon stimulation that bypasses antigen presentation, such as anti-CD3 or PMA plus ionomycin (data not shown). Together, these results demonstrate that the hyperproliferation phenotype observed in NFATC2^{-/-} cells is mediated by an intrinsic mechanism conserved in all lymphocyte subsets.

It has been demonstrated that NFATC2^{-/-} lymphocytes preferentially differentiate to give a Th2 immune response characterized by overexpression of IL-4 (22, 24, 25). Although IL-4 is a potent growth factor for Th2 and B cells, we demonstrated that the enhanced proliferative response to antigen observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes is independent of IL-4 overexpression. Another cytokine that plays a central role in T-cell proliferation is IL-2. The proliferative response of T cells is initiated by engagement of IL-2 with its receptor, and this interaction promotes cell cycle progression of these cells. However, the hyperproliferative response of NFATC2^{-/-} cells does not seem to be related to IL-2 overexpression, because NFATC2^{-/-} lymphocytes present normal levels of IL-2 when compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes upon *in vitro* stimulation with OVA or anti-CD3 (24, 25). Furthermore, no differences in CD25 expression were observed between NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} lymphocytes from naive or OVA-sensitized mice (data not shown). These results strongly support the idea that the hyperproliferative phenotype observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes is dependent on a cell-intrinsic mechanism and that the NFATC2 transcription factor is a key regulator of the responsiveness of lymphocytes to antigen.

Cell proliferation is one of the first events that occurs during lymphocyte activation upon antigen stimulation. Naive lymphocytes are quiescent and start the cell cycle progression in response to stimulation. Our results provide strong evidence that the hyperproliferative phenotype observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes is related to an altered cell cycle control. Upon antigen stimulation, NFATC2^{-/-} mice present more cells in S-G2/M phases of the cell cycle in comparison with NFATC2^{+/+} mice. In addition, CFSE analysis demonstrated that NFATC2^{-/-} lymphocytes present an increased rate of cellular replication. These data suggested that the NFATC2^{-/-} cells present a deregulated cell cycle, which could be due to a shortened cell cycle. Recently, it has been shown that the hyperproliferative response of CD4⁺ cells from a double deficient mice NFATC2^{-/-} x NFATC3^{-/-} is related to a shortening time of cell division (34). In combination, these results suggest that NFAT proteins have an important action in regulating an intrinsic capacity of cellular replication.

Although CFSE analysis demonstrated that NFATC2^{-/-} cultures contained more cells undergoing up to three rounds of divisions when compared with NFATC2^{+/+} cultures at later time points (65 h), NFATC2^{+/+} cultures still present a large population of cells that had not suffered any division at this time point. Based on this fact, we may also consider as an additional,

albeit nonexclusive explanation, the possibility that NFATC2^{-/-} lymphocytes, upon activation, reach the first cell division faster than NFATC2^{+/+} lymphocytes, and thus exit the resting state faster than NFATC2^{+/+}. This result is in accordance to the data from the double deficient mice NFATC2^{-/-} x NFATC3^{-/-} that present a reduced time to reach the first cell division due to an increased TCR responsiveness (34). This finding could explain why NFATC2^{-/-} cultures present more proliferating cells than NFATC2^{+/+} cultures. In fact, NFATC2^{-/-} cultures contains more CD4⁺ and CD8⁺ cells with the CD44⁺CD62L^{low} phenotype when compared with NFATC2^{+/+} cultures (data not shown). Thus, NFATC2 transcription factor may act as a negative regulator of very early inducible genes that controls the commitment of resting cells to become activated upon stimulation, including genes that regulate the cell cycle entrance and T-cell differentiation.

The timing of the cell cycle is regulated by a complex network of proteins, including the cyclins. Interestingly, NFATC2^{-/-} lymphocytes present an overexpression of cyclins A2, B1, E, and F upon stimulation when compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes. Cyclins A2 and E play a key role in the control of cell cycle progression and cell division. Cyclins E and A2 are expressed at early and late stages of G1 phase of the cell cycle, respectively. These two cyclins are implicated in propelling cells to enter into S phase, and cyclin A2 also promotes passage through S into G2 and M phases (35–37). It was reported that overexpression of cyclin E accelerates the G1/S phase transition, which leads cells to present a shortening in time of cell cycle (38–40). Furthermore, cyclin A and cyclin E are overexpressed in some types of lymphoproliferative diseases, such as leukemias (40–42). These data support the evidence that NFATC2^{-/-} lymphocytes may present a shortening time of cell division that might be mediated by the overexpression of cyclins A2 and E.

Thus, our results suggest that the NFATC2 transcription factor may regulate the expression of genes that control cell cycle in lymphocytes. Several data support this evidence. In fact, cyclosporin A inhibits lymphocyte proliferation by arresting the cells at G1 phase of the cell cycle (Silva-Carvalho and Viola, unpublished observations). In addition, cyclosporin A and FK506 inhibited the expression of cyclins A and E but did not have any effect on cyclin D1 expression (43). Calcineurin, which is the major phosphatase that regulates NFAT activation, is the direct target of the immunosuppressive agents cyclosporin A and FK506 (14). Preliminary data demonstrated a putative binding site for NFAT transcription factors on the cyclin A2 proximal promoter (Silva-Carvalho and Viola, unpublished observations). Actually, it has been suggested that NFATC2 transcription factor may have a negative effect on gene transcription, acting as a repressor of the expression of some genes, such as IL-4 (24). This evidence supports the hypothesis that NFATC2 transcription factor could have a direct role in controlling the expression of cell cycle-related genes, and thus may directly play a negative effect in the regulation of some cyclins.

Several observations suggest an involvement of the cell cycle in lymphocyte activation, differentiation, and death by apoptosis. It has been demonstrated that activated induced T-cell death is dependent on the cell cycle, and T cells need to enter the G1 phase of the cell cycle in order to die by apoptosis in response to stimulation (1, 3, 4). Thus, it is expected that lymphocytes that present a hyperproliferative response to antigen would also present an enhanced rate of apoptosis. This evidence is in accordance with our results demonstrating that

NFATC2^{-/-} lymphocytes also present an increased rate of cell death by apoptosis in comparison with NFATC2^{+/+} lymphocytes. Furthermore, NFATC2^{-/-} lymphocytes present an overexpression of cyclin B1 when compared with NFATC2^{+/+} lymphocytes. Although there is some evidence that overexpression of this cyclin has no effect on cell cycle dynamics (38), it has been shown that cyclin B1 is related to activation-induced cell death in T cells (1). These data are in agreement with our findings that NFATC2^{-/-} lymphocytes present an enhanced active form of apoptosis.

However, there are conflicting results with regard to the involvement of the cell cycle in Th differentiation. It has been suggested that the IL-4 expression in Th2 cells is dependent of the cell cycle progression (2). However, Grogan and coworkers suggested that the cell cycle is important for the commitment of Th phenotype during the response to stimulation but not for the IFN- γ or IL-4 expression (5). Recently, it has been shown that cell division plays a role in the frequency of IFN- γ - or IL-4-producing cells but that it is not essential for differentiation of Th lymphocytes (44). Although NFATC2^{-/-} mice present an hyperproliferative response in addition to an overexpression of Th2 cytokines, our results are not conclusive about the real involvement of the cell cycle in Th differentiation. However, we can hypothesize that the expression of genes that are involved in cell cycle control and in Th differentiation could be regulated in a coordinated way. The phenotype observed in NFATC2^{-/-} lymphocytes supports this idea. Because NFATC2 is a preexisting transcription factor, this protein has a very early effect on lymphocyte activation (11). Thus, we can speculate that NFAT transcription factors could simultaneously control the expression of early inducible genes that are related to Th differentiation and genes that regulate the cell division “clock.” In conclusion, our data provide strong evidence that the NFATC2 transcription factor could play an important role in cell cycle control during lymphocyte activation by regulating cyclin expression. Furthermore, they also suggest that NFAT transcription factor acts as an ubiquitous regulator of gene expression that might be reflected in lymphocyte activation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are especially grateful to Dr. Anjana Rao and Dr. Patricia Bozza for comments on the work and the manuscript. We are in debt to Dr. Anjana Rao for providing the NFATC2^{-/-} mice. We would like to thank the members of our laboratory for helpful advice and discussions. We thank Dr. Adriana Bonomo and Ramza Harab for help with FACS analysis. M.S.C. and A.V.A. were supported by a CAPES fellowship, L.K.T. was supported by an INCA/FAF fellowship, and M.B.F.W. was supported by a CNPq fellowship. This work was supported by an internal grant from INCA/FAF and FURNAS Centrais Elétricas S.A. and grants from CNPq (AI 520865/98-7) and FAPERJ (APQ1 171.949/1999) to J.P.B.V.

REFERENCES

1. Fotedar, R., Flatt, J., Gupta, S., Margolis, R.L., Fitzgerald, P., Messier, H., and Fotedar, A. (1995) Activation-induced T-cell death is cell cycle dependent and regulated by cyclin B. *Mol. Cell Biol.* **15**, 932–942

2. Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C-R., and Reiner, S.L. (1998) Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* **9**, 229–237
3. Karas, M., Zaks, T.Z., Liu, J.L., and Le Roith D. (1999) T cell receptor-induced activation and apoptosis in cycling human T cells occur throughout the cell cycle. *Mol. Biol. Cell* **10**, 4441–4450
4. Li, Q.S., Tanaka, S., Kisenge, R.R., Toyoda, H., Azuma, E., and Komada, Y. (2000) Activation-induced T cell death occurs at G1A phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3329–3337
5. Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., and Locksley, R.M. (2001) Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* **14**, 205–215
6. Lewis, R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 497–521
7. Anraku, Y., Ohya, Y., and Iida, H. (1991) Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1093**, 169–77
8. Tomono, M., Toyoshima, K., Ito, M., and Amano H. (1996) Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* **317**, 675–680
9. Terada, N., Lucas, J.J., and Gelfand, E.W. (1991) Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *J. Immunol.* **147**, 698–704
10. Baksh, S., De Caprio, J.A., and Burakoff S.J. (2000) Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase. *Oncogene* **19**, 2820–2827
11. Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707–747
12. Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., and Rao A. (1999) NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7214–7219
13. Trama, J., Lu, Q., Hawley, R.G., and Ho, S.N. (2000) The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J. Immunol.* **165**, 4884–4894
14. Kiani, A., Rao, A., and Aramburu J. (2000) Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* **12**, 359–372

15. Latinis, K.M., Norian, L.A., Eliason, S.L., and Koretzky G.A. (1997) Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 31427–31434
16. Holtz-Heppelmann, C.J., Algeciras, A., Badley, A.D., and Paya, C.V. (1998) Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J. Biol. Chem.* **273**, 4416–4423
17. Horsley, V., and Pavlath, G.K. (2002) NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* **156**, 771–774
18. Viola, J.P., and Rao, A. (1999) Molecular regulation of cytokine gene expression during the immune response. *J. Clin. Immunol.* **19**, 98–108
19. de la Pompa, J.L., Timmerman, L.A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A.J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., Crabtree, G.R., and Mak, T.W. (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**, 182–186
20. Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., and Glimcher, L.H. (1998) Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* **9**, 627–635
21. Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y.Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., Ohashi, P.S., Penninger, J.M., Crabtree, G.R., and Mak, T.W. (1998) The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**, 115–124
22. Hodge, M.R., Ranger, A.M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1996) Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**, 397–405
23. Xanthoudakis, S., Viola, J.P.B., Shaw, K.T.Y., Luo, C., Wallace, J.D., Bozza, P.T., Luk, D.C., Curran, T., and Rao, A. (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**, 892–895
24. Kiani, A., Viola, J.P.B., Lichtman, A.H., and Rao, A. (1997) Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* **7**, 849–860
25. Viola, J.P.B., Kiani, A., Bozza, P.T., and Rao A. (1998) Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* **91**, 2223–2230
26. Vindelov, L.L. (1977) Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **24**, 227–242

27. Lenardo, M.J., Chan K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999) Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 221–253
28. Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991) Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 243–269
29. Russell, J.H., and Wang, R. (1993) Autoimmune gld mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2379–2382
30. Russell, J.H., Rush, B., Weaver, C., and Wang, R. (1993) Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4409–4413
31. Boehme, S.A., and Lenardo, M.J. (1993) Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1552–1560
32. Fournel, S., Genestier, L., Robinet, E., Flacher, M., and Revillard, J.P. (1996) Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **157**, 4309–4315
33. Lissy, N.A., Van Dyk, L.F., Becker-Hapak, M., Vacero-Akbani, A., Mendler, J.H., and Dowdy, S.F. (1998) TCR antigen-induced cell death occurs from late G1 phase of the cell cycle checkpoint. *Immunity* **8**, 57–65
34. Rengarajan, J., Tang, B., and Glimcher, L.H. (2002) NFATc2 and NFATc3 regulate Th2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive Th cells. *Nat. Immunol.* **3**, 48–54
35. Desdouets, C., Thoresen, G.H., Senamaud-Beaufort, C., Christoffersen, T., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1999) cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 118–122
36. Roberts, J.M. (1999) Evolving ideas about cyclins. *Cell* **98**, 129–132
37. Blanchard, J.M. (2000) Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at G1/S transition by peripheral cues. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1179–1184
38. Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S.I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1669–1679
39. Liu, J.J., Chao, J.R., Jiang, M.C., Ng, S.Y., Yen, J.J., and Yang-Yen, H.F. (1995) Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3654–3663

40. Scuderi, R., Palucka, K.A., Pokrovskaja, K., Bjorkholm, M., Wiman, K.G., and Pisa, P. (1996) Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood* **87**, 3360–3367
41. Kramer, A., Hochhaus, A., Saussele, S., Reichert, A., Willer, A., and Hehlmann, R. (1998) Cyclin A1 is predominantly expressed in hematological malignancies with myeloid differentiation. *Leukemia* **12**, 893–898
42. Yang, R., Nakamaki, T., Lubbert, M., Said, J., Sakashita, A., Freyaldenhoven, B.S., Spira, S., Huynh, V., Muller, C., and Koeffler, H.P. (1999) Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood* **93**, 2067–2074
43. Tomono, M., Toyoshima, K., Ito, M., Amano, H., and Kiss, Z. (1998) Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblast. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 374–378
44. Ben-Sasson, S.Z., Gerstel, R., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001) Cell division is not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN-gamma or IL-4. *J. Immunol.* **166**, 112–120

Received April 23, 2002; accepted August 15, 2002.

Fig. 1

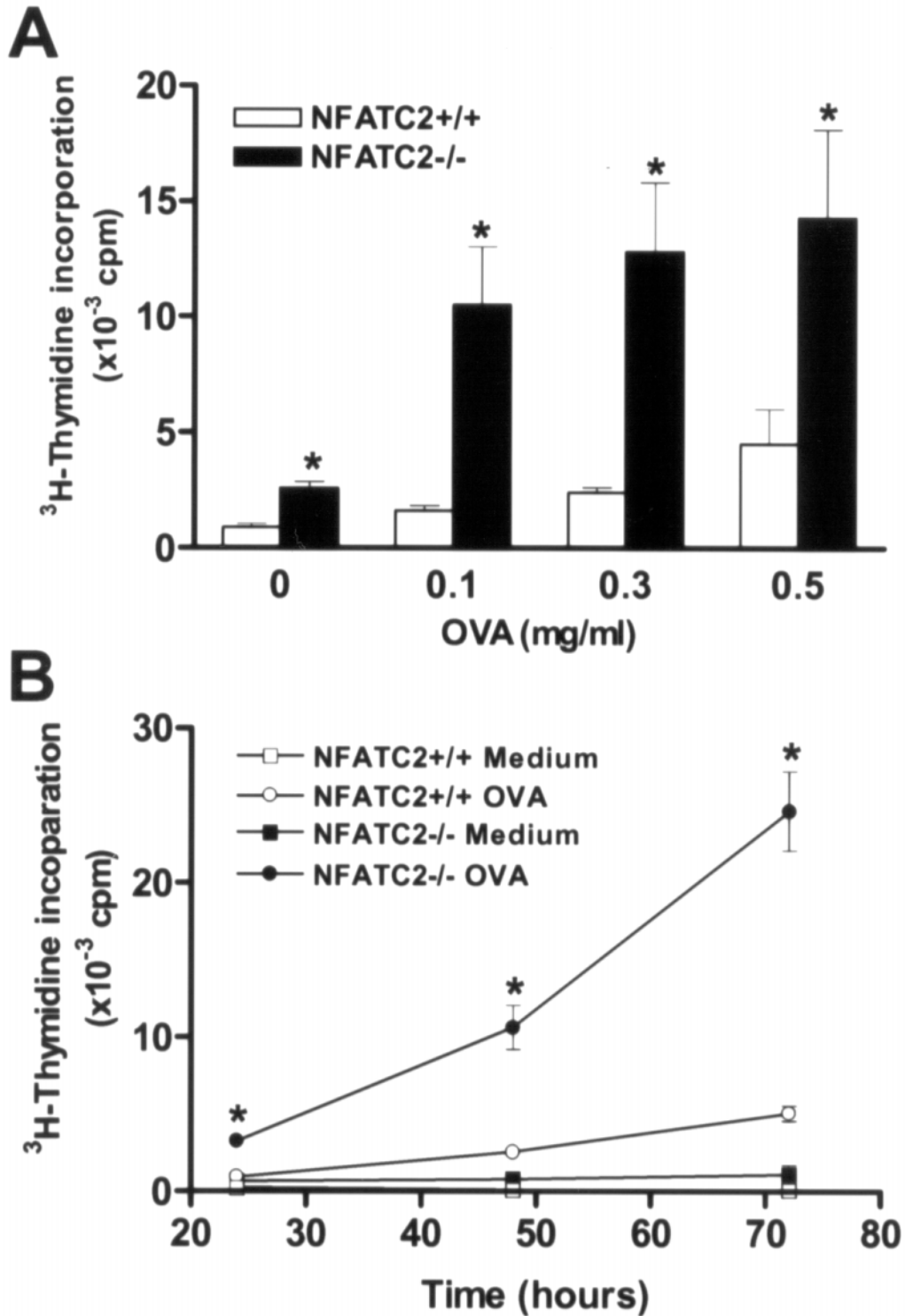


Figure 1. Proliferation assay of lymph node cells from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice. Animals were sensitized and cells (2×10^5 cells/well) were left unstimulated or stimulated *in vitro* with ovalbumin (OVA) as described. **A)** Lymph node cells from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} were stimulated with different concentrations of OVA (0.1–0.5 mg/ml) or left unstimulated (medium) for 72 h. **B)** Lymph node cells from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} were stimulated with OVA (0.5 mg/ml) or left unstimulated (medium) for 24, 48, and 72 h. The results are expressed as mean \pm SE ($n=3$) and are representative of four independent experiments. *Data significantly greater than in NFATC2^{+/+} mice ($P<0.05$).

Fig. 2

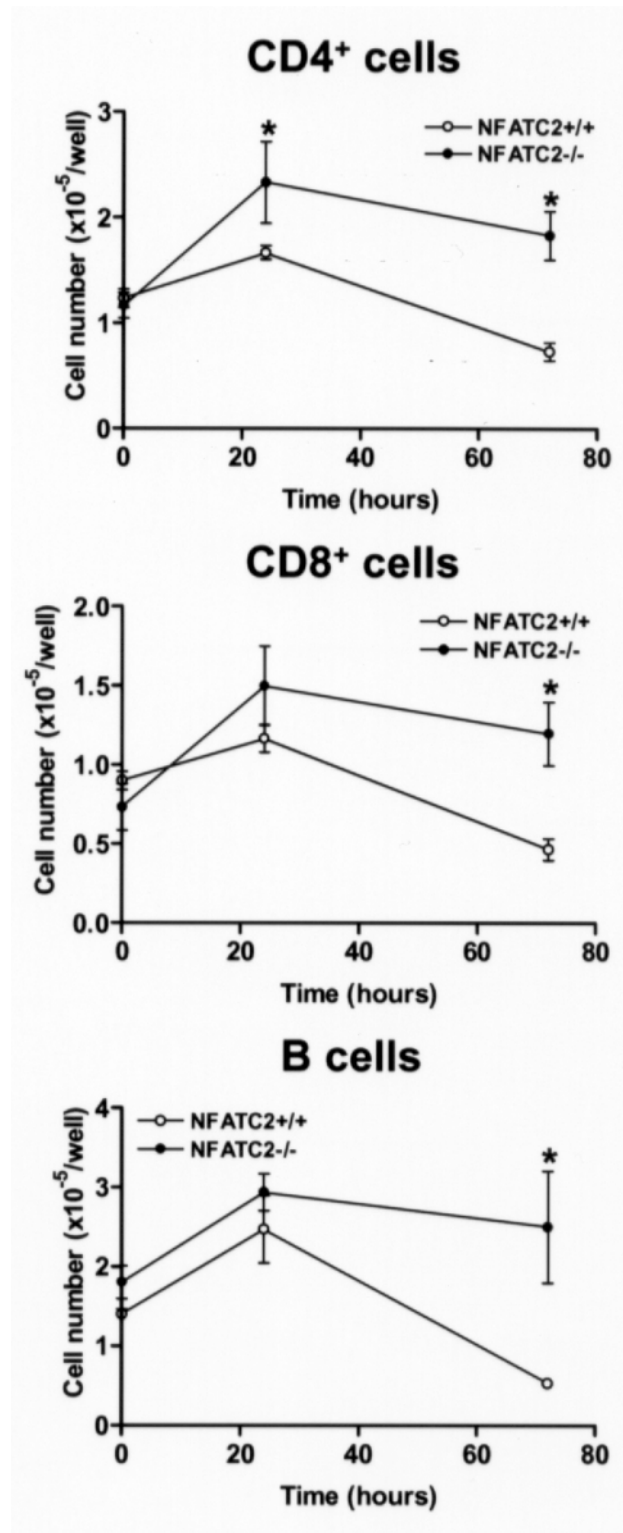


Figure 2. Analysis of subset populations of lymph node cells from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice. Animals were sensitized as described. Fifteen days later, draining lymph nodes were collected and cells (2×10^5 cells/well) were stimulated *in vitro* with ovalbumin (0.5 mg/ml) for 0, 24, and 72 h. At indicated time points, cells were stained with specific fluorochrome-labeled antibodies as described and then analyzed by flow cytometry. The results are expressed as mean \pm SE ($n=3$) and are representative of three independent experiments. *Data significantly greater than in NFATC2^{+/+} mice ($P < 0.05$).

Fig. 3

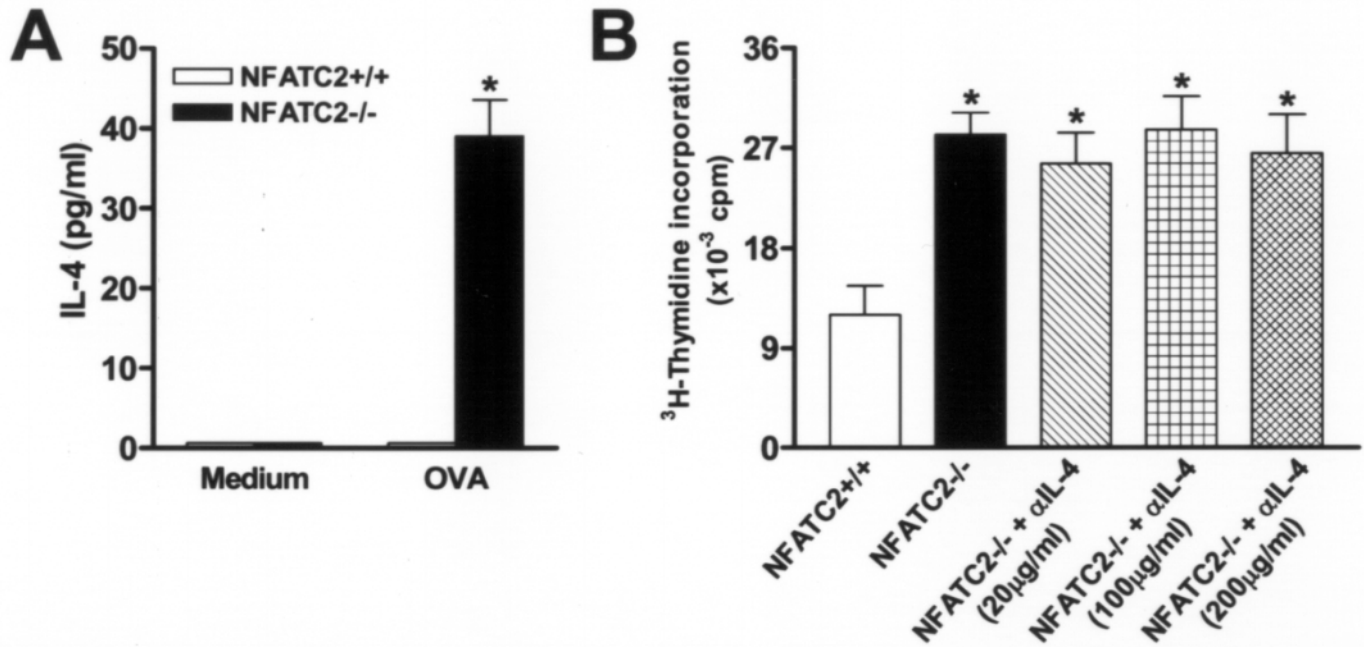


Figure 3. Effect of IL-4 in the hyperproliferation of NFATC2^{-/-} lymphocytes. Animals were sensitized and *in vitro* stimulated with antigen as described. **A**) Analysis of IL-4 production by NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} lymphocytes. Lymph node cells (2×10^6 cells/well) from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice were left unstimulated or stimulated *in vitro* with ovalbumin (OVA) (0.5 mg/ml) for 72 h, and then IL-4 was measured by ELISA as described. **B**) Proliferation assay of lymph node cells treated with neutralizing anti-IL-4 antibody. Lymph node cells (2×10^5 cells/well) from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice were stimulated *in vitro* with OVA (0.5 mg/ml) without or with anti-IL-4 antibody (20, 100, and 200 μ g/ml) for 72 h, and then the proliferation was assessed as described. The results are expressed as mean \pm SE ($n=3$) and are representative of two independent experiments. *Data significantly greater than in NFATC2^{+/+} mice ($P<0.05$).

Fig. 4

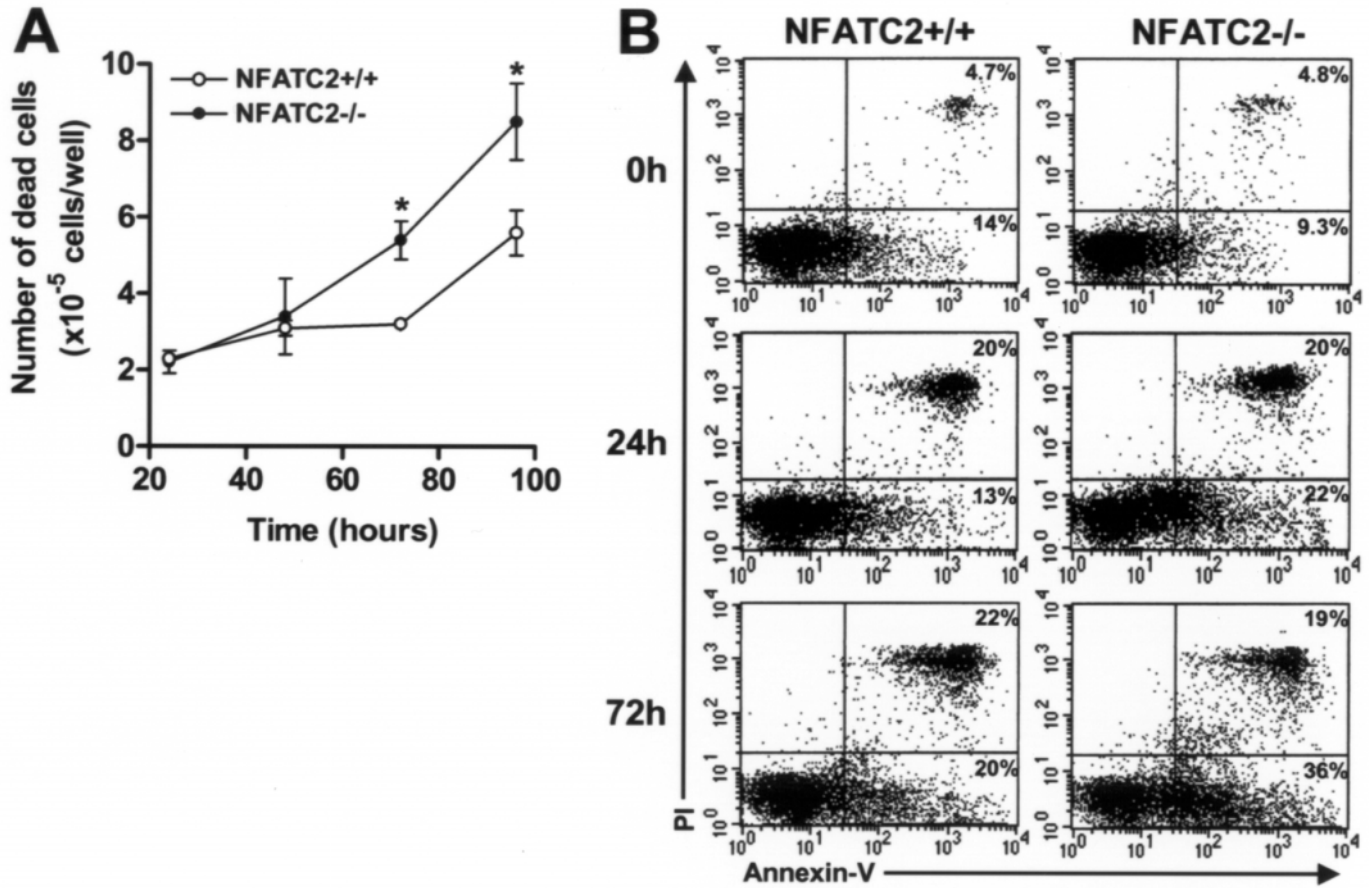


Figure 4. Cell death analysis of lymphocytes from NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} mice. Animals were sensitized and *in vitro* stimulated with ovalbumin (OVA) (0.5 mg/ml) as described. **A)** Kinetics of the number of dead cells after *in vitro* stimulation with OVA. Cells were collected, and their viability was measured by the capacity of Trypan blue exclusion at the indicated time. The results are expressed as mean \pm SE ($n=3$) and are representative of three independent experiments. *Data significantly greater than in NFATC2^{+/+} mice ($P<0.05$). **B)** Analysis of cell death by apoptosis after *in vitro* stimulation with OVA. Cells committed to apoptosis were measured by the capacity of annexin V binding. At indicated time points, cells were stained with annexin V/FITC as described and were then analyzed by flow cytometry. The results are from a pool of three mice and are representative of three independent experiments.

Fig. 5

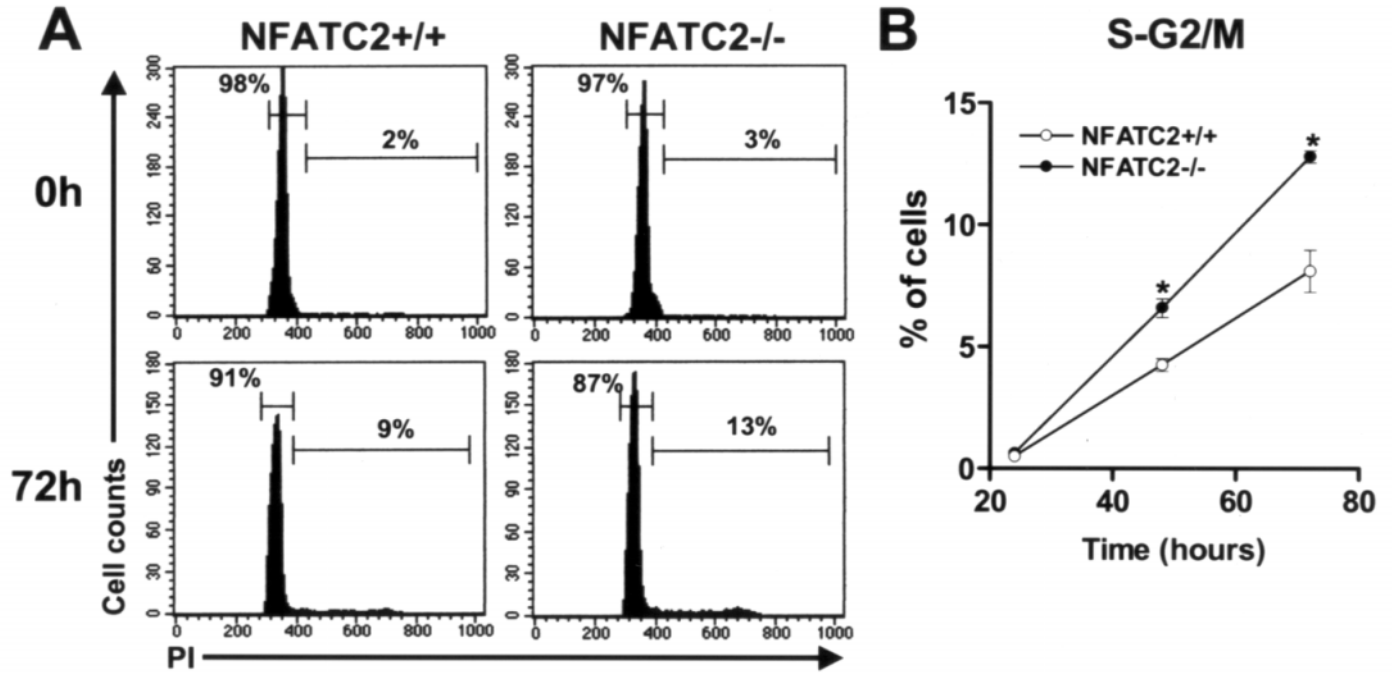


Figure 5. Cell-cycle analysis of NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} lymphocytes. Animals were sensitized as described. Fifteen days later, cells from draining lymph nodes were collected and *in vitro* stimulated with ovalbumin (OVA) (0.5 mg/ml) for 24, 48, and 72 h. At indicated time points, cells (4×10^5 cells/well) were collected and stained with propidium iodide in the presence of NP-40 as described and were then analyzed by flow cytometry. **A**) Representative histogram of 0 and 72 h after OVA stimulation of NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} cells. The results are representative of 12 independent animals. **B**) Distribution of percent number of cells in S-G2/M phases after OVA stimulation at 24, 48, and 72 h. The results are expressed as mean \pm SE ($n=3$) and are representative of four independent experiments. *Data significantly greater than in NFATC2^{+/+} mice ($P<0.05$).

Fig. 6

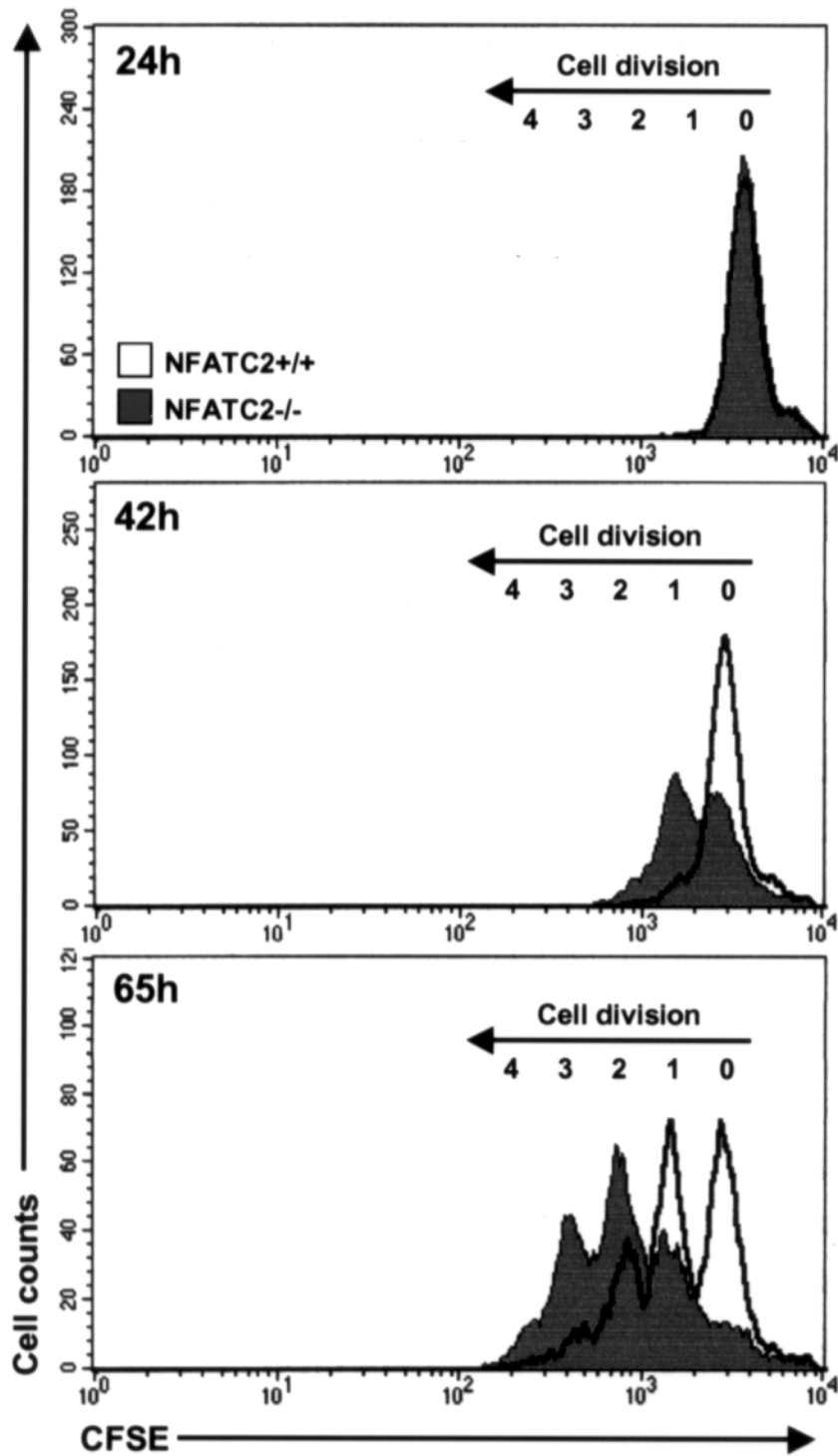


Figure 6. Analysis of cell division upon anti-CD3 stimulation. Animals were sensitized as described. Fifteen days later, cells (10^7 cells/ml) from draining lymph nodes were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as described, and then cells (2×10^5 cells/well) were *in vitro* stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24, 42, and 65 h. At indicated time points, cells were analyzed by flow cytometry. The results are representative of six independent animals.

Fig. 7

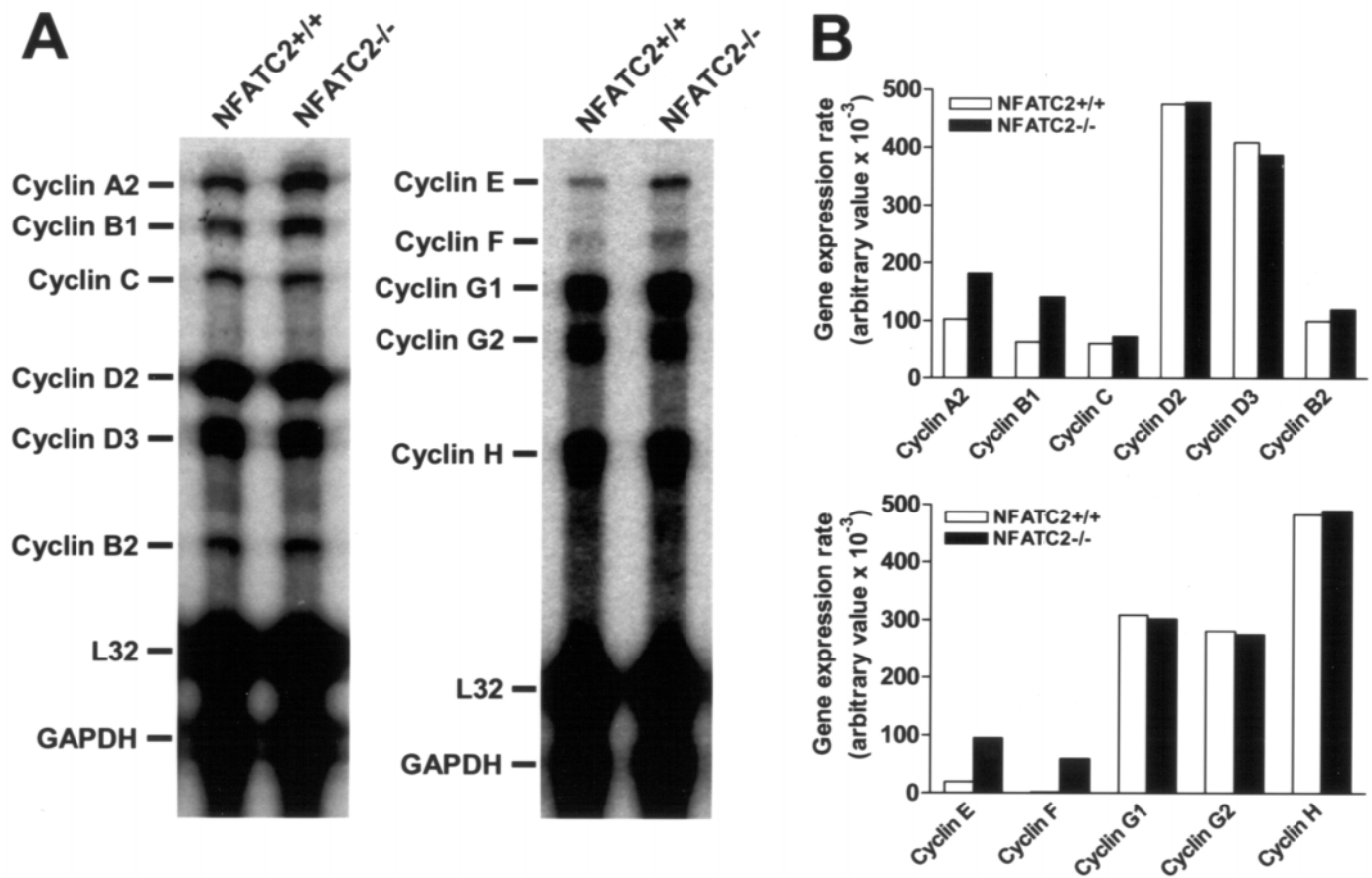


Figure 7. Analysis of cyclins expression of NFATC2^{+/+} and NFATC2^{-/-} cells. Animals were sensitized and *in vitro* stimulated as described. Cells (2×10^7) were *in vitro* stimulated with ovalbumin (OVA) (0.5 mg/ml) for 24 h and collected, and then total RNA was immediately extracted as described. **A)** Analysis of cyclin mRNA expression by RNase protection assay with a multiprobe assay. RNA loading was estimated by measuring the intensities of two housekeeping genes (L32 and GAPDH). Transcript levels were analyzed by autoradiography. **B)** Quantification of cyclin mRNA levels from **Figure 7A** by densitometry. The values are expressed relative to the housekeeping genes (L32 and GAPDH). The results are from a pool of three mice and are representative of three independent experiments.

Apêndice 8.1.2. Teixeira LK, Fonseca BPF, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, Bozza PT, Viola JPB (2005). IFN- γ production by CD8⁺ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol*, 175: 5931-5939.

IFN- γ Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation¹

Leonardo K. Teixeira,* Bruna P. F. Fonseca,* Adriana Vieira-de-Abreu,[†] Bianca A. Barboza,* Bruno K. Robbs,* Patrícia T. Bozza,[†] and João P. B. Viola^{2*}

CD8⁺ T lymphocytes are excellent sources of IFN- γ ; however, the molecular mechanisms that dictate IFN- γ expression upon TCR stimulation in these cells are not completely understood. In this study, we evaluated the involvement of NFAT1 in the regulation of IFN- γ gene expression in murine CD8⁺ T cells and its relevance during Th differentiation. We show that CD8⁺, but not CD4⁺, T cells, represent the very first source of IFN- γ upon primary T cell activation, and also that the IFN- γ produced by naive CD8⁺ T cells may enhance CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro*. TCR stimulation rapidly induced IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes in a cyclosporin A-sensitive manner. Evaluation of CD8⁺ T cells showed that calcium influx alone was sufficient to activate NFAT1 protein, transactivate IFN- γ gene promoter, and induce IFN- γ production. In fact, NFAT1-deficient mice demonstrated highly impaired IFN- γ production by naive CD8⁺ T lymphocytes, which were totally rescued after retroviral transduction with NFAT1-encoding vectors. Moreover, NFAT1-dependent IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment was crucial to control a Th2-related response *in vivo*, such as allergic inflammation. Consistently, CD8 α - as well as IFN- γ -deficient mice did not mount a Th1 immune response and also developed *in vivo* allergic inflammation. Our results clearly indicate that IFN- γ production by CD8⁺ T cells is dependent of NFAT1 transcription factor and may be an essential regulator of Th immune responses *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 5931–5939.

Upon T cell stimulation, CD4⁺ T lymphocytes may undergo a Th1/Th2 differentiation that is mostly characterized by the distinct pattern of cytokines they secrete. Th1 cells produce IFN- γ , which is essential for the eradication of intracellular pathogens, whereas Th2 cells secrete IL-4, IL-5, and IL-13, which are crucial to the elimination of extracellular organisms and to sustain allergic reactions. Several factors can influence the differentiation pathway of CD4⁺ Th cells, especially the cytokines prevailing within the microenvironment where these cells encounter Ags (1, 2). IL-12 and IFN- γ are known to be the major Th1-inducing cytokines (3). IFN- γ is a pleiotropic cytokine that is essential for both innate and adaptive immunities (4), and its role in CD4⁺ Th1 differentiation has been intensely addressed. *In vitro* studies have shown that IFN- γ exerts both indirect and direct effects during Th1 development (5, 6). It induces APCs to produce IL-12, which is of great importance during Th1 cell commitment (7, 8). In addition, IFN- γ is responsible for inducing/maintaining the expression of the β -chain of the IL-12R (IL-12R β 2) on CD4⁺ T cells, indicating an important role for IFN- γ in the Th1 effects mediated by IL-12 (9, 10). Furthermore, IFN- γ and Th1 responses are considered to be protective against Th2-related disorders such

as asthma and allergy (11–13). In animal models, the adoptive transfer of IFN- γ -producing cells into allergen-sensitized recipients has protected from airway eosinophilia after Ag challenge (14, 15). Defective IFN- γ production also predisposes toward the development of allergic diseases, and patients with severe asthma present significantly reduced IFN- γ production in response to allergen compared with control individuals (16, 17).

Different transcription factors have been shown to regulate IFN- γ gene expression in T lymphocytes (3, 18). In CD4⁺ T cells, T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ production in developing Th1 lymphocytes (19). However, T-bet expression is induced by IFN- γ signaling pathway through STAT1, and thus is dependent on an initial source of IFN- γ (10, 20). Several cellular compartments of the immune system have been characterized as potential sources of IFN- γ *in vivo*, including NK cells and CD8⁺ T cells (21, 22). It has been suggested that CD8⁺ T cells may represent an early source of IFN- γ , which acts directly on CD4⁺ Th1 differentiation (22). Nevertheless, there are no available data concerning the involvement of TCR-induced transcription factors in the regulation of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells.

NFAT proteins are pre-existing cytoplasmic transcription factors that are rapidly activated in T lymphocytes upon TCR stimulation (23). The activation of NFAT proteins requires sustained intracellular calcium levels that are induced shortly after TCR triggering (23, 24). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which dephosphorylates NFAT (25, 26). Once activated, NFAT translocates to the nucleus, where it binds to regulatory sequences and regulates the expression of several cytokine genes, including IFN- γ (27, 28). The process of NFAT activation is blocked by immunosuppressive drugs, such as cyclosporin A (CsA)³ and FK506, which inhibit the phosphatase activity of calcineurin (29, 30). In fact, NFAT1-deficient mice

*Division of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil; and [†]Laboratory of Immunopharmacology, Department of Physiology and Pharmacodynamics, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Received for publication February 4, 2005. Accepted for publication August 24, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino, Furnas Centrais Elétricas S.A. and Conselho Nacional de Pesquisas (to J.P.B.V.); and Howard Hughes Medical Institute and Conselho Nacional de Pesquisas (to P.T.B.). L.K.T. and B.A.B. were supported by an Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino fellowship; B.P.F.F., A.V.-A. and B.K.R. were supported by a Conselho Nacional de Pesquisas fellowship.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. João P. B. Viola, Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro, Brasil 20231-050. E-mail address: jpviola@inca.gov.br

³ Abbreviations used in this paper: CsA, cyclosporin A; EGFP, enhanced GFP; Eomes, eomesodermin; IRES, internal ribosomal entry sequence.

(NFAT1^{-/-}) present a preferential differentiation toward a Th2 phenotype, including low levels of IFN- γ and high levels of IL-4 (31, 32). Consistently, CD4⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice present an impaired IFN- γ production (33), but no reports regarding the participation of NFAT1 in the regulation of IFN- γ in CD8⁺ T lymphocytes have been described.

Thus, we addressed the involvement of NFAT1 transcription factor in the regulation of IFN- γ production in CD8⁺ T cells and its influence on Th1/Th2 immune responses using *in vitro* and *in vivo* models of Th differentiation. In this study we show that naive CD8⁺ T cells do produce high levels of IFN- γ upon TCR triggering during the primary response, which is dependent on NFAT1 transcription factor. Also, we demonstrate that IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment enhances CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro* and is crucial to control allergic inflammation, which has been related to a Th1/Th2 immune response deregulation. Our results thus suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role in IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which may modulate Th immune response *in vivo*.

Materials and Methods

Animals, cells, and reagents

C57BL/6, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{-/-}, and IFN- γ ^{-/-} 8- to 12-wk-old female mice were used in all experiments. Animals were bred and maintained in the Brazilian National Cancer Institute animal facility. Animals were treated according to the animal care guidelines of the Council for International Organizations of Medical Sciences. All primary cells (lymph nodes, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes) and the mouse CD8⁺ CTLL-R8⁺ cell line were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine, streptomycin-penicillin, essential and nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, and 2-ME (all from Invitrogen Life Technologies). Hybridomas 2C11 (anti-CD3) and 53-6.7 (anti-CD8) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. All Abs were purified from hybridoma supernatants by chromatography over protein G (Amersham Biosciences), and their activities were functionally tested by cellular proliferation, complement-dependent depletion, and ELISA. The cytokines IFN- γ , IL-2, IL-12, and IL-18 were purchased from PepruTech. The polyclonal Ab 67.1 (Dr. A. Rao, Harvard University, Boston, MA) was used to detect the NFAT1 protein. PMA and ionomycin were obtained from Calbiochem, and the immunosuppressive drug CsA was obtained from LC Laboratories. CFA and OVA were purchased from Sigma-Aldrich. The solutions of May-Grünwald and Giemsa were obtained from Merck. Polybrene (hexadimethrin bromide) was obtained from Fluka Chemie, and chondroitin 6-sulfate sodium salt was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell isolation and flow cytometry

In all experiments, different cell populations (CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells) were obtained from lymph nodes (inguinal, brachial, axillary, and superficial cervical). Purified single-cell suspensions were isolated by negative selection with magnetic beads (Micro Beads, MACS technology) according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Streptavidin magnetic beads were conjugated to specific-biotinylated Abs (anti-CD4, anti-CD8, and anti-B220/CD45R) to sort out undesired cell populations. For cytometric analysis, cells were stained with specific fluorochrome-labeled Abs as previously described (32). Labeled mAbs were all obtained from BD Pharmingen, and cells were analyzed by flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences). Cell populations were isolated to >95% purity.

CD4⁺ Th differentiation

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were purified from C57BL/6 (IFN- γ ^{+/+}) or IFN- γ ^{-/-} as described. For cocultivation assays, CD4⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} mice were cultured together with CD8⁺ T cells from either IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice (CD4:CD8 ratio, 2:1) and primarily stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were harvested, washed, and rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were isolated again as described and were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cell-free supernatants were assessed for IFN- γ or IL-4 by ELISA.

ELISA and intracellular cytokine staining

Cells were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 24, 48, or 72 h at 37°C with different stimuli as indicated. Cell-free supernatant was as-

essed for IFN- γ and IL-4 protein levels by ELISA according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen). For intracellular cytokine staining, indicated cell populations (1 \times 10⁶ cells) from naive C57BL/6, NFAT1^{+/+}, and NFAT1^{-/-} mice were stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Brefeldin A (1/1000; Cytofix/Cytoperm; BD Pharmingen) was added to the culture 5 h before the staining procedure. Briefly, cells were harvested, and surface markers were stained with anti-CD8-FITC or anti-CD4-FITC Ab. Cells were next fixed and permeabilized for intracellular cytokine staining with anti-IFN- γ -PE Ab, then analyzed by flow cytometry.

RNase protection assays, Western blot, and immunofluorescence staining

For RNase protection assay analysis, purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁶ cells) from C57BL/6 mice were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 6 h at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before anti-CD3 stimulation. Total RNA was immediately extracted with TRIzol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen Life Technologies). mRNA expression was analyzed with a multiprobe RNase protection assay kit (Ribo-Quant; BD Pharmingen). For IFN- γ expression analysis, mCK-1 and mCK-2 multiprobe sets were used, and RNA loading was estimated by measuring GAPDH and L32 housekeeping genes.

To detect the presence of the NFAT1 protein, purified CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice or the CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 15 min at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before stimulation. Total protein lysates were obtained as previously described (26). Briefly, cells were lysed in buffer containing 40 mM Tris (pH 7.5), 60 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, and 5% SDS, followed by incubation at 100°C for 20 min. Small-scale nuclear extracts were made as previously described (34). Briefly, cells were resuspended in buffer containing 0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 2 mM leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF. The supernatant was removed to a separate tube, and the nuclear pellet was lysed in the same buffer as described above. Cell extracts were analyzed by electrophoresis on 6% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane, and NFAT1 protein was detected by the polyclonal Ab 67.1 as previously described (26).

Intracellular localization of NFAT1 protein was addressed in purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁵ cells) from C57BL/6 mice by immunofluorescence staining, also as previously described (26). Briefly, cells were attached to coverslips previously coated for 1 h with 2% gelatin and were left unstimulated or were stimulated for 16 h at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before ionomycin. Then cells were fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Nonidet P-40, and stained with anti-NFAT1 67.1 Ab. The cells were photographed under \times 100 magnification with a Zeiss Axiovert S100 microscope.

Retroviral construction and lymphocyte transduction

The pLIREs-EGFP bicistronic vector was constructed by inserting a 1.4-kb *BgIII-NoI* fragment from the pIRES2-EGFP vector (BD Clontech), comprising the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sequence (IRES) and the enhanced GFP (EGFP) coding region, into the pLEGFP-N1 retroviral vector (BD Clontech; pLIREs-EGFP-empty). To generate the retroviral vector encoding for NFAT1, the full-length cDNA from NFAT1 isoform C was cloned into the pLIREs-EGFP (pLIREs-EGFP-NFAT1). Then, the BD Eco-Pack2 ecotropic packing cell line (BD Biosciences) was transiently transfected with retroviral vectors by calcium phosphate precipitation for 16 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection, and concentrated as previously described (35). The supernatant was supplemented with IL-2 (20 U/ml), and immediately used for spin infection (twice, 45 min each time, 1800 rpm, room temperature) of purified CD8⁺ T cells from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice previously stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for 24 h. Infected cells were incubated at 37°C for an additional 48 h, supplemented with fresh medium, and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for another 48 h. Cells were then stained for intracellular cytokine as described above, and EGFP⁺ CD8⁺ lymphocytes were analyzed by flow cytometry for IFN- γ production as described.

Transactivation assays

CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) was electroporated (950 μ F, 250 V) in a 0.4-cm GenePulser Cuvette (Bio-Rad) with 5 μ g of the indicated IFN- γ -promoter constructs fused to a luciferase reporter gene (Luc; donated by Dr. C. Wilson, University of Washington, Seattle, WA) (28) in serum-free

medium. After 24 h, cells were washed and left unstimulated or were stimulated in vitro for 16 h at 37°C with PMA (10 nM) or ionomycin (5 μ M) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before any other treatment when indicated. The next day, cells were harvested, and lysis was performed for 20 min at room temperature with 50 μ l of 1 \times cell culture lysis reagent (Promega). Crude extract (10 μ l) was added to 100 μ l of luciferase assay substrate (Promega). Luciferase activity was promptly measured in a Monolight 3010 Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) and was expressed as relative light units.

Eomesodermin (Eomes) RT-PCR

Purified CD8⁺ T cells (2×10^6 cells) from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice were left unstimulated (0 h) or were in vitro stimulated for the indicated time periods at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), and semiquantitative RT-PCR for murine Eomes expression was performed using the Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). The primers used were as follows: Eomes, 5'-GCC CAC GTC TAC CTG TGC AAC CG-3' and 5'-TGT TAT TGG TGA GTT TTA ACT TCC C-3' (334-bp product); and GAPDH, 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' and 5'-ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA-3' (276-bp product). PCR conditions were as follows: 95°C for 3 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s; and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Pleurisy model

Naive animals were s.c. sensitized with 200 μ g (0.1 ml) of OVA emulsified in CFA in a hind footpad, as previously described (36). Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, thoracic cavity was rinsed with 1 ml of PBS/0.1% BSA. Cells were then cytocentrifuged and stained with May-Grünwald/Giemsa for differential leukocyte analysis. Draining lymph nodes (popliteal and inguinal) were harvested, and cells (2×10^6 cells) were stimulated in vitro for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were then assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. For in vivo CD8⁺ T cell depletion, NFAT1^{+/+} mice were i.v. treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days in a total of five injections before sensitization (NFAT1^{+/+} and anti-CD8). Thereafter, mice continued to be treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days until challenge. CD8⁺ T cell depletion was evaluated by flow cytometry of lymph nodes, which always showed <3% CD8⁺ T cells.

Statistical analysis

Statistical analysis of values from wild type (+/+) and knockout (-/-) mice and between control and treated groups was performed using unpaired Student's *t* test for single comparison. A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Influence of IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation

The cytokine IL-12 was initially characterized as the dominant cytokine influencing the Th1 phenotype (3, 7, 8). However, additional studies have shown that other cytokines, such as IFN- γ , may also play a role during Th1 development (5, 6). In an in vitro model of Th differentiation, disruption of IFN- γ R signaling pathway drastically reduced IFN- γ production by CD4⁺ T cells even when stimulated in the presence of IL-12, indicating that IFN- γ directly enhances CD4⁺ Th1 differentiation (data not shown). Several cellular sources of IFN- γ may enhance CD4⁺ Th1 differentiation, such as NK, dendritic cells and CD8⁺ T cells (3, 21, 22). As shown in Fig. 1A, upon TCR stimulation of primary lymph node cells, CD8⁺ T lymphocytes represent the very first source of IFN- γ production. To specifically address the influence of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation, naive CD4⁺ T lymphocytes cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3. After this primary stimulation, CD4⁺ T lymphocytes were purified, stimulated in vitro, and assessed for their ability to produce IFN- γ and IL-4. We observed in this study that

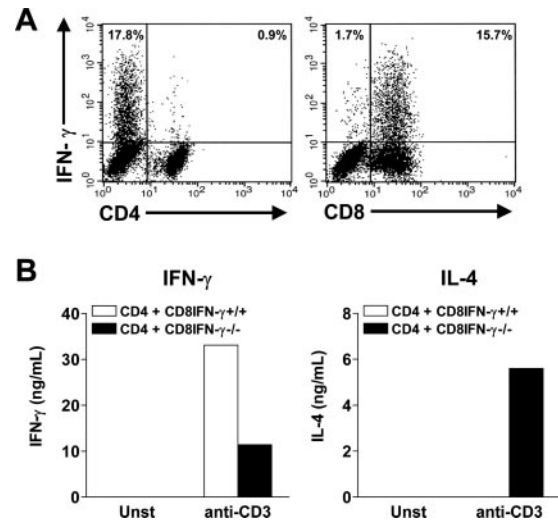


FIGURE 1. IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes enhances CD4⁺ Th1 differentiation. *A*, Total lymph node cells from naive C57BL/6 mice were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. Data are representative of three independent animals. *B*, Purified CD4⁺ T lymphocytes from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice, and then stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were purified again and were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. All results are from a pool of three mice and are representative of two independent experiments.

CD4⁺ T cells, which were cocultivated with IFN- γ -competent CD8⁺ T cells, clearly produce more IFN- γ and less IL-4 than those cocultivated with IFN- γ -deficient CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 1B). Thus, our results demonstrate that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells enhances Th1 phenotype development of CD4⁺ T lymphocytes during primary stimulation in vitro.

IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes

The molecular mechanisms that control IFN- γ gene expression in CD4⁺ Th cells are widely known; however, the mechanisms that dictate its expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. Thus, we decided to address the molecular pathways by which CD8⁺ T cells produce IFN- γ . We show in this study that purified naive CD8⁺ T cells produce IFN- γ upon TCR stimulation, but not in response to IL-12/IL-18 treatment alone (Fig. 2A). We also observed that the IFN- γ production level was not altered when anti-CD28 costimulation was administered together with anti-CD3 (data not shown). However, IL-12/IL-18 administration highly increased IFN- γ levels when associated with TCR triggering, suggesting that both cytokines may play a secondary role on TCR-induced IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2B). To evaluate the influence of other pathways in IFN- γ production, we stimulated naive CD8⁺ T cells with different stimuli. Surprisingly, ionomycin-driven Ca²⁺ influx was sufficient to induce IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which was slightly potentiated by PMA administration (Fig. 2C). However, PMA stimulation alone was not sufficient to induce IFN- γ production in these cells (Fig. 2C). In addition, we found that IFN- γ expression is totally dependent on TCR stimulation, because IFN- γ transcript levels could be detected as early as 6 h after TCR triggering, but not in unstimulated CD8⁺ T cells (Fig. 2D). In this study, we also show that IFN- γ expression/production by CD8⁺ T lymphocytes is totally inhibited when CsA is administered together

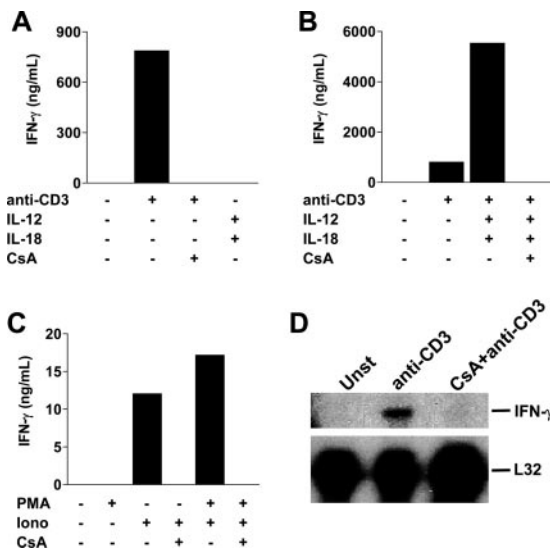


FIGURE 2. TCR triggering induces IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes in a CsA-sensitive manner. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated or stimulated in vitro as indicated: anti-CD3 (1 μ g/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml), PMA (10 nM), ionomycin (Iono; 5 μ M), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. *A–C*, Analysis of IFN- γ production by CD8⁺ T cells after 72 h of stimulation as indicated. Cell-free supernatant was assessed for IFN- γ by ELISA. *D*, Analysis of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells by RNase protection assay after 6 h of stimulation. RNA loading was estimated by measuring the intensity of L32 housekeeping ribosomal protein gene. All results are from a pool of three mice and are representative of three independent experiments.

with any other stimulus (Fig. 2). These results clearly demonstrate that CD8⁺ T lymphocytes are competent for IFN- γ production upon TCR engagement, and IFN- γ expression was totally inhibited by CsA at the transcriptional level.

CD8⁺ T lymphocytes present functional NFAT1 protein

The activation of NFAT transcription factors requires sustained intracellular Ca²⁺ levels induced by TCR engagement (23). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which is blocked by the immunosuppressive drug CsA (23). Taking into account that IFN- γ expression is Ca²⁺ dependent and blocked in a CsA-sensitive manner, we decided to investigate whether CD8⁺ T lymphocytes presented NFAT transcription factor. We demonstrate for the first time, to our knowledge, that naive CD8⁺ T cells do present inactive endogenous NFAT1 transcription factor (phosphorylated form), which is activated by ionomycin-induced Ca²⁺ influx (dephosphorylated form), and blocked by CsA (Fig. 3). In fact, ionomycin treatment not only led to NFAT1 dephosphorylation, but also resulted in NFAT1 nuclear translocation, which was again blocked by CsA as observed by Western blot of nuclear lysate and immunofluorescence staining of CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3).

Effect of NFAT transcription factor on IFN- γ promoter

We then examined the ability of NFAT transcription factor to regulate the IFN- γ promoter in a CD8⁺ T cell line. The CTLL-R8⁺ cell line presents endogenous NFAT1 whose activation is induced by ionomycin and blocked by CsA (Fig. 4A). Moreover, the CTLL-R8⁺ cell line did not produce IFN- γ when maintained in culture without stimulation, but ionomycin treatment was sufficient to induce its production, as assessed by ELISA (data not shown). We then transiently transfected these cells with different IFN- γ promoter constructs containing NFAT-binding sites and driving

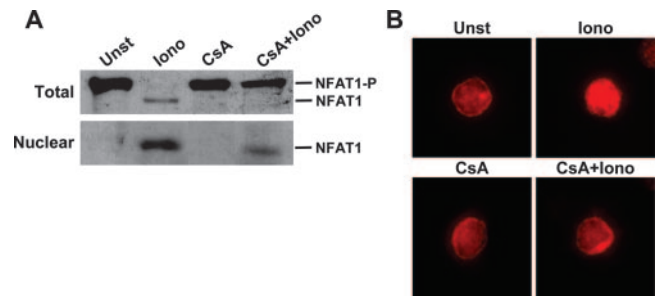


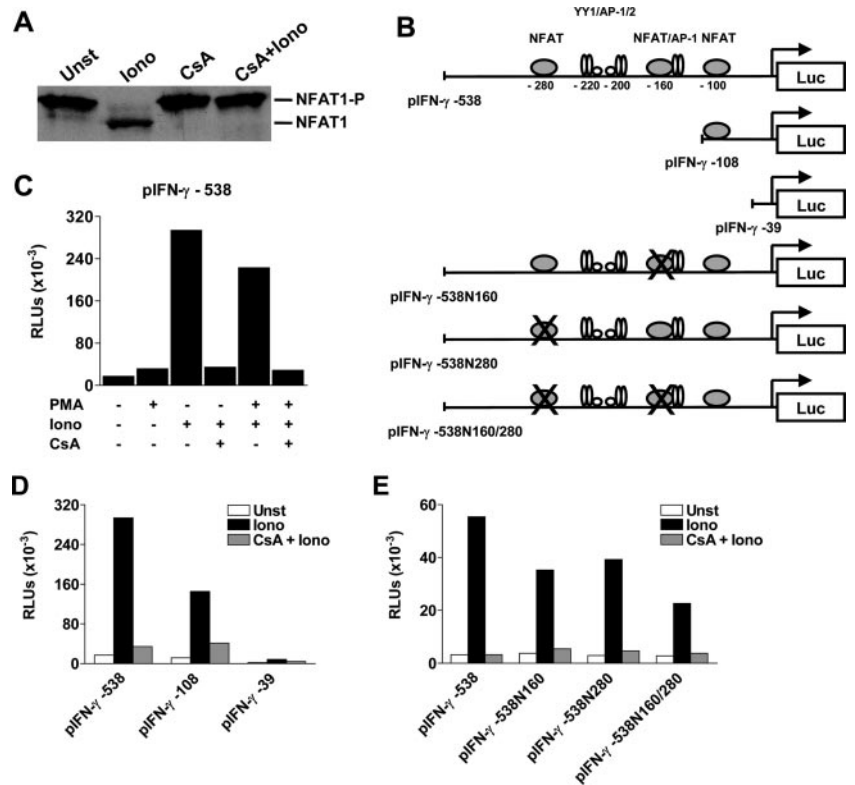
FIGURE 3. NFAT1 is dephosphorylated and translocated to the nucleus in CD8⁺ T lymphocytes after Ca²⁺ influx. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M) or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before ionomycin. *A*, Detection of NFAT1 transcription factor in CD8⁺ T cells in total lysates (Total; upper panel) or nuclear lysates (Nuclear; lower panel) by Western blot analysis after 15 min of stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. *B*, Cellular localization of NFAT1 protein in CD8⁺ T cells by immunofluorescence staining after 15 min of stimulation. All results are representative of at least two independent experiments.

the luciferase reporter gene (Fig. 4B). Three NFAT-binding sites were approximately identified at positions -100, -160, and -280 bp through the proximal 538 bp of the IFN- γ promoter (pIFN- γ -538; Fig. 4B) (28). Interestingly, ionomycin stimulation was sufficient to highly transactivate the IFN- γ proximal promoter construct pIFN- γ -538 (Fig. 4C). In accordance with primary CD8⁺ T cells results, PMA administration alone did not induce luciferase activity or enhance reporter expression when associated with ionomycin, indicating that ionomycin-driven Ca²⁺ influx alone was sufficient to induce optimal response (Fig. 4C). The partial promoter construct pIFN- γ -108, which contained a single NFAT-binding site, still showed 50% luciferase activity compared with the full-length promoter construct (Fig. 4D). Again, IFN- γ promoter activity remained sensitive to CsA (Fig. 4, C and D). However, promoter construct pIFN- γ -39 showed no luciferase expression at all (Fig. 4D). To evaluate the direct role of NFAT on IFN- γ promoter transactivation, we analyzed the effects of point mutations in different NFAT binding sites (Fig. 4B) (28). As shown in Fig. 4E, point mutations at the NFAT -160 site (N160), -280 site (N280), or both sites (N160/N280) decreased luciferase activity compared with the wild-type pIFN-538 construct. Point mutation at both sites (N160/N280) decreased luciferase expression by an average of 50% compared with the pIFN-538 construct, which is similar to the reduction observed in the pIFN- γ -108 construct (Fig. 4, D and E). It is still important to note in this study the presence of a third intact NFAT binding site at position -100, which could explain at least some of the luciferase activity observed in the double mutant (N160/N280) and pIFN-108 constructs (Fig. 4, D and E). This site might play an important unrecognized role in IFN- γ promoter regulation in CD8⁺ T cells. Moreover, luciferase expression always remained sensitive to CsA in all constructs (Fig. 4, D and E). Based on these results, we conclude that NFAT transcription factor plays a positive role in regulation of the IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell compartment.

Involvement of NFAT1 in IFN- γ production by CD8⁺ T cells

To unequivocally test the hypothesis that NFAT1 is required for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes, we evaluated intracellular IFN- γ production by these cells in NFAT1-deficient mice (NFAT1^{-/-}). Strikingly, upon stimulation of purified naive CD3⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} mice, CD8⁺, but not CD4⁺, T

FIGURE 4. NFAT is able to transactivate IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell line. CTLL-R8⁺ cells were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M), PMA (10 nM), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. **A**, Detection of NFAT1 transcription factor in CTLL-R8⁺ cells by Western blot analysis 15 min after stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. **B**, Schematic view of the plasmid constructs used in the transactivation assay. Different IFN- γ -promoter constructs containing NFAT-binding sites were used: pIFN- γ -538 (proximal 538 bp of IFN- γ promoter), pIFN- γ -108, pIFN- γ -39, pIFN- γ -538N160 (point mutation in the NFAT -160 site), pIFN- γ -538N280 (point mutation in the NFAT1 -280 site), and pIFN- γ -538N160/N280 (double mutation). Element binding sites for the transcription factors NFAT, AP-1, AP-2, and YY-1 are indicated. **C–E**, CTLL-R8⁺ cells were transfected with the indicated IFN- γ -promoter constructs and left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro for 16 h as indicated. Then luciferase activity (Luc) was measured, and gene reporter activity was expressed as relative light units (RLUs). All results are representative of at least two independent experiments.



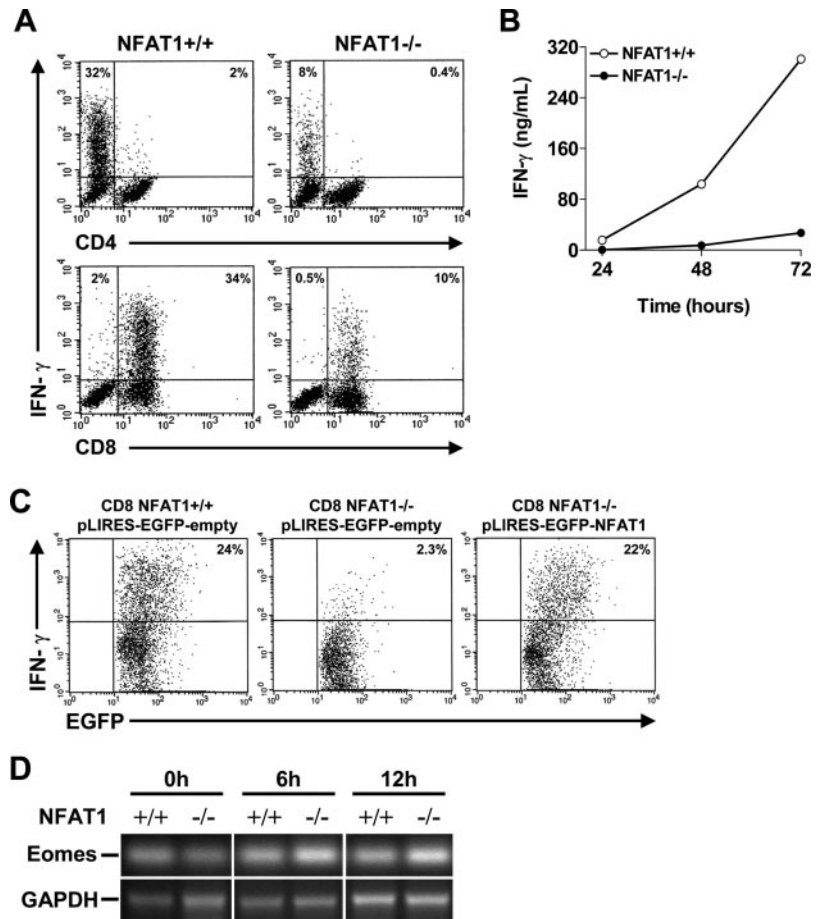
cells represented the main source of IFN- γ during the primary response (Fig. 5A). Furthermore, NFAT1^{-/-} mice showed a 3-fold decrease in the frequency of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells compared with NFAT1^{+/+} mice after 72 h of in vitro stimulation (Fig. 5A). Also, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells showed a drastic impairment of IFN- γ production compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells, as assessed by ELISA (Fig. 5B). To investigate the essential role of NFAT1 transcription factor during IFN- γ expression in CD8⁺ T cells, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes were retrovirally transduced with an NFAT1-encoding vector. As shown in Fig. 5C, CD8⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice infected with pLIREs-EGFP-empty construct showed drastically decreased IFN- γ -producing cells compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells infected with the same construct. However, the frequency of IFN- γ -producing cells was rescued in NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells retrovirally transduced with NFAT1-encoding vector (pLIREs-EGFP-NFAT1) to the same levels as the NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells (Fig. 5C). Although these results clearly demonstrate that IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes is extremely dependent on NFAT1, we also decided to investigate the expression levels of the transcription factor Eomes, which has been shown to be responsible for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes (37). As shown in Fig. 5D, no differences were observed on Eomes gene expression levels in CD8⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} compared with NFAT1^{-/-} mice. Thus, our results clearly demonstrate that the IFN- γ produced by T lymphocytes upon TCR stimulation primarily originates from CD8⁺ T cells and depends mostly on NFAT1 transcription factor.

In vivo consequences of NFAT1-dependent IFN- γ production

To further characterize the relevance of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells during in vivo Th immune responses, we took advantage of a well-defined pleurisy model. Allergic diseases are usually characterized by eosinophil tissue infiltration, increase in the level of serum IgE, and a Th2 pattern of cytokine production,

including IL-4, IL-5, and IL-13, which is totally dependent on CD4⁺ T lymphocytes (38). It has been clearly shown that Th1 cytokines, such as IFN- γ and IL-12, may suppress and counteract the Th2 response of some allergic diseases (11, 12). Thus, we asked whether NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could modulate the Th1/Th2 immune response and control allergic inflammation in vivo. We performed a pleurisy model of allergic inflammation to evaluate the influence of IFN- γ on eosinophil infiltration and cytokine production profile. As previously demonstrated, we show in this study that NFAT1^{-/-} mice present more eosinophils in the pleural cavity than wild-type mice after Ag challenge (Fig. 6) (36, 39). Reinforcing our proposal, in vivo depletion of CD8⁺ T cells from wild-type mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) led to eosinophilia in the pleural cavity similar to levels in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 6). Consistently, CD8 α ^{-/-} and IFN- γ ^{-/-} mice also presented more pleural eosinophils compared with respective wild-type mice (Fig. 6). To better understand the immune response generated in vivo in this model, we analyzed the cytokine production profile after restimulation ex vivo. As shown in Fig. 7, NFAT1^{-/-} mice presented an enhanced Th2 phenotype, including higher levels of IL-4 production and lower levels of IFN- γ compared with wild-type mice. Surprisingly, CD8⁺ T cell-depleted NFAT1^{+/+} mice, which presented eosinophilia similar to NFAT1^{-/-} mice, did not show high levels of IL-4 production (Fig. 7). However, IFN- γ production was strikingly decreased to levels similar to those in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7). Consistently, the frequency of IFN- γ -competent CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell-depleted mice was also decreased to the level in NFAT1^{-/-} mice as analyzed by intracellular cytokine staining (data not shown). Interestingly, CD8 α ^{-/-} mice also presented a highly decreased IFN- γ response compared with respective wild-type mice, but showed a mild increase in IL-4, which was observed in IFN- γ ^{-/-} mice (Fig. 7). These results suggest that NFAT1 transcription factor-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells plays a crucial role in eosinophil migration in this model of allergic inflammation

FIGURE 5. NFAT1 is crucial for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes. *A*, CD3⁺ T lymphocytes were purified from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice as described and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. *B–D*, CD8⁺ T lymphocytes were purified as described from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). *B*, Cell-free supernatants of stimulated cells were assessed for IFN- γ by ELISA at the indicated time points. *C*, Cells were transduced with either pLIRESEGFP-empty or -NFAT1 vector after 24 h of stimulation. Then, EGFP⁺ cells were analyzed by flow cytometry for intracellular IFN- γ production at 96 h as described. *D*, Eomes gene expression was analyzed by semiquantitative RT-PCR at the indicated time points. RNA loading was estimated by measuring the intensity of the GAPDH housekeeping gene. All results are from a pool of three mice and are representative of at least two independent experiments.



and may be important to control Th immune responses and allergic diseases in vivo.

Discussion

In this study, we have demonstrated that IFN- γ production by CD8⁺ T cells during the primary response is dependent on NFAT1 transcription factor. Little is known about the molecular mechanisms that regulate IFN- γ production in CD8⁺ T cells. T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ expression in CD4⁺ T cells (19). Nonetheless, it is noteworthy that T-bet expression is induced through the IFN- γ signaling pathway, and thus its effects are dependent on an initial source of this cytokine (10, 20). Pearce et al. (37) have shown that the transcription factor Eomes, a T-bet paralog, controls effector functions of CD8⁺ T cells, including IFN- γ

production. However, this transcription factor is highly induced in activated CD8⁺ T lymphocytes, but moderately detectable in naive CD8⁺ T cells (37). Also, the regulatory mechanisms that dictate Eomes gene expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. In fact, Eomes expression was induced in CD8⁺ T cells early after TCR triggering (Fig. 5D), but this does not seem to explain the striking differences observed in IFN- γ production by NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes.

By contrast, the NFAT family of transcription factors is largely known to be activated soon after TCR stimulation. Within minutes after Ca²⁺ influx, NFAT translocates to the nucleus and binds to regulatory sequences of the IFN- γ promoter region, regulating its expression (23, 27, 28). In this study we have shown that ionomycin-induced calcium influx was sufficient for IFN- γ production

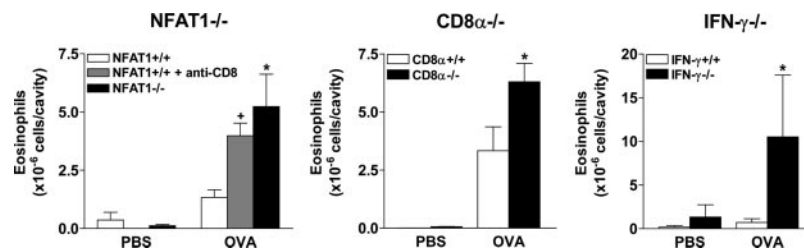
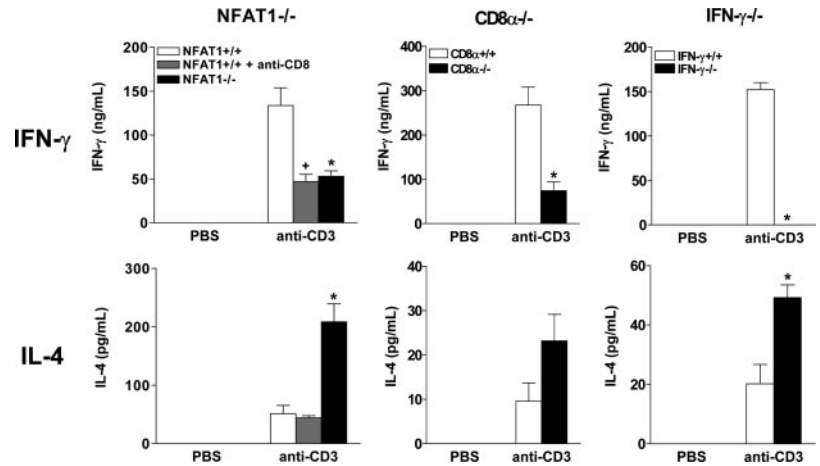


FIGURE 6. NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes controls eosinophilia in vivo. Naive animals (NFAT1^{+/+}, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{+/+}, CD8 α ^{-/-}, IFN- γ ^{+/+}, and IFN- γ ^{-/-}) or CD8⁺ T cell-depleted mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) were s.c. sensitized with OVA (200 μ g) emulsified in CFA in a hind footpad as described. Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, the thoracic cavity was assessed for differential leukocyte analysis. The total number of pleural eosinophils is shown in control (PBS) and treated (OVA) groups. Data are expressed as the mean \pm SEM of values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).

FIGURE 7. IFN- γ production by CD8⁺ T cells regulates the cytokine profile in vivo. Naive animals were treated as described in Fig. 6. One day after challenge, the draining lymph nodes (popliteal and inguinal) of the indicated animals were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Then cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SEM values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).



in naive CD8⁺ T lymphocytes. In fact, the three NFAT-binding sites identified in the proximal regulatory region of the IFN- γ promoter are required for maximum inducibility of this gene in Jurkat T cells and primary murine splenocytes (27, 28). Consistently, CD4⁺ T lymphocytes lacking NFAT1 display a substantial defect in IFN- γ gene expression, independent of the down-regulatory effects of IL-4 and GATA-3 (33). It has also been proposed that NFAT transcription factors may act as candidates to drive early transcription of cytokine genes in T cells, because they can recruit histone acetyltransferases and thus initiate localized histone modification in the IFN- γ promoter region (40–42). Thus, TCR-inducible transcription factors, such as NFAT1, may represent the very first switch on IFN- γ production in CD8⁺ T cells.

The local cytokine microenvironment is fundamental to define the Th1/Th2 balance that CD4⁺ T cells may undergo during Ag recognition (1, 2). The cytokine IFN- γ induces IL-12 production by APCs and also up-regulates the expression of IL-12R β 2 on CD4⁺ T cells through the activation of T-bet (7–10). Both mechanisms are widely known to promote/enhance CD4⁺ Th1 differentiation (3). Myeloid cells, such as dendritic cells and macrophages, represent an early source of IFN- γ and IL-12 in the innate arm of the immune system (3, 4). In fact, CD8a⁺ dendritic cells are able to prime CD4⁺ T lymphocytes toward the Th1 phenotype (43, 44). Furthermore, it has been recently demonstrated that NK cells may also represent an initial source of IFN- γ during Th1 polarization of naive CD4⁺ T cells (21). Our data indicate that upon TCR stimulation of primary T cells, CD8⁺, but not CD4⁺, T lymphocytes, are excellent producers of IFN- γ , which is crucial to enhance CD4⁺ Th1 differentiation (Fig. 1). We thus suggest that CD8⁺ T cells also function as another source of IFN- γ that may reinforce and amplify an adaptive Th1-specific response. In accordance, it has been argued that the IFN- γ secreted by CD8⁺ T cells acts directly on CD4⁺ Th1 priming and also stimulates APCs to secrete IL-12 (22). In that work, in vivo injections of anti-CD3 in various MHC gene knockout mice have clearly demonstrated that IFN- γ is rapidly produced by a distinct population of CD8⁺ T cells and polarizes CD4⁺ T cells toward the Th1 phenotype (22). It has also been shown that the presence of IFN- γ during the early phase of CD4⁺ Th priming is essential for Th1 phenotype stabilization, because CD4⁺ T cells lacking the IFN- γ gene or its receptor do not mount an efficient Th1 response and retain the capacity to produce IL-4 (6). We thus suggest that CD8⁺ T lymphocytes represent an early source of NFAT1-dependent IFN- γ production during the initial adaptive response, which may account for the consolidation of Th1 immunity.

Altering the cytokine-producing profile of Th cells by inducing Th1 responses has been proposed to be protective against Th2-related dis-

orders, such as allergy (11–13). Our findings show that IFN- γ and also CD8⁺ T cells are regulators of eosinophil recruitment and Th immune responses in vivo. Because the IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes was highly dependent on NFAT1, we suggest that mice lacking this transcription factor could not counteract a Th2 response and presented overexpression of Th2 cytokines and eosinophilia in vivo. Thus, the impaired NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could be an alternative explanation for the allergic phenotype described in the NFAT1-deficient mice (36, 39). However, we cannot rule out the hypothesis that NFAT1^{-/-} mice present a Th2-biased phenotype in consequence of an intrinsic defect of CD4⁺ T cells to silence IL-4. This hypothesis could explain the low levels of IL-4 production observed in CD8⁺ T cell-depleted mice and the only moderate increase in CD8 α - and IFN- γ -deficient mice, rather than the profound increase in IL-4 levels observed in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7).

In vivo studies of airway allergic inflammation have demonstrated that IFN- γ , CD8⁺ T cells, and also CD4⁺ Th1 cells are able to regulate Ag-induced eosinophil infiltration by inhibiting Th2 responses (11–15). Interestingly, T-bet-deficient mice had impaired IFN- γ production and also developed spontaneous airway hyper-responsiveness similar to asthma patients, who revealed deficient T-bet expression of the lungs and significantly lower IFN- γ secretion by PBMC compared with healthy individuals (45, 46). In accordance, it has been recently shown in a model of *Leishmania major* infection that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells directly promotes Th1 differentiation and down-regulates initial Th2 immune responses (47). Although depletion of CD8⁺ T lymphocytes in NFAT1^{+/+} mice induced eosinophil infiltration in our model of allergic inflammation (Fig. 6), we cannot exclude the involvement of other cell types in this phenomenon. In addition to CD8⁺ T cells, in vivo treatment with anti-CD8 Ab could deplete CD8a⁺ dendritic cells, which have been implicated in Th1 differentiation as well (43, 44). Thus, it is still possible that the absence of both CD8⁺ T cells and CD8a⁺ dendritic cells might explain the enhanced allergic inflammation observed in CD8-depleted NFAT1^{+/+} mice. Nevertheless, conflicting results have been documented regarding the protective action of CD8⁺ T and CD4⁺ Th1 cells against allergic diseases (48–50).

The suppressive effects of IFN- γ on allergic inflammation may be explained by several mechanisms. It is most likely that IFN- γ directly induces the differentiation of naive T cells toward the Th1 phenotype and/or represses Th2 cell recruitment/differentiation rather than acting on eosinophils itself (4–6). It is also possible that IFN- γ suppresses the release of Th2 cytokines from activated T cells (51, 52) and thus inhibits the following Th2-dependent

eosinophil recruitment (11, 38). However, other reports have shown inhibitory properties of IFN- γ directly on eosinophil infiltration into inflammatory tissues (53, 54). Our results support the idea that NFAT1 plays a positive regulatory role in IFN- γ production by CD8⁺ T cells and may control allergic inflammation in vivo. In contrast, a recent report have shown that inhibition of all NFAT family members in T cells prevents allergic pulmonary inflammation, early eosinophil recruitment to the lungs, and Th2 response development (55). These results support the idea that different NFAT members may play specific roles during immune responses in vivo, because this family consists of five proteins with distinct properties in the regulation of cytokine genes.

In conclusion, we demonstrate in this study that IFN- γ production by naive CD8⁺ T cells during primary stimulation is highly dependent on NFAT1 transcription factor. We also indicate that CD8⁺ T cells and IFN- γ are essential to control allergic inflammation. Finally, we suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role on IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which is central to the generation of Th1 immune responses in vivo.

Acknowledgments

We are especially grateful to M. A. Barcinski and B. L. Diaz for comments on the work and manuscript, and to members of our laboratory for helpful advice and discussions. We are in debt to A. Rao, C. Wilson, and F. Cunha for kindly providing reagents, and to E. Abrantes for help with gene reporter experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635–673.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787–793.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 713–758.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749–758.
- Bradley, L. M., D. K. Dalton, and M. Croft. 1996. A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.* 157: 1350–1358.
- Zhang, Y., R. Apilado, J. Coleman, S. Ben-Sasson, S. Tsang, J. Hu-Li, W. E. Paul, and H. Huang. 2001. Interferon γ stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* 194: 165–172.
- Ma, X., J. M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S. F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183: 147–157.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W. E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188–10192.
- Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, et al. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907–1910.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 3: 549–557.
- Iwamoto, I., H. Nakajima, H. Endo, and S. Yoshida. 1993. Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 177: 573–576.
- Dow, S. W., J. Schwarze, T. D. Heath, T. A. Potter, and E. W. Gelfand. 1999. Systemic and local interferon γ gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum. Gene Ther.* 10: 1905–1914.
- Cohn, L., R. J. Homer, N. Niu, and K. Bottomly. 1999. T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J. Exp. Med.* 190: 1309–1318.
- Suzuki, M., R. Taha, D. Ihaku, Q. Hamid, and J. G. Martin. 1999. CD8⁺ T cells modulate late allergic airway responses in Brown Norway rats. *J. Immunol.* 163: 5574–5581.
- Suzuki, M., K. Maghni, S. Molet, A. Shimbara, Q. A. Hamid, and J. G. Martin. 2002. IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 803–809.
- Leonard, C., V. Tormey, C. Burke, and L. W. Poulter. 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 368–375.
- Renzi, P. M., J. P. Turgeon, J. E. Marcotte, S. P. Drblik, D. Bérubé, M. F. Gagnon, and S. Spier. 1999. Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1417–1422.
- Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, and T. L. Murphy. 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 451–494.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338–342.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, et al. 2001. T. bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15137–15142.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for Th1 priming. *Nat. Immunol.* 5: 1260–1265.
- Das, G., S. Sheridan, and C. A. Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. *J. Immunol.* 167: 2004–2010.
- Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 707–747.
- Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 497–521.
- Shaw, K. T. Y., A. M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao, and P. G. Hogan. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11205–11209.
- Loh, C., K. T. Y. Shaw, J. Carew, J. P. B. Viola, C. Luo, B. A. Perrino, and A. Rao. 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* 271: 10884–10891.
- Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, and H. A. Young. 1997. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 30412–30420.
- Sweetser, M. T., T. Hoey, Y. L. Sun, W. M. Weaver, G. A. Price, and C. B. Wilson. 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 34775–34783.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807–815.
- Clipstone, N. A., and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695–697.
- Hodge, M. R., A. M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4: 397–405.
- Kiani, A., J. P. B. Viola, A. H. Lichtman, and A. Rao. 1997. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7: 849–860.
- Kiani, A., F. J. Garcia-Cózar, I. Habermann, S. Laforsch, T. Aebischer, G. Ehninger, and A. Rao. 2001. Regulation of interferon- γ gene by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 98: 1480–1488.
- Jain, J., P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, and A. Rao. 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 365: 801–804.
- McMillin, D. W., N. Landazuri, B. Gangadharan, B. Hewes, D. R. Archer, H. T. Spencer, and J. M. Le Doux. 2005. Highly efficient transduction of repopulating bone marrow cells using rapidly concentrated polymer-complexed retrovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 768–775.
- Viola, J. P. B., A. Kiani, P. T. Bozza, and A. Rao. 1998. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 7: 2223–2230.
- Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, et al. 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor eomesodermin. *Science* 302: 1041–1043.
- Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 255–281.
- Xanthoudakis, S., J. P. B. Viola, K. T. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, D. C. Luk, T. Curran, and A. Rao. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272: 892–895.
- García-Rodríguez, C., and A. Rao. 1998. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.* 187: 2031–2036.
- Avots, A., M. Buttman, S. Chuvpilo, C. Escher, U. Smola, A. J. Bannister, U. R. Rapp, T. Kouzarides, and E. Serfling. 1999. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10: 515–524.
- Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T_H cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immunol.* 3: 643–651.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189: 587–592.
- Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser. 2001. Cytokines regulate the capacity of CD8 α^+ and CD8 α^- dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J. Immunol.* 167: 4345–4350.
- Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Y. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, et al. 2002. Development of

- spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336–338.
46. Nurse, B., M. Haus, A. S. Puterman, E. G. Weinberg, and P. C. Potter. 1997. Reduced interferon- γ but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 662–668.
 47. Uzonna, J. E., K. L. Joyce, and P. Scott. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 199: 1559–1566.
 48. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T. A. Potter, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.* 183: 1719–1729.
 49. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 103: 175–183.
 50. Miyahara, N., K. Takeda, T. Kodama, A. Joetham, C. Taube, J. W. Park, S. Miyahara, A. Balhorn, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Contribution of antigen-primed CD8⁺ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J. Immunol.* 172: 2549–2558.
 51. Coyle, A. J., S. Tsuyuki, C. Bertrand, S. Huang, M. Aguet, S. S. Alkan, and G. P. Anderson. 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 156: 2680–2685.
 52. Elser, B., M. Lohoff, S. Kock, M. Giaisi, S. Kirchhoff, P. H. Krammer, and M. Li-Weber. 2002. IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17: 703–712.
 53. Luttmann, W., E. Dauer, S. Schmidt, O. Marx, M. Hossfeld, H. Matthys, and J. C. Virchow, Jr. 2000. Effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand. J. Immunol.* 51: 54–59.
 54. Fulkerson, P. C., N. Zimmermann, E. B. Brandt, E. E. Muntel, M. P. Doecker, J. L. Kavanaugh, A. Mishra, D. P. Witte, H. Zhang, J. M. Farber, et al. 2004. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1987–1992.
 55. Diehl, S., T. Krahl, L. Rinaldi, R. Norton, C. G. Irvin, and M. Rincón. 2004. Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 172: 3597–3603.

8.2 Artigos de revisão

Apêndice 8.2.1. Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK (2005). NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res*, 38: 335-344.

NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development

J.P.B. Viola,
L.D.S. Carvalho,
B.P.F. Fonseca
and L.K. Teixeira

Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

The nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors has been primarily identified in immune cells; however, these proteins have been recently found to be functionally active in several other non-immune cell types. NFAT proteins are activated upon different stimuli that lead to increased intracellular calcium levels. Regardless of their widely known cytokine gene expression properties, NFATs have been shown to regulate other genes related to cell cycle progression, cell differentiation and apoptosis, revealing a broader role for these proteins in normal cell physiology. Several reports have addressed the participation of NFATs in many aspects of malignant cell transformation and tumorigenic processes. In this review, we will discuss the involvement of the different NFAT family members in the regulation of cell cycling, differentiation and tumor formation, and also its implications on oncogenesis. Better understanding the mechanisms by which NFATs regulate cell cycle and tumor-related events should be relevant for the development of rational anti-cancer therapies.

Key words

- NFAT
- Cell cycle
- Cancer
- Cell differentiation
- Gene expression

Correspondence

J.P.B. Viola
Divisão de Biologia Celular
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Rua André Cavalcanti, 37, 5^o andar
20231-050 Rio de Janeiro, RJ
Brasil
Fax: +55-21-3233-1470
E-mail: jpvioa@inca.gov.br

Presented at the XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Campinas, SP, Brazil, July 15-18, 2004.

Research supported by INCA/FAF, FURNAS Centrais Elétricas S.A., and CNPq. L.K. Teixeira and B.P.F. Fonseca were supported by an INCA/FAF fellowship.

Received July 16, 2004
Accepted November 12, 2004

Introduction

Cell activation is regulated by an interacting network of transcription factors that determine the expression of different genes. It has been shown that several transcription factors, including the nuclear factor of activated T cells (NFAT) family, play an important role in the control of gene expression during cell activation and differentiation. Most of the work on NFAT proteins has been related to immune cell activation and its mediators, such as cytokines (1). However, accumulating evidence has been demonstrat-

ing that NFAT transcription factors are present in a wide range of cell types and tissues that are not related to the immune system, and implicated in the regulation of genes that control cell cycle progression, cell development and differentiation, angiogenesis, and possibly tumorigenesis (2-7). Given the importance of these processes in different stages of cell physiology, it is of considerable interest to understand the mechanisms by which NFAT transcription factors affect cell activation and function. Thus, in this review we will focus on the involvement of the NFAT family of transcription factors in cell cycle

regulation, cell differentiation and oncogenesis.

The NFAT family of transcription factors

NFAT was first identified in T cells as a rapidly inducible nuclear factor able to bind to the distal antigen receptor responsive element of the human IL-2 promoter (8). Over the past few years, studies from several laboratories have indicated that NFAT proteins regulate the expression of different genes, including signaling proteins, cytokines, cell surface receptors, and cell cycle and apoptosis related proteins. The NFAT family of transcription factors encodes four distinct proteins that are regulated by the calcium/calcineurin signaling pathway, known as NFAT1 (also called NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), and NFAT4 (NFATx, NFATc3), and another protein named NFAT5 (TonE-BP), which is regulated by hyperosmotic stress (1,9). NFAT1, the first identified member of the family, was cloned from murine (Ar-5) and human (Jurkat) T cell cDNA libraries (10,11). A distinct protein, NFAT2, was also cloned from a Jurkat T cell cDNA library (12). cDNA clones encoding two other NFAT proteins, NFAT3 and NFAT4, were isolated from Jurkat T cell, human peripheral blood lymphocyte and human thymus cDNA libraries (13,14).

Despite their name, NFAT proteins are expressed not only in T cells, but also in other classes of immune and non-immune cells. NFAT1, NFAT2 and NFAT4 are expressed at the protein level in peripheral T and B cells; NFAT1 is also expressed in mast cells, NK cells, and in certain monocytes and macrophages (1,9,15). NFAT1 and NFAT2 mRNAs are expressed in peripheral lymphoid tissues, and NFAT2 mRNA is upregulated in activated T cells and NK cells (12,14). NFAT4 mRNA is expressed at high levels in the thymus and at low levels in peripheral

lymphoid tissues (13,14). However, several data have demonstrated that NFAT proteins are also present in different non-related immune cell lines and tissues, such as neuronal cell line and nervous system tissues, endothelial cell line, skeletal and heart muscle, chondrocytes, keratinocytes, and adipocytes among others (1,5,16).

Several isoforms have been described for NFAT1, NFAT2 and NFAT4. Sequence homology represented in all the isoforms suggests two different domains, comprising the DNA-binding domain and the NFAT homology region (11,17). The DNA-binding domain, which is located between amino acid residues 400 and 700, is highly conserved within the NFAT family, and shows moderate sequence similarity to the DNA-binding domains of Rel-family proteins (17). Based on comparisons of binding site sequences, the NFAT binding site is determined to be a 9-bp element, possessing the consensus nucleotide sequence (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N (1,9). In addition, NFAT transcription factors cooperate with AP-1 proteins in DNA binding and transactivation, and this association results in stabilization of the NFAT-DNA interaction (1,9). The NFAT homology region is located in the N-terminal region, comprising 300 amino acids, and shows a strong conservation of several sequence motifs characteristic of the NFAT family (11,13,14).

Further on, NFAT transcription factors have been characterized as cytosolic proteins constitutively expressed in resting cells (1). Upon stimulation of receptors coupled to calcium mobilization, NFAT proteins are activated by calcineurin, the calcium/calmodulin-activated serine-threonine phosphatase (1,9). Activation of NFAT by calcineurin is sensitive to calcineurin inhibitors and immunosuppressive agents, such as cyclosporin A and FK506 (1,15). Three different steps of activation have been defined for NFAT proteins: dephosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding (Figure 1). In resting cells, NFAT proteins

are phosphorylated and cytoplasmic, and show a low affinity for DNA (18). Stimuli that trigger calcium mobilization result in rapid dephosphorylation of NFAT proteins and their translocation to the nucleus, where dephosphorylated proteins show increased affinity for DNA (18,19). Binding sites for NFAT proteins are present in the promoter/enhancer regions of several inducible genes, including the cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , and TNF- α ; the cell surface proteins CD40L, CTLA-4 and FasL; the enzyme cyclooxygenase-2, and the cell cycle regulator CDK4 (1,4,15,20,21). Thus, a large number of inducible genes that regulate cell proliferation, differentiation, survival, and apoptosis are under the control of NFAT proteins.

NFAT and cell cycle regulation

The cell cycle is controlled by a set of protein complexes composed by two basic components: cyclin-dependent kinases (CDK) and their activation partners, the cyclins. Cyclin-CDK activity is regulated in response to appropriate stimuli and plays a key role in controlling cell cycle progression. The expression of specific cyclins is regulated at the transcription level, and dictates the formation of distinct cyclin/CDK complexes at different points of the cell cycle. CDK activity is usually influenced by several mechanisms, such as cyclin degradation (22) and phosphorylation of CDKs by inhibitory proteins, known as CDK inhibitors. CDK inhibitors are composed by two families of proteins: INK4 proteins, which specifically inhibit the catalytic subunit of CDK4 and CDK6, and Cip/Kip proteins, which affect the activity of cyclin D-, E-, and A-dependent kinases (23).

Different classes of cyclins are defined by the cell cycle phase at which they bind to CDKs and exert their function. During G0/G1 transition phase, cyclin C stimulates CDK3-mediated phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRB), exiting cells from

quiescence (24). In G1 phase, cyclin D-CDK4/6 complex phosphorylates pRB and leads to E2F transcription factor release, which transactivates genes related to S phase entry (23,25,26). During late G1, cyclin E-CDK2 phosphorylates additional sites of the pRB subsequent to cyclin D-CDK4/6 phosphorylation sites, regulating G1/S transition. Cyclin A has been implicated in the control of S phase entry, as well as in the G2/M transition by binding to CDK2 and CDK1, respectively. Mitosis phase events are quite dependent on specific cyclin B-CDK1 complex activity (23,26).

Increase of intracellular free calcium is central for cellular activation. Several observations have demonstrated that calcium signal stimulates gene transcription associated with cell cycle progression, and also promotes G1/S phase transition (27-29). Furthermore, accumulating evidence suggests that the phosphatase calcineurin plays a major role in the regulation of cell cycle progression by acting during the early stages of G1 phase (20,30,31). Taken together, these results suggest that NFAT proteins, which are activated in consequence of calcium stimulus and calcineurin activity, are central regulators of the cell cycle machinery.

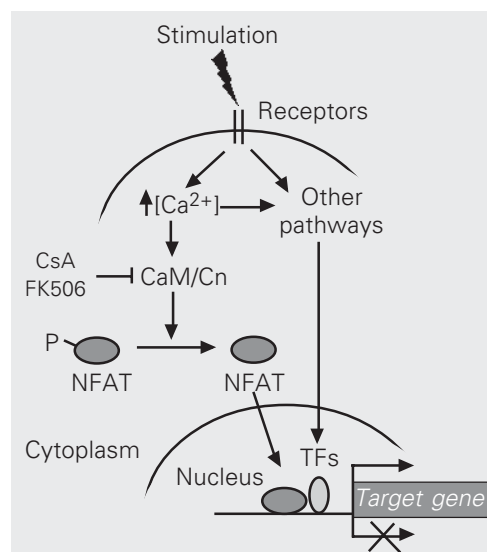


Figure 1. Schematic view of NFAT transcription factor signaling pathway in gene expression regulation. NFAT proteins are activated upon different stimuli that lead to increased intracellular calcium levels. When dephosphorylated by calcineurin, NFAT rapidly translocates to the nucleus where it regulates the expression of several target genes. NFATs may function as transcriptional activators or repressors and cooperate with several other transcription factors. Ca²⁺ = calcium; CaM = calmodulin; Cn = calcineurin; CsA = cyclosporin A; NFAT = nuclear factor of activated T cells; P = phosphorylation; TFs = transcription factors.

Recently, it has been demonstrated that the promoter of CDK4 presents a consensus-binding site for NFAT proteins and is negatively regulated by NFAT1 without AP-1 cooperation (4). This finding demonstrates that NFAT1 directly controls the expression of CDK4 at the transcription level. Furthermore, NFAT1 has been implicated in the control of some cyclin genes, acting as a negative regulator of cyclins A2, E and B1 during lymphocyte activation (3). These results support the idea that the hyperproliferative phenotype observed in NFAT1^{-/-} lymphocytes is related to a deregulated cell cycle progression, suggesting that NFAT1 transcription factor plays a central role in controlling cell cycle during T cell activation (3). Several other data also support this evidence. It has been shown that cyclosporin A and FK506 inhibit the expression of cyclins A and E in 3T3 fibroblasts (31). Another evidence for the involvement of NFAT on cell growth has been shown in keratinocyte cells, where cyclosporin A suppressed the expression of p21^{WAF1/Cip1} and p27^{KIP1}, two CDK inhibitors (32). Moreover, transactivation of p21 promoter is upregulated by calcineurin and is dependent of Sp1/Sp3 in synergism with NFAT1 and NFAT2 (32). In addition, it has also been demonstrated that overexpression of NFAT2 in preadipocyte 3T3-L1 cells promoted cell cycle progression even under low serum concentrations and induced altered expression of cell cycle-related genes, such as cyclin D1, cyclin D2, pRB, and c-Myc (6). Finally, preliminary data from our laboratory suggest that NFAT1 directly regulates the expression of cyclin A2 gene (Carvalho LDS and Viola JPB, unpublished observations). This evidence supports the hypothesis that NFAT transcription factors control the expression of cell cycle-related genes and are central regulators of cell cycle progression.

Cell cycle and CD4⁺ T cell differentiation

Upon primary stimulation, naive CD4⁺ T

lymphocytes (T helper, Th) differentiate into two classes of effector cells with distinct functional abilities (33). During Th differentiation, these cells commit to a specific and mutually exclusive pattern of cytokine secretion (33). Th1 cells are characterized by the production of IFN- γ , contributing to cellular immune responses against intracellular pathogens, while Th2 cells produce IL-4, IL-5 and IL-13, participating on the response against extracellular pathogens (33). Several factors can influence the differentiation pathway of Th cells, specially the conditions prevailing within the microenvironment where T cells encounter antigen (34). However, the molecular basis for the cell-specific and mutually exclusive expression of Th1 or Th2 cytokines is not yet completely defined. Genetic experiments have implicated several transcription factors in Th cell differentiation, including NFAT, STAT4, STAT6, T-Bet and GATA-3. The proteins T-Bet and GATA-3 have been implicated as critical lineage-specific transcription factors which are sufficient to program Th1 and Th2 cytokine expression profiles, respectively (35,36). Conversely, gene disruption of STAT4 and STAT6 indicated that these transcription factors also play major roles in Th differentiation (37,38). However, in this section we will focus on reviewing data regarding the role of NFAT family proteins in Th differentiation.

NFAT proteins are present in both Th1 and Th2 cells, and can activate cytokine promoters in both cell types (1,15). Also, NFAT transcriptional activity appeared to be similarly regulated during Th1/Th2 development, although it was enhanced in differentiated Th2 cells compared with differentiated Th1 cells (39). These similarities suggested that the activity of NFAT transcription factors were likely to overlap substantially. However, data generated by *in vivo* gene disruption of the different NFAT proteins suggest that they may have distinct roles in Th differentiation. NFAT1^{-/-} mice

developed normally, and did not exhibit any obvious behavioral deficiencies (40,41). However, NFAT1^{-/-} mice consistently showed a marked increase in their immune response. NFAT1^{-/-} mice showed an enhanced Th2 development in both *in vivo* and *in vitro* models of Th differentiation, as evidenced by increased levels of IL-4 production (40,42,43). Furthermore, cells from lymph nodes and spleen hyperproliferated in response to different antigen stimulations (41). Likewise, CD4⁺ T cells hyperproliferated *in vitro* in response to anti-CD3 (40). On the other hand, targeted disruption of NFAT2 resulted in an embryonic lethal phenotype (9,15). Complementing RAG-1- or RAG-2-deficient blastocysts with homozygous NFAT2^{-/-} mutant ES cell lines demonstrated that T and B cells from chimeric mice showed reduced proliferation of peripheral lymphocytes when compared to wild-type mice (44,45). In an *in vitro* model of Th differentiation, the chimeric mice displayed a decreased production of IL-4 but normal production of IFN- γ , demonstrating an impaired Th2 response in NFAT2^{-/-} T cells (44,45). Taken together, the results observed in NFAT-deficient mice demonstrated that these transcription factors play an important role in Th differentiation, and suggest that NFAT1 and NFAT2 have opposite roles in regulating gene expression in Th cell activation and differentiation. However, the molecular basis of these effects remains to be identified.

Cell cycle entry is one of the first events that occur during lymphocyte activation. Upon T cell receptor (TCR) activation, naive T lymphocytes, which are in a quiescent stage, proliferate, differentiate and acquire their effector functions. It has been shown that T cell differentiation is dependent on the cell cycle entry (46,47). Although proliferation and differentiation of CD4⁺ T cells occur concomitantly during cellular activation, it is still not clear whether they are effectively interconnected. Reiner and colleagues (46) have argued that cell cycle is an impor-

tant regulator of Th differentiation. IL-4 and IFN- γ production by naive CD4⁺ T cells could only be detected after one and three rounds of cellular division, respectively, being blocked by cell cycle-arresting drugs (46). Furthermore, it has been suggested that DNA synthesis is essential for the acquisition of IL-4 production competence in activated CD4⁺ T cells, since it is blocked by specific drugs that prevent cell cycle progression to S phase, but not to G2/M phase (48). In contrast, it has been proposed that cell cycling only increases the frequency of cytokine-secreting cells, showing a correlation rather than dependence between cell cycle and differentiation (47,49). In fact, non-cycling cells are capable of IFN- γ secretion, suggesting that acquisition of competence to produce IFN- γ can be achieved without entering into S phase (49). Other studies have argued that cell cycle progression is fundamental to the commitment of a Th cell with its cytokine-secreting profile, including the heritable activation/silencing of lineage-defining players (50). Actually, the reversibility of Th1 and Th2 populations is lost along the increasing number of cellular divisions and after long-term stimulation (47). Moreover, it has been shown that T cell differentiation is associated with a dynamic process of histone acetylation and chromatin remodeling at regulatory regions of IL-4 and IFN- γ genes, suggesting that cell cycle could provide a window of opportunity to rearrange genes from an inactive to an active state (47,51).

As discussed before, NFAT1^{-/-} T cells show both hyperproliferation and increase in Th2 cytokine expression (40-42). However, it is still not clear whether the overexpression of Th2 cytokines, such as IL-4, is dependent on the hyperproliferative response observed in NFAT1^{-/-} T cells or both phenomena are independent. We have hypothesized that NFAT transcription factors coordinately regulate the expression of early-inducible genes that are involved in cell

cycle control, such as cyclin genes, and in Th1/Th2 differentiation, such as IFN- γ and IL-4 cytokines (3). It has been demonstrated that NFAT1 is able to bind to IFN- γ promoter regions and to the IL-4 enhancer in T cells stimulated under Th1 or Th2 conditions, respectively (51). Since TCR stimulation activates an immediate and global chromatin derepression program in naive T cells, it has been suggested that TCR-inducible transcription factors, such as the preexisting cytoplasmic NFAT1 protein, may bind to regulatory regions of these cytokine genes, initiating localized chromatin remodeling (51). Finally, we indicate here that NFAT proteins regulate central events during lymphocyte activation, such as cell proliferation and cytokine expression, and may represent an informative model to elucidate the real correlation between cell cycle and Th differentiation.

NFAT and malignant cell transformation

As we discussed until here, NFAT proteins are involved in a variety of cellular mechanisms, and thus represent broader controllers of cell growth and development of normal cells. Several studies have already demonstrated definitive evidence for the involvement of NFAT proteins in the regulation of cell cycle progression, cell differentiation and cell death in different tissues (3,6,52,53). These findings point to NFAT activation as an essential pathway in normal cell physiology, and therefore suggest that deregulation of NFAT signaling may occur during cellular aberrations and tumorigenic processes.

NFAT proteins have been shown to regulate cell cycle progression by modulating cyclin/CDK gene expression profile (3,4). In mouse models, deficiency of NFAT1 transcription factor caused hyperproliferative cellular responses, altered cell cycle control, and increased stage-specific cyclin expres-

sion in lymphocytes (3,40,41). NFAT1 protein also repressed the CDK4 gene in T cells, dictating cell cycle re-entry from quiescence (4). Out of the immune system, NFAT1 deficiency also led to uncontrolled cell growth and differentiation of the connective tissue and skeletal muscle cells (52,54). These results clearly implicate NFAT1 as a negative controller of early-inducible genes that regulate cell cycle progression and differentiation, and thus suggest a putative tumor suppressor role for this protein in different organ systems.

Although some members of the NFAT family are regulated in a similar way, they seem to play quite different effects during cellular responses. In contrast to NFAT1 effects, NFAT2 as well as NFAT3 and NFAT4 appear to function as inducers of cellular proliferation. NFAT2-deficient lymphocytes present a defect in B and T cell proliferation and an impaired repopulation of both thymus and peripheral lymphoid organs (44,45). Recently, Neal and Clipstone (6) have shown that NFAT2 protein controls cellular proliferation of adipocytes by regulating cell cycle-related genes. In skeletal muscle and endothelial cells, NFAT2 activation was also essential for cellular growth and cardiac morphogenesis, respectively (9,15,55). In accordance to NFAT2 data, several mouse models have elucidated the importance of NFAT3 and NFAT4 activation in smooth and skeletal muscle cell differentiation, indicating their role in blood vessels formation and angiogenesis (16,29). These results provide evidence for a positive regulatory role of NFAT2 transcription factor in cell cycle machinery and growth signal autonomy, revealing its oncogenic potential.

Another hallmark of tumorigenesis is the ability that cancer cells present to evade cell death. Programmed cell death by apoptosis occurs in virtually all cell types and is precisely regulated at the cellular and molecular levels. Many molecular players have been characterized to take part in the apoptotic

process, such as caspases, kinases and transcription factors. In fact, NFAT proteins have shown to bind to promoter regions and up-regulate the expression of some effectors of apoptosis, such as TNF- α and FasL (1). It seems that NFAT1 presents a pro-apoptotic role in T lymphocytes since cells lacking this protein showed a decreased expression of FasL and TNF- α and were resistant to apoptosis (53). Moreover, overexpression of some NFAT members in primary T cells led to increased rates of apoptosis (53). These results thus suggest that NFAT deregulation may rescue normal cells from apoptosis and enable tumor cell survival. Conversely, some reports have also indicated anti-apoptotic roles for NFAT members. Overexpression of the NFAT2 protein in adipocytes protected cells from undergoing apoptosis in response to growth factor withdrawal (6). Mice lacking NFAT4 presented impaired expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and increased thymocyte apoptosis during T cell development in the thymus (56). Also, NFAT1 showed to rescue lymphocytes from activated-induced cell death upon antigen stimulation *in vitro* (3). In spite of the controversial data discussed, NFAT proteins are known regulators of apoptotic mechanisms and may take part in tumor development by sustaining cell survival.

Besides indirect evidence, there is plenty of data demonstrating the effective participation of NFAT proteins in tumor-related processes. Several *in vitro* and also *in vivo* reports support NFAT transcription factors as essential targets for better understanding tumor progression pathways. In an elegant work, Neal and Clipstone (6) have investigated the role of NFAT2 in tumorigenesis. A constitutively active form of the NFAT2 protein expressed in the murine 3T3-L1 preadipocyte cell line was able to induce cell transformation and inhibit cell differentiation. Upregulated NFAT2 activity induced the acquisition of well-defined hallmarks of tumorigenesis, including: 1) loss of contact-

mediated growth inhibition, 2) reduced serum growth requirements, 3) protection from apoptosis, 4) formation of colonies in semi-solid media, 5) acquisition of growth autonomy, and 6) formation of tumors in athymic nude mice (6). Moreover, authors speculate that sustained NFAT2 activity *in vivo* could be achieved by the continuous presence of a soluble promitogenic/prosurvival factor, which establishes an autocrine regulatory growth loop and leads to cell autonomy. These results provide strong evidence for the oncogenic potential of NFAT2 transcription factor and elicit its participation during tumor progression *in vivo*. Still, the expression of functional NFAT2 has been also identified in proliferating glioma cells, a nervous system-derived cell line. In line with this, cyclosporin A inhibited the proliferation of these cells and induced apoptotic cell death in a dose-dependent manner (57). Thus, the correlation between the presence of NFAT proteins and the proliferative status of glioma cells might converge to the participation of NFAT transcription factors in the transformed glioma cell phenotype by regulating an autocrine growth factor stimulation.

The formation of new blood vessels, a process called angiogenesis, is also essential in tumor development, since it supplies oxygen and nutrients during late stages of tumorigenesis. NFAT proteins have been implicated in the regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by dictating the expression of cyclooxygenase-2, an enzyme that plays a pivotal role in neovascularization (2,21). A very recent data also suggest NFAT1 protein as a convergent factor during angiogenesis, since it regulates the balance between stimulatory and inhibitory angiogenic signals (7). Beyond angiogenic processes, NFAT proteins have also been related to cellular metastasis. Rao and colleagues (58) have linked the integrin-signaling pathway to the activation of NFAT1 and NFAT5 proteins, which induced carcinoma invasion of cell lines derived from

human breast and colon cancer. Integrins are extracellular matrix ligand receptors widely described as controllers of tumor invasion and migration. These results have highlighted NFAT proteins as relevant players in promoting tumor metastasis.

It is evident the involvement of NFAT transcription factors during tumorigenic processes (Figure 2). In accordance, antagonists of NFAT proteins inhibit tumor formation, supporting an oncogenic potential for these family of transcription factors (59). When binding to promoter regions and regulating gene expression, NFATs have shown to cooperate with several protooncogene products, such as c-Fos, c-Jun (AP-1), and Egr

proteins (1,60). These interactions may result in transcriptional activators or repressors in different moments (Figure 1). However, the subset of genes regulated by NFAT proteins and its importance during the different stages of tumor progression remain to be elucidated. Strong effort must focus on clarifying this still puzzling participation of NFATs during tumorigenesis.

Final remarks

NFAT transcription factors act as ubiquitous regulators of gene expression during cellular activation. NFAT proteins have diverse effects not only on cytokine expression, but also on cell cycle entry and apoptosis. Cumulative evidence has recently demonstrated that NFAT transcription factors exert important roles in the physiology of different cell types, and not only in cells related to the immune system. As such, NFAT has the potential to participate in malignant cell transformation related to cancer. As we discussed here, NFAT proteins regulate genes involved in cell cycle control, cell death and angiogenesis. Given the importance of these phenomena in the development of cell malignancies, it is of considerable interest to understand the mechanisms by which NFAT affects cell growth, differentiation and function. Finally, understanding more about the cell cycle regulation by NFAT proteins is central to precisely indicate the involvement of these transcription factors in malignant cell transformation and oncogenic processes.

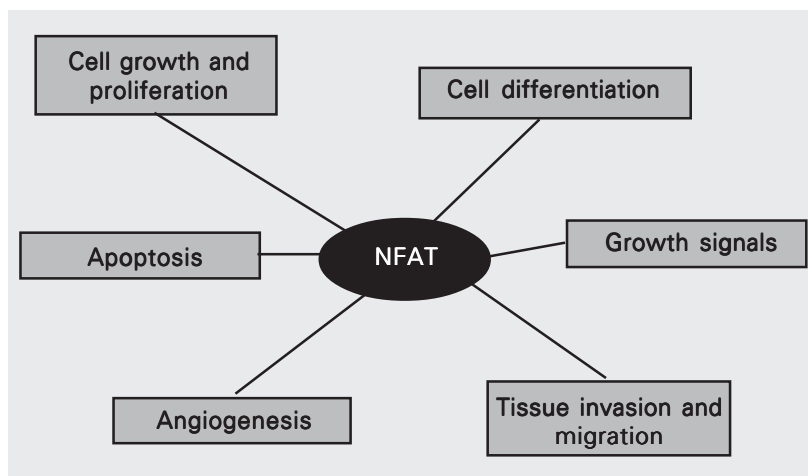


Figure 2. Tumor-related processes regulated by NFAT transcription factors. NFAT proteins have shown to directly regulate the expression of genes related to cellular proliferation (e.g., CDK4) and differentiation (e.g., cytokines and growth factors), apoptosis (e.g., FasL), angiogenesis (e.g., cyclooxygenase-2) and tissue invasion mechanisms among others. NFAT = nuclear factor of activated T cells.

References

1. Rao A, Luo C & Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology*, 15: 707-747.
2. Hernández GL, Volpert OV, Íñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M & Redondo JM (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medicine*, 193: 607-620.
3. Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA & Viola JPB (2002). NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB Journal*, 16: 1940-1942.
4. Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF & Burakoff SJ (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Molecular Cell*, 10: 1071-1081.

5. Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M & Crabtree GR (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, 113: 657-670.
6. Neal JW & Clipstone NA (2003). A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17246-17254.
7. Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T & Volpert O (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *Journal of Experimental Medicine*, 199: 1513-1522.
8. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA & Crabtree GR (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241: 202-205.
9. Macian F, Lopez-Rodriguez C & Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, 20: 2476-2489.
10. McCaffrey PG, Luo C, Kerppola TK et al. (1993). Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science*, 262: 750-754.
11. Luo C, Burgeon E, Carew JA, Badalian TM, McCaffrey PG, Lane WS, Hogan PG & Rao A (1996). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates the transcription of several cytokine genes. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 3955-3966.
12. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A & Crabtree GR (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, 369: 497-502.
13. Ho SN, Thomas DJ, Timmerman LA, Li X, Francke U & Crabtree GR (1995). NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 19898-19907.
14. Masuda E, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K-I & Arai N (1995). NFATx, a novel member of the NFAT family that is expressed predominantly in the thymus. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 2697-2706.
15. Crabtree GR & Olson EN (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 (Suppl): S-67-S-79.
16. Horsley V & Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *Journal of Cell Biology*, 156: 771-774.
17. Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG & Rao A (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 4138-4145.
18. Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A & Hogan PG (1995). Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92: 11205-11209.
19. Loh C, Shaw KTY, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA & Rao A (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 10884-10891.
20. Baksh S, DeCaprio JA & Burakoff SJ (2000). Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase. *Oncogene*, 19: 2820-2827.
21. Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM & Fresno M (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 23627-23635.
22. Koepp DM, Harper JW & Elledge SJ (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97: 431-434.
23. Sherr CJ & Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*, 13: 1501-1512.
24. Ren S & Rollins BJ (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117: 239-251.
25. Ohtani K, DeGregori J & Nevins JR (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92: 12146-12150.
26. Murray AW (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116: 221-234.
27. Anraku Y, Ohya Y & Iida H (1991). Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1093: 169-177.
28. Tomono M, Toyoshima K, Ito M & Amano H (1996). Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochemical Journal*, 317: 675-680.
29. Lipskaia L & Lompré AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the Cell*, 96: 55-68.
30. Terada N, Lucas JJ & Gelfand EW (1991). Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *Journal of Immunology*, 147: 698-704.
31. Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H & Kiss Z (1998). Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353: 374-378.
32. Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L & Dotto GP (2001). Cross talk among calcineurin Sp1/Sp3 and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98: 9575-9580.
33. Abbas AK, Murphy KM & Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.
34. Constant SL & Bottomly K (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annual Review of Immunology*, 15: 297-322.
35. Zheng W & Flavell RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89: 587-596.
36. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG & Glimcher LH (2000). A novel transcription factor T-bet directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100: 655-669.
37. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST & Grusby MJ (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4: 313-319.
38. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T & Grusby MJ (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382: 174-177.
39. Rincon M & Flavell RA (1997). T-cell subsets: transcriptional control in the Th1/Th2 decision. *Current Biology*, 7: R729-R732.
40. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ & Glimcher LH (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*, 4: 397-405.
41. Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T & Rao A (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272: 892-895.
42. Kiani A, Viola JPB, Lichtman AH & Rao A (1997). Downregulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving the transcription factor NFAT1. *Immunity*, 7: 849-860.

43. Viola JPB, Kiani A, Bozza PT & Rao A (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, 91: 2223-2230.
44. Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby M & Glimcher LH (1998). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity*, 8: 125-134.
45. Yoshida H, Nishina H, Takimoto H et al. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity*, 8: 115-124.
46. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang C-R & Reiner SL (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*, 9: 229-237.
47. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW & Locksley RM (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, 14: 205-215.
48. Richter A, Löhning M & Radbruch A (1999). Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *Journal of Experimental Medicine*, 190: 1439-1450.
49. Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J & Paul WE (2001). Cell division is not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN- γ or IL-4. *Journal of Immunology*, 166: 112-120.
50. Mullen AC, Hutchins AS, Villarino AV, Lee HW, High FA, Cereb N, Yang SY, Hua X & Reiner SL (2001). Cell cycle controlling the silencing and function of mammalian activators. *Current Biology*, 11: 1695-1699.
51. Avni O, Lee D, Macian F, Szabo S, Glimcher L & Rao A (2002). Th cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunology*, 3: 643-651.
52. Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravalles EM, Glimcher MJ & Glimcher LH (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 191: 9-22.
53. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D et al. (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity*, 16: 881-895.
54. Horsley V & Pavlath GK (2003). Prostaglandin F2 α stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *Journal of Cell Biology*, 161: 111-118.
55. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN & Rosenthal N (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*, 400: 581-585.
56. Oukka M, Ho IC, De la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ & Glimcher LH (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9: 295-304.
57. Mosieniak G, Figiel I & Kaminska B (1997). Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *Journal of Neurochemistry*, 68: 1142-1149.
58. Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A & Toker A (2002). The role of NFAT transcription factor in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology*, 4: 540-544.
59. Jiang H, Yamamoto S, Nishikawa K & Kato R (1993). Anti-tumor-promoting action of FK506 a potent immunosuppressive agent. *Carcinogenesis*, 14: 67-71.
60. Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczeck RA, Ashwell JD & Glimcher LH (2000). Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*, 12: 293-300.

Apêndice 8.2.2. Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, Viola JPB (2005). The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 137-144.

The role of interferon- γ on immune and allergic responses

Leonardo K Teixeira⁺⁺, Bruna PF Fonseca⁺⁺, Bianca A Barboza⁺⁺, João PB Viola⁺

Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, 20231-050 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Allergic diseases have been closely related to Th2 immune responses, which are characterized by high levels of interleukin (IL) IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13. These cytokines orchestrate the recruitment and activation of different effector cells, such as eosinophils and mast cells. These cells along with Th2 cytokines are key players on the development of chronic allergic inflammatory disorders, usually characterized by airway hyperresponsiveness, reversible airway obstruction, and airway inflammation. Accumulating evidences have shown that altering cytokine-producing profile of Th2 cells by inducing Th1 responses may be protective against Th2-related diseases such as asthma and allergy. Interferon- γ (IFN- γ), the principal Th1 effector cytokine, has shown to be crucial for the resolution of allergic-related immunopathologies. In fact, reduced production of this cytokine has been correlated with severe asthma. In this review, we will discuss the role of IFN- γ during the generation of immune responses and its influence on allergic inflammation models, emphasizing its biologic properties during the different aspects of allergic responses.

Key words: interferon- γ - lymphocytes - immune system - allergy - allergic inflammation

Airway allergic diseases are common disorders, which affect approximately 5% of the Western world population, and show reportedly increasing incidence in developing countries during the last decades. Asthma, rhinitis, and allergy represent the most common allergic diseases, which arise as a result of interaction between multiple genetic and environmental factors. Most patients exhibit an acute immediate hypersensitivity to inhaled antigens, known as allergens, as a consequence of a genetic predisposition for the development of deregulated immune responses (atopy). The inflammatory process may be divided into early- and late-phase reactions. The early (immediate) response is usually mediated by mast cell degranulation, whereas late phase is followed by neutrophil, eosinophil, and lymphocyte migration to the inflammatory site. This chronic inflammatory disorder of the lung is usually characterized by (i) airway hyperresponsiveness (AHR), (ii) reversible airway obstruction and mucus hypersecretion, and (iii) airway inflammation (Wills-Karp 1999). Although allergic diseases have been linked to an enhanced Th2 immune response associated with high levels of interleukin (IL) IL-4, IL-5 and IL-13, accumulating evidences demonstrate that a decreased Th1 immune response is also important in the pathogenesis of these diseases, and that interferon- γ (IFN- γ) could act as a central regulator in this phenomenon. Therefore, in this review we have decided to focus on some of the major functions of IFN- γ that may be implicated in the pathogenic process of allergic inflammation.

The IFN- γ cytokine

The molecule - The cytokine IFN- γ belongs to the family of interferons, which are closely related by their ability to protect cells from viral infections. Based on several criteria, the IFN molecules have been divided into two distinct classes. The first class is named type I IFN and includes the IFN- α and IFN- β molecules, which are the classical interferons induced in response to viral infections. The second class is solely composed by IFN- γ (also termed type II or immune IFN), which is not related to the type I IFN at both the genetic and the protein levels. Although IFN- γ displays most of the biologic activities that have been described to the other IFN, it has a lower specific antiviral activity, but presents more immunomodulatory properties than the type I interferons (Farrar & Schreiber 1993).

Both human and mouse IFN- γ genes generate a unique 1.2 kb mRNA that encodes an amino acid polypeptide of 166 and 134 residues, respectively (Boehm et al. 1997). Two polypeptide chains self-associate in an antiparallel fashion, producing a molecule that exhibits a twofold axis of symmetry with an apparent molecular weight of 34 kDa (Farrar & Schreiber 1993, Bach et al. 1997). Only the dimer displays biologic activity, possibly because it is the only conformation of the molecule that can induce IFN- γ receptor (IFN- γ R) dimerization (Farrar & Schreiber 1993). For a long time, the production of IFN- γ has been considered to be restricted to activated natural killer (NK) cells, CD4⁺ T helper-1 (Th1) cells, and CD8⁺ T cytotoxic cells (Farrar & Schreiber 1993, Boehm et al. 1997). However, we now know that these cells are the most potent, but not the only sources of IFN- γ . Several studies have identified additional IFN- γ -secreting cell types, including $\gamma\delta$ T cells, NKT cells, macrophages, dendritic cells, naive CD4⁺ T cells, and even B cells (Frucht et al. 2001, Szabo et al. 2003).

Molecular mechanisms of gene expression - Much of the knowledge regarding the molecular mechanisms for IFN- γ expression has been described in T lymphocytes,

Financial support: Inca/FAF, Furnas Centrais Elétricas S.A., CNPq

⁺Corresponding author. E-mail: jpviola@inca.gov.br

⁺⁺Inca/FAF fellowship.

Received 8 November 2004

Accepted 30 December 2004

since these cells are excellent producers of this cytokine. Its gene expression is dictated by several transcription factors, which bind to DNA elements located within specific regulatory regions of the IFN- γ locus (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003). DNase I-hypersensitive experiments have shown that the IFN- γ regulatory region encompasses more than 8.0 Kb of genomic DNA, and consists of promoter cis elements, intronic regions and distal enhancers. The promoter region contains binding sites for a sort of IFN- γ -inducers, such as NF- κ B, NFAT, STAT-4, and T-bet (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003).

The expression of the IFN- γ gene has showed to be repressed by the immunosuppressive drug cyclosporin. In fact, three binding sites for the cyclosporin-sensitive NFAT family of transcription factors have been identified through the proximal region of the IFN- γ promoter. These sites are required for maximal IFN- γ expression in T cell lines and primary T lymphocytes (Sweetser et al. 1998). The NFAT and NF- κ B transcription factors are thought to bind to similar DNA sequences, and may thus coordinately cooperate for the regulation of IFN- γ gene expression. Hence, NF- κ B induction within T cells is crucial for substantial IFN- γ production and Th1 response (Sica et al. 1997). It has also been shown that both IL-12 and IL-18 augments IFN- γ production through the activation of NF- κ B pathway. However, the influence of the IL-12/IL-18 pathway on IFN- γ production in Th1 effector cells depends mainly on STAT4, which is able to directly bind to the promoter region of the IFN- γ gene. Even so, STAT4 does not seem to be essential for the initial production of IFN- γ , but to amplify the amount of IFN- γ produced by individual cells since STAT4^{-/-} T lymphocytes are still able to produce this cytokine (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003).

While some nuclear factors are ubiquitous regulators of gene expression, others are required for selective gene expression in specific cellular subsets. In CD4⁺ T lymphocytes, T-bet (T-box expressed in T cells) was recently identified as the master switch of Th1 differentiation and to be the key regulator of IFN- γ expression in these cells (Szabo et al. 2000). T-bet is largely expressed in the lymphoid system, and also has shown to transactivate the IFN- γ gene and induce chromatin remodeling of the IFN- γ locus (Szabo et al. 2003). Three putative T-box binding sites were identified in the IFN- γ gene locus, two sites located 2 Kb from the start site and one in the third intron. Recently, Reiner and collaborators have identified two transcription factors also related to IFN- γ production: Hlx, a potential interacting partner for T-bet that has presented synergistic effects on IFN- γ production (Mullen et al. 2002); and Eomesodermin, a T-bet paralogue that controls effector functions of CD8⁺ T cells, including IFN- γ production (Pearce et al. 2003). Although some transcription factors are conserved regulators of IFN- γ gene expression among different cell types, it remains to be determined the key effectors of each cell lineage. Furthermore, the regions responsible for tissue-specific expression of the IFN- γ gene remain to be elucidated.

The signaling pathway - IFN- γ exerts its pleiotropic effects through a specific interaction with the cell surface

IFN- γ R. The receptor complex consists of two chains: IFN- γ R1 (also known as IFN- γ receptor α), which is the major ligand-binding subunit, and IFN- γ R2 (also known as IFN- γ receptor β), which is obligatory for IFN- γ signal transduction, and also increases the affinity of IFN- γ R1 for its ligand, presumably by enhancing the stability of the complex (Boehm et al. 1997, Tau & Rothman 1999).

Signal transduction starts with an interaction of the IFN- γ homodimer with two α -chain receptors, thereby inducing α -chain dimerization and the subsequent recruitment of two β -chains to the complex. Each chain is constitutively associated with a specific Janus kinase (JAK) (the α -chain with JAK1 and the β -chain with JAK2) (Igarashi et al. 1994). The aggregation of the receptor components brings inactive JAKs into close proximity with one another. Once clustered, JAKs are reciprocally activated through sequential auto and transphosphorylation events. After activation, JAKs then phosphorylate a specific tyrosine residue near the C-terminus of the IFN- γ R1, which serve as a docking site to the binding of STAT1 (Heim et al. 1995). The recruitment of STAT1 is followed by its phosphorylation on tyrosine residue 701 by the receptor-associated JAKs. This phosphorylation leads to a rapid dissociation of the receptor and to the formation of STAT1 homodimers (also called GAF, for gamma-activated factor) (Greenlund et al. 1995). At some point during the early phase of activation, STAT1 is also phosphorylated on serine 727 by a process involving phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and Akt that is required for maximal transcriptional activity (Nguyen et al. 2001). The STAT1 homodimer then translocates into the nucleus, where it is able to bind to defined DNA sequences (known as GAS, for gamma-activated site) and initiate or suppress transcription of IFN- γ -regulated genes (Darnell et al. 1994) (Fig. 1). In addition to the well known Jak-STAT pathway, IFN- γ activates several additional signal-transduction proteins (Ramana et al. 2002). In fact, targeted disruption of the STAT1 gene in mice has revealed STAT1-independent pathways in IFN- γ -dependent signaling (Gil et al. 2001). The role of these pathways in the variety of physiological and pathological conditions remains to be elucidated.

In summary, by activating the latent cytosolic transcription factor STAT1, IFN- γ initiates the transcription of a number of genes containing STAT1-binding sites in their promoter regions. Many of these induced genes are transcription factors (for example, IRF-1) that are able to further drive the regulation of the next wave of transcription. The total number of IFN- γ -regulated genes is estimated to be ~500 (Boehm et al. 1997). It has been demonstrated that IFN- γ upregulates the transcription of genes related to antigen presentation (MHC class I and II, β 2-microglobulin, TAP), Th1 phenotype development (STAT1, T-bet), chemokine-based recruitment of monocytes, T cells, eosinophils and basophils (MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES), cellular adhesion (VLA-4, ICAM-1, VCAM-1 molecules), immunoglobulin heavy chain class switch (IFN- γ upregulates IgG and downregulates IgE), cytokines network (IL-12, IFN- γ , CD40), apoptosis (CD95, caspases), lymphocyte activation (B7-1 and B7-2 molecules), and others (Boehm et al. 1997). As we shall dis-

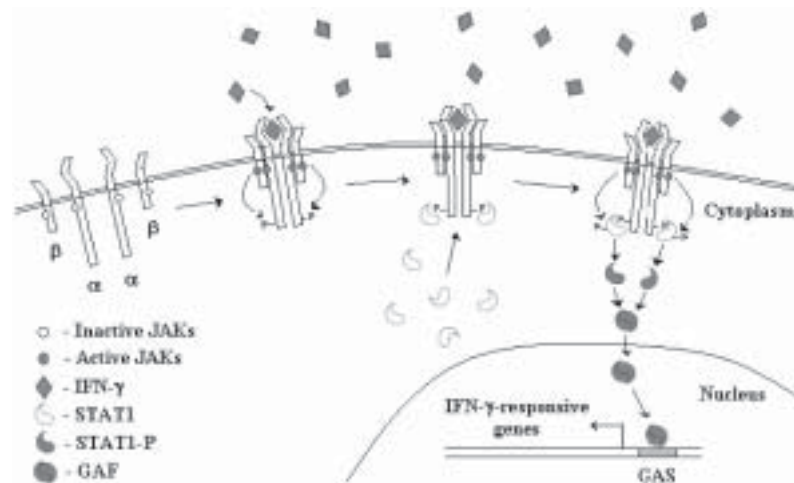


Fig. 1: interferon- γ (IFN- γ) signaling pathway. IFN- γ binds to its receptor (IFN- γ R) and leads to the aggregation of α and β -chains, which are constitutively associated with Janus Kinases (JAKs). Once activated, JAKs phosphorylate the IFN- γ R α chain, creating a docking site for STAT1, which is then phosphorylated and associated in homodimers (named GAF, for gamma-activated factor). The STAT1 homodimer translocates to the nucleus where it is able to bind to specific DNA sequences (named GAS, for gamma-activated site) and regulate the expression of IFN- γ -responsive genes.

cuss here, these IFN- γ -regulated genes take part in the generation of immune responses related to several stages of some allergic processes.

Immunologic basis of allergic diseases

Allergic inflammation has been closely associated with CD4⁺ Th lymphocytes, since a classical Th2 pattern of cytokine production has shown to contribute to the pathogenesis of this disease (Renauld 2001). Elevated numbers of Th2 cells have been identified in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids and airway biopsies from asthmatic patients. These lymphocytes produce high levels of IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13, which orchestrate the recruitment and activation of effector cells related to allergic responses, such as eosinophils and mast cells. The cytokine IL-4 was originally identified as a B cell growth factor, and further showed to promote IgE isotype switch in B cells. In addition, IL-4 is required for optimal Th2 and mast cell differentiation, whereas IL-5 is a selective factor for eosinophil activation and development. IL-4 and IL-5 also increase eosinophil adhesion to vascular endothelial cells, and promotes its infiltration to inflammatory sites by regulating surface markers on eosinophils (such as VLA-4) and endothelium (such as VCAM-1). These cytokines may be produced not only by CD4⁺ T cells, but also by mast cells and eosinophils themselves. Still considering Th2 cytokines, IL-13 is responsible for the mucus hypersecretion of submucosal glands and/or epithelial cells, and IL-9 has been recently related to mast cell and eosinophil proliferation/differentiation (Wills-Karp 1999, Renauld 2001).

In line with all these features, allergic inflammation is correlated with pronounced levels of serum IgE, eosinophil migration to the site of inflammation, and activation of specific cellular compartments. Together with allergen recognition, IgE antibodies bind to Fc receptors (FcR) present on the surface of mast cells and basophils, and

thus trigger the release of inflammatory mediators (such as histamine, prostaglandin and leukotrienes), as well as chemotactic factors (such as eotaxin/CCL11, MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5) and cytokines that in a fine-tuned way are responsible for several allergic reactions. In the mucosa, these mediators of hypersensitivity reactions rapidly induce vascular changes, edema, mucus production, and smooth muscle constriction. Furthermore, it seems that eosinophils are also involved in the pathogenesis of allergic diseases because they usually infiltrate to the target tissues, where they release several inflammatory mediators and cytokines that contribute to airway wall epithelium damage. Finally, chemokines, or chemoattractants, are also relevant in allergy not only for their role in regulating leukocyte recruitment (mainly basophils, eosinophils, and mast cells), but also because they can regulate cellular activation and inflammatory mediators release, IgE synthesis, and Th2 cell recruitment to the site of allergic inflammation. Taken all together, these findings indicate that Th2 cells and their cytokines can account for some of the initial hallmarks of airway inflammation, and are crucial for the pathogenesis of allergic diseases (Wills-Karp 1999, Renauld 2001). During the next sections, we will focus on how IFN- γ regulates Th immune responses, and may thus control allergic diseases.

IFN- γ and Th immune response

A critical aspect of the immune response to allergens is mediated by the helper function of CD4⁺ T cells. After engagement of the T cell receptor (TCR) by the appropriate peptide-MHC complex, naive CD4⁺ T cells rapidly undergo a differentiation process that leads to the development of two functionally distinct cell subsets. These subsets are characterized by a mutually exclusive pattern of cytokine secretion. Th1 cells secrete IFN- γ and TNF- β and are efficient in eliminating intracellular pathogens. Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, which affect

humoral immunity to helminthic parasites and are responsible for immune responses to persistent allergens (Abbas et al. 1996). Several factors can influence the differentiation pathway of CD4⁺ Th cells, specially the cytokines prevailing within the microenvironment where these cells encounter antigens (Constant & Bottomly 1997). IL-12 and IL-4 are known to be the major Th1- and Th2-inducing cytokines, respectively (Abbas et al. 1996). The Th1/Th2 balance is extremely important and may determine whether the immune response is appropriate or leads to severe immunopathologies. Overproduction of Th1 cytokines has been implicated in delayed-type hypersensitivity reactions and autoimmune diseases. On the other hand, it is notorious that the basis for allergic disorders remains on the dysregulation of the Th2 phenotype as previously stated here (Abbas et al. 1996).

Accumulating evidences have shown that altering cytokine-producing profile of Th2 cells by inducing Th1 responses is protective against Th2-related disorders such as asthma and allergy. It has been demonstrated that Th1 lymphocytes and cytokines such as IFN- γ and IL-12 may counteract and suppress Th2 responses of allergic diseases (Iwamoto et al. 1993, Cohn et al. 1999, Dow et al. 1999). In fact, defective IFN- γ production predisposes toward the development of allergic diseases, and patients with severe asthma present significantly reduced IFN- γ production in response to allergen when compared to control individuals (Leonard et al. 1997, Renzi et al. 1999). Moreover, resolution of allergy seems not to be related with a reduction in Th2-cytokine production, but with normalization of IFN- γ levels (Smart et al. 2002). Interestingly, it has also been reported an inverse association between dominant IFN- γ immune responses to intracellular pathogens in childhood and the incidence of asthma (Shirakawa et al. 1997). These results emphasize the inhibitory character of IFN- γ on the response against allergens.

IFN- γ is the principal Th1 effector cytokine, and it has a crucial role in Th1 differentiation. IFN- γ has the ability to act in a great number of cell types that are involved in Th differentiation. It induces IL-12 production by antigen presenting cells (APC), such as dendritic cells and macrophages (Snijders et al. 1998, Szabo et al. 2003). These APCs provide the first contact of naive CD4⁺ T cells with the antigen, therefore this IL-12 production is of great importance on the differentiation pathway towards a Th1 phenotype. In addition to its role on APC, IFN- γ exerts effects on the CD4⁺ T cells themselves. This cytokine is capable of enhancing the development of Th1 effector cells from BALB/c mice by increasing naive CD4⁺ T cells responses to IL-12 (Wenner et al. 1996). Actually, IFN- γ is responsible for inducing/maintaining the expression of the β chain of the IL-12 receptor (IL-12R β 2) through T-bet activation, stating an important role of IFN- γ on the Th1 effects mediated by IL-12 (Mullen et al. 2001, Afkarian et al. 2002). Studies on CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice have also revealed a direct role for IFN- γ as an inducer of Th1 polarization via an autocrine mechanism, independent of IL-12 (Bradley et al. 1996) (Fig. 2).

IFN- γ also exerts direct inhibitory effects on Th2 cytokines, reducing the levels of IL-4 and IL-5 production. The IFN- γ signaling pathway activates T-bet protein, the Th1-specific and Th2-suppressing transcription factor (Lighvani et al. 2001, Afkarian et al. 2002). In fact, ectopically expression of T-bet was able to repress IL-4 and IL-5 in Th2 cells (Szabo et al. 2000). In a model of atopic dermatitis, Th2 cells retrovirally transfected with a vector expressing T-bet conferred Th1-like cytokine production and migratory capacities to those cells (Lametschwandtner et al. 2004). Consistently, T-bet-deficient mice have impaired IFN- γ production and also develop spontaneous AHR similar to allergic patients (Finotto et al. 2002). Also, T-bet expression in CD4⁺ T cells is diminished in the lungs of asthmatic patients, who present sig-

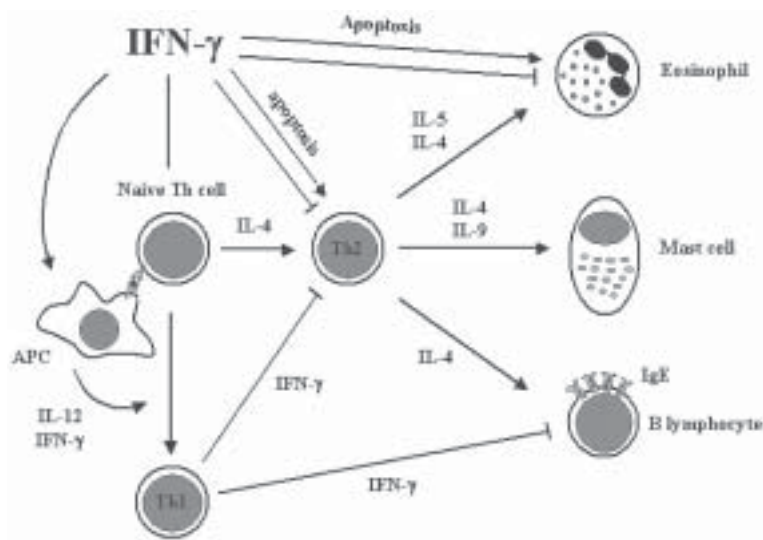


Fig. 2: interferon- γ (IFN- γ) controls Th immune and allergic responses. IFN- γ is produced by different cell sources. It may counteract Th2 immune responses (by suppressing the development of Th2 lymphocytes), induce Th1 differentiation (by enhancing IL-12 production by APC or skewing naive Th lymphocytes toward the Th1 phenotype), and control several steps of allergic responses (by inducing eosinophil apoptosis and blocking IgE isotype switch in B cells).

nificantly lower IFN- γ secretion by peripheral blood mononuclear cells when compared with healthy individuals (Nurse et al. 1997, Finotto et al. 2002). On the other hand, the Th2-induced transcription factor GATA-3 specifically controls the expression of Th2 cytokines, which are essential to induce allergic inflammation *in vivo* (Zheng & Flavell 1997). In fact, increased levels of GATA-3 mRNA expression have been reported in asthmatic airways when compared to those of control subjects and correlated with increased IL-5 expression (Nakamura et al. 1999). The expression of a dominant-negative mutant of GATA-3 led to a reduction in the levels of all Th2 cytokines and attenuated mucus production, IgE synthesis, and airway eosinophilia in the transgenic mice (Zhang et al. 1999).

IFN- γ has indeed a crucial role on inhibiting Th2 responses but not only through T-bet expression. Loss of IL-4 receptor responsiveness may be another mechanism that suppresses Th2 development in polarizing Th1 cells (Huang & Paul 1998). Other studies have shown that IFN- γ directly suppresses IL-4 gene expression through IRF-1 and 2, which bind to three distinct IL-4 promoter sites and act as transcriptional repressors (Elser et al. 2002). *In vivo*, IFN- γ -mediated Th2 repression can be shown by experiments based on models of pulmonary inflammation orchestrated by Th2 cytokines. In IFN- γ R^{-/-} mice previously sensitized with OVA and rechallenged intranasally with the same antigen, the inflammatory lung disease persisted long after it was resolved by wild type mice (Coyle et al. 1996). As discussed before, IFN- γ acts not only as a potent activator of the Th1 phenotype, but also as a suppressor of Th2 development.

Besides the counteracting roles of IFN- γ in the Th2 differentiation process, IFN- γ has a role in inhibiting the proliferation of Th2 cells. In fact, over a decade ago Gajewski and Fitch (1988) have observed that IFN- γ was responsible for the inhibition of proliferation and IL-1-induced responses of some Th2 clones. Further experiments have shown that Th1 cells decreased their expression of the β chain of the IFN- γ R while Th2 cells did not, suggesting a mechanism by which IFN- γ could inhibit selectively the proliferation of Th2 clones (Pernis et al. 1995). The role of IFN- γ in promoting Th1- and inhibiting Th2-type responses has also been subject of some controversy. Recently, Bocek and colleagues (2004) have shown a quite unexpected function for IFN- γ as an IL-4-production inducer. The authors suggest that the precise amount of cytokines may be the key to whether the dominant effect of IFN- γ is to enhance or suppress Th2 priming (Bocek et al. 2004).

IFN- γ and allergic inflammation

The suppressive effects of IFN- γ on allergic diseases have been shown to be mediated by various mechanisms, such as the (1) regulation of allergen presentation to T lymphocytes, (2) differentiation of naive T cells toward Th1 phenotype and/or inhibition of Th2 cell recruitment/differentiation, (3) suppression of Th2 cytokine release from activated T cells, (4) inhibition of effector cell recruitment to the site of inflammation, (5) induction of apoptosis in T cells and eosinophils, (6) blockage of IgE isotype switch in B cells, and (7) induction of nitric oxide (NO) production. Actually, IFN- γ is known to be a pleio-

tropic cytokine that induces and modulates an array of immune responses. Therefore, in this section we have decided to focus on some of the major functions of this cytokine not discussed until here that may be implicated in allergic diseases in a certain manner.

One of the important physiologic roles of IFN- γ during the generation of immune responses is its ability to upregulate the expression of MHC class I and II proteins in several cell types. While this upregulation enhances antigen presentation in macrophages, it has been shown that IFN- γ almost completely abrogates the capacity to present antigens by mast cells, central mediators of allergic reactions (Farrar & Schreiber 1993, Frandji et al. 1995). Since Th cells can be activated in the airway mucosa, mast cells could act as APCs in the absence of IFN- γ , inducing Th2-type responses through their ability to produce substantial amounts of IL-4 (Hamid et al. 1991, Frandji et al. 1995, Constant & Bottomly 1997).

It has been demonstrated that IFN- γ is responsible for regulating the activation, differentiation and recruitment of eosinophils. In fact, IFN- γ induces a decrease in the expression of the eotaxin receptor (CCR3), which was recently showed to be an important inducer of eosinophil differentiation from hematopoietic progenitor cells (Lamkhioed et al. 2003). Lung eosinophil recruitment is one of the hallmarks of atopic asthma and IFN- γ seems to play an important inhibitory role on these cells. Through the induction of the chemokine Mig (CXCL9), IFN- γ inhibits the eotaxin-dependent recruitment of eosinophils to the lung (Fulkerson et al. 2004). *In vivo* models of allergic inflammation have also proved the properties of IFN- γ to regulate allergen-induced eosinophilic infiltration. Recombinant IFN- γ treatment before inhalation of aerosolized antigen prevented eosinophil infiltration into the trachea of sensitized mice (Iwamoto et al. 1993). Targeted disruption of the IFN- γ receptor gene has resulted in a prolonged airway eosinophilia in response to allergen, suggesting that IFN- γ signaling pathway is crucial to control eosinophil recruitment *in vivo* (Coyle et al. 1996). In human studies, nebulized IFN- γ has also reduced the number of eosinophils in the BAL of asthmatic patients (Boguniewicz et al. 1995). However, it is unlikely that this cytokine directly acts on the eosinophils during its infiltration to inflammatory tissues. In agreement, several reports have concluded that IFN- γ directly prevents allergen-induced CD4⁺ T cell infiltration into the tissue and thereby inhibits the following IL-5-dependent eosinophil recruitment.

IFN- γ also plays a role in the nitric oxide pathway, inducing iNOS, an NO synthase (Boehm et al. 1997). Through the induction of NO production, IFN- γ inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells (Eastmond et al. 1997). Moreover, NO itself is a bronchodilator, and inhalation of high concentrations of NO has resulted in a small bronchodilatory response in asthmatic patients (Högman et al. 1993). NO has also shown a role in inhibiting proliferation and DNA synthesis in airway smooth muscle cells (Patel et al. 1999). Since hyperplasia and hypertrophy of airway smooth muscle are thought to contribute to airway dysfunctions such as asthma, NO induction could be an important inhibitor of these diseases (Patel et al. 1999).

Another critical role of IFN- γ in allergic reactions is its ability to inhibit immunoglobulin class switching to IgE, which is an important mediator of allergic pathologies induced by Th2 cytokines as discussed before (Boehm et al. 1997). Besides inhibiting IgE class switch, IFN- γ induces IgG production instead. IgG may neutralize inhaled allergens, and through interactions with Fc γ receptors (Fc γ R), may promote activation of accessory cells and enable Fc γ R-mediated endocytosis of allergen-IgG complexes, thereby promoting allergen capture and presentation by APC, such as alveolar macrophages (Sehra et al. 2003). This results on the activation of specific Th subsets, specially cells from the Th1 lineage, since several studies have shown that the APC activity of macrophages is associated with Th1 cell priming (Desmedt et al. 1998). In fact, treatment with anti-allergen IgG in the airways of sensitized mice was followed by an increment of secreted IFN- γ along with a shift from a Th2-skewed response to a more balanced Th1/Th2 response. In addition, a resulting reduction in eosinophils in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of these mice has also been observed after treatment (Sehra et al. 2003). For these reasons, it has been suggested that the induction of IFN- γ may be beneficial in regulating IgE-mediated inflammation. Thus, the decreased production of IFN- γ in asthmatic patients may enable an increase in IgE levels by either permitting IgE isotype switch of B cells or by permitting more CD4⁺ T cell progenitors to differentiate into Th2 cells.

It has also been reported the involvement of IFN- γ in apoptotic events. Inflammatory responses induced by allergen exposure cause mucus cell metaplasia by differentiation of existing and proliferating epithelial cells into mucus-storing cells. IFN- γ has a role in inducing apoptosis of these cells through the induction of caspases and Bax, two proapoptotic proteins, thereby recovering the original proportions of cell types in the airway epithelium (Shi et al. 2002, Tesfaigzi et al. 2002). Accordingly, IFN- γ has shown to induce apoptosis in T cells and eosinophils through caspase and CD95/Fas-mediated mechanisms, respectively (Luttman et al. 2000, Refaeli et al. 2002). Also, it has been indicated a correlation between increased IFN- γ production and enhanced apoptosis of eosinophils and CD4⁺ T cells in allergic airway infiltrates (Kodama et al. 2003). Thus, IFN- γ -mediated apoptosis induction of CD4⁺ T cells and eosinophils may be an alternative explanation for the suppressive effects of IFN- γ directly on the local recruitment of these cells in allergic situations.

The adoptive transfer of IFN- γ -producing cells into allergen-sensitized recipients has also protected from airway eosinophilia after antigen challenge. Indeed, when transferred into recipient mice, CD4⁺ Th1 cells have inhibited Th2-induced eosinophilia and mucus secretion through the production of IFN- γ , since IFN- γ R^{-/-} mice had prolonged eosinophilia (Cohn et al. 1999). However, other studies have suggested that adoptively transferred Th1 cells might induce an inflammatory response encountered in asthma due to the proinflammatory properties of IFN- γ . It really seems that an inflammatory response is necessary to activate lung macrophages to produce reactive oxygen species, which are important to airway remodeling. Lung macrophages are also able to selectively

promote Th1 responses during secondary exposure to inhaled allergen, thereby suppressing Th2-mediated allergic airway inflammation (Tang et al. 2001). Finally, IFN- γ secretion by transferred CD8⁺ T cells has also controlled airway eosinophilia in a model of allergen-challenged rats (Suzuki et al. 2002). Although increasing evidences suggest a protective role for IFN- γ against allergic diseases, conflicting results still regard its involvement in these responses (Hansen et al. 1999). Therefore, strengthening Th1 responses of allergic patients either by the adoptive transfer of activated antigen-specific T cells or by the administration of recombinant IFN- γ may only be considered as a potential immunotherapy intervention after further intensive investigations.

Concluding remarks

Several experimental findings have strongly supported the idea that the pathogenesis of allergic diseases is related to a misbalance between Th1/Th2 immune responses. For the past few years, it has been demonstrated that allergic inflammation is associated to an enhanced Th2 immune response. However, we now know that the absence of competent Th1 immune responses, specially the downregulation of IFN- γ , accounts for the establishment of these diseases. We reviewed here the recent data that demonstrate the importance of this cytokine in the modulation of allergic diseases. The development of novel therapeutic strategies has been designed to inhibit the development of Th2 cells (or the effect of their cytokines) and shift the immune response into a Th1 phenotype. In fact, the potent inhibitory property of IFN- γ on Th2 responses and allergic inflammation has suggested that it might be a possible treatment approach for such diseases. However, initial studies have shown unexpectedly high toxicity and several side effects related to IFN- γ administration to allergic patients. Even so, based on all findings related to IFN- γ modulation of Th immune response and allergy, any new possible immunotherapy approach developed for allergic inflammation will need to take into account the potent immunoregulatory properties of this cytokine.

REFERENCES

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 3: 549-557.
- Bach EA, Aguet M, Scheiber RD 1997. The IFN- γ : a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15: 563-591.
- Bocek P, Foucras G, Paul WE 2004. Interferon- γ enhances both in vitro and in vivo priming of CD4⁺ T cells for IL-4 production. *J Exp Med* 199: 1619-1630.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.
- Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, Leung DY 1995. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 95: 133-135.

- Bradley LM, Dalton DK, Croft M 1996. A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 157: 1350-1358.
- Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K 1999. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 190: 1309-1318.
- Constant SL, Bottomly K 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322.
- Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS, Anderson GP 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 156: 2680-2685.
- Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
- Desmedt M, Rottiers P, Dooms H, Fiers W, Grooten J 1998. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol* 160: 5300-5308.
- Dow SW, Schwarze J, Heath TD, Potter TA, Gelfand EW 1999. Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum Gene Ther* 10: 1905-1914.
- Eastmond NC, Banks EMS, Coleman JW 1997. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN- γ -induced suppression of exocytosis. *J Immunol* 159: 1444-1450.
- Elser B, Lohoff M, Kock S, Giaisi M, Kirchhoff S, Krammer PH, Li-Weber M 2002. IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17: 703-712.
- Farrar MA, Schreiber RD 1993. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11: 571-611.
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FHY, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336-338.
- Frandji P, Tkaczyk C, Oskéritzian C, Lapeyre J, Peronet R, David B, Guillet J-G, Mécheri S 1995. Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by IFN- γ . *Cell Immunol* 163: 37-46.
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S 2001. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 22: 556-560.
- Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doepker MP, Kavanaugh JL, Mishra A, Witte DP, Zhang H, Farber JM, Yang M, Foster PS, Rothenberg ME 2004. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1987-1992.
- Gajewski TF, Fitch FW 1988. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140: 4245-4252.
- Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR, Virgin HW, Schreiber RD 2001. Biologic consequences of STAT1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6680-6685.
- Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2: 677-687.
- Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK 1991. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 87: 1541-1546.
- Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103: 175-183.
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell Jr JE 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267: 1347-1349.
- Högman M, Frostell CG, Hedenström H, Hedenstierna G 1993. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 148: 1474-1478.
- Huang H, Paul WE 1998. Impaired interleukin 4 signaling in T helper type 1 cells. *J Exp Med* 187: 1305-1313.
- Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Larner AC, Finbloom DS 1994. Interferon-induces tyrosine phosphorylation of interferon-g receptor and regulated association of protein kinases, JAK1 and JAK2, with its receptor. *J Biol Chem* 269: 14333-14336.
- Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S 1993. Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 177: 573-576.
- Kodama T, Kuribayashi K, Nakamura H, Fujita M, Fujita T, Takeda K, Dakhama A, Gelfand EW, Matsuyama T, Kitada O 2003. Role of interleukin-12 in the regulation of CD4⁺ T cell apoptosis in a mouse model of asthma. *Clin Exp Immunol* 131: 199-205.
- Lametschwandtner G, Biedermann T, Schwärzler C, Günther C, Kund J, Fassel S, Hinteregger S, Carballido-Perrig N, Szabo SJ, Glimcher LH, Carballido JM 2004. Sustained T-bet expression confers polarized human Th2 cells with Th1-like cytokine production and migratory capacities. *J Allergy Clin Immunol* 113: 987-994.
- Lamkhioed B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Delespesse, Renzi PM 2003. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34⁺ progenitor cells. *J Immunol* 170: 537-547.
- Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 368-375.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15137-15142.
- Luttmann W, Dauer E, Schmidt S, Marx O, Hossfeld M, Matthys H, Virchow Jr JC 2000. Effects of interferon-g and tumor necrosis factor- α on CD95/Fas ligand-mediated

- apoptosis in human blood eosinophils. *Scand J Immunol* 51: 54-59.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-1910.
- Mullen AC, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Sykes KJ, Chodosh LA, Reiner SL 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable Th1 gene induction. *Nat Immunol* 3: 652-658.
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18: 451-494.
- Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103: 215-222.
- Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR 2001. Roles of phosphatidylinositol-3'-kinase in IFN- γ -dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 276: 33361-33368.
- Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG, Potter PC 1997. Reduced interferon-gamma but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 100: 662-668.
- Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA 1999. Constitutive expression of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J* 13: 1810-1816.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao C-a, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor *Eomesodermin*. *Science* 302: 1041-1043.
- Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P 1995. Lack of interferon- γ receptor b chain and the prevention of interferon g signaling in Th1 cells. *Science* 269: 245-247.
- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR 2002. STAT1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol* 23: 96-101.
- Refaeli Y, Parijs LV, Alexander SI, Abbas AK 2002. Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196: 999-1005.
- Renauld J-C 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 54: 577-589.
- Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, Drblik SP, Bérubé D, Gagnon MF, Spier S 1999. Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1417-1422.
- Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, Haegeman A, Matthys P, Tagawa Y, Pauwels R, Grooten J 2003. Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc γ R and IFN- γ . *J Immunol* 171: 2080-2089.
- Shi ZO-Q, Fischer MJ, De Sanctis GT, Schuyler MR, Tesfaigzi Y 2002. IFN- γ , but not Fas, mediates reduction of allergen-induced mucous cell metaplasia by inducing apoptosis. *J Immunol* 168: 4764-4771.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275: 77-79.
- Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA 1997. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J Biol Chem* 272: 30412-30420.
- Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, Tang ML 2002. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *J Allergy Clin Immunol* 110: 450-456.
- Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 10: 1593-1598.
- Suzuki M, Maghni K, Molet S, Shimbara A, Hamid QA, Martin JG 2002. IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J Allergy Clin Immunol* 109: 803-809.
- Sweetser MT, Hoey T, Sun YL, Weaver WM, Price GA, Wilson CB 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J Biol Chem* 273: 34775-34783.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21: 713-758.
- Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM 2001. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN- γ -dependent mechanism. *J Immunol* 166: 1471-1481.
- Tau G, Rothman P 1999. Biologic function of the IFN- γ receptor. *Allergy* 54: 1233-1251.
- Tesfaigzi Y, Fischer MJ, Daheshia M, Green FHY, De Sanctis GT, Wilder JA 2002. Bax is crucial for IFN- γ -induced resolution of allergen-induced mucus cell metaplasia. *J Immunol* 169: 5919-5925.
- Wenner CA, Güler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM 1996. Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156: 1442-1447.
- Wills-Karp M 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17: 255-281.
- Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A 1999. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11: 473-482.
- Zheng W, Flavell RA 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-596.

8.3 Capítulo de livro

Apêndice 8.3.1. Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF (2004). Imunologia tumoral. In: *Oncologia Molecular*. p. 105-112. Editores: CG Ferreira e JCC da Rocha. São Paulo, Editora Atheneu.

Imunologia Tumoral

João P.B. Viola
Leonardo K. Teixeira
Miriam B.F. Werneck

INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública mundial e uma das principais causas de morte entre crianças e adultos. Segundo a estimativa da incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (2003), as neoplasias são a segunda causa de morte por doença no Brasil¹. O Ministério da Saúde estima que em todo o Brasil no ano de 2003 ocorreram 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. A principal característica do câncer é um descontrole nas vias que regulam a proliferação e morte celular, afetando a homeostase tecidual. O desenvolvimento de uma célula tumoral ocorre através de uma sucessão de eventos mutacionais cumulativos de origem hereditária e ambiental. Em determinado momento, a célula perde o controle dos processos de divisão e diferenciação celular, tornando-se uma célula cancerosa. Hanahan e Weinberg sugeriram seis alterações essenciais na fisiologia celular que caracterizariam a transformação maligna: 1) auto-suficiência a sinais de crescimento celular; 2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento celular; 3) evasão dos programas de morte celular programada (apoptose); 4) potencial replicativo ilimitado; 5) angiogênese sustentada; e 6) invasão tecidual e metástase². Entretanto, após a transformação maligna, as células tumorais devem ser capazes de escapar dos mecanismos de defesa do organismo para gerar doença.

Os princípios básicos sobre imunidade antitumoral avançaram bastante a partir do final da década de 1950, quando Lewis Thomas desenvolveu a hipótese de que o sistema imunológico teria a capacidade de reconhecer e eliminar células tumorais geradas durante um processo de transformação celular maligna. No final dos anos 60, McFarlane Burnet definiu o termo vigilância imunológica. Ele propunha que o sistema imunológico estaria em um estágio de constante alerta

para resolver o aparecimento de antígenos tumorais estranhos que pudessem causar algum dano ao organismo. Esses conceitos contribuíram de forma definitiva para a compreensão atual sobre a imunidade de tumores, onde o reconhecimento de células tumorais pelo sistema imunológico ocorre frequentemente, em diversas etapas, e através de diferentes componentes. Em situações normais, o organismo é capaz de destruir clones de células transformadas antes mesmo que ocorra sua malignização, ou ainda combater células tumorais já formadas que possam levar ao câncer. Contudo, o estabelecimento de um tumor pode acontecer através de falhas do sistema imunológico nesse combate, seja pelo aparecimento de mecanismos de escape tumoral, ou ainda por uma deficiência imune do organismo. Algumas infecções virais estão relacionadas com a patogênese de tumores, como, por exemplo, infecções pelo vírus Epstein-Barr, vírus da hepatite e papilomavírus. Além disso, o surgimento de alguns tipos de tumores malignos como sarcomas, linfomas e carcinomas ocorrem com maior incidência em indivíduos imunocomprometidos. Isto indica claramente que o sistema imunológico previne o desenvolvimento de tumores em indivíduos sadios, seja através da imunidade gerada contra patógenos externos ou através da eliminação de determinadas células com potencial oncogênico.

O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico é composto por um conjunto de células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo. A resposta imune, de uma maneira geral, é gerada para proteger o indivíduo de certas infecções e eliminar antígenos estranhos ao corpo. A ativação deste sistema envolve a participação de diferentes tipos celulares e mecanismos efetores. A geração da resposta imune acontece através da dife-

renciação e proliferação de compartimentos celulares específicos e da regulação estreita de cada um dos efeitos gerados por esses componentes. A perda do controle da resposta imunológica pode levar ao aparecimento de alergias, inflamações, doenças auto-imunes e câncer².

OS COMPONENTES DO SISTEMA IMUNE

As células do sistema imune são geradas a partir da diferenciação de células-tronco hematopoéticas na medula óssea. Essas células originam precursores mielóides e linfóides que são os responsáveis pela ampla heterogeneidade encontrada dentro deste sistema. Os precursores mielóides são capazes de se diferenciar em monócitos, eritrócitos e granulócitos, dentre outras células. Os precursores linfóides irão se diferenciar em células NK (*Natural Killer*) e em linfócitos B e T nos órgãos linfóides primários. Após a maturação e diferenciação, estas células irão colonizar os órgãos linfóides secundários, terciários e quaternários. Os linfócitos B iniciam seu processo de diferenciação na medula óssea, passam por seguidos processos de rearranjo gênico de maneira independente de antígeno, até chegarem a um estágio de células B imaturas. Nesse estágio de diferenciação, estas células migram para a periferia onde serão testadas para a capacidade de tolerância ao próprio e capacidade de sobrevivência. As células que passarem por essas etapas sofrerão mais uma etapa de diferenciação para atingirem o estado de linfócitos B maduros, que irão ser ativados após se encontrarem com antígeno específico. A ativação de linfócitos B ocorre após a ligação do antígeno específico com o receptor de célula B (BCR, *B Cell Receptor*) que vai levar à ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. A associação entre o sinal desencadeado pela ligação antígeno-BCR e a presença de citocinas neste microambiente irão estimular as células B maduras a proliferarem e diferenciarem em células produtoras de imunoglobulinas. Os precursores de linfócitos T também se originam na medula óssea, porém a sua maturação e diferenciação ocorrem no timo. Nesse órgão, os linfócitos T imaturos passam por uma série de rearranjos gênicos que levam à expressão do seu receptor e passam por processos de seleção que levam à formação do repertório de linfócitos T maduros. Os linfócitos T maduros se diferenciam em dois tipos celulares, caracterizados pela expressão das moléculas CD4 e CD8 na superfície celular. Os linfócitos T CD4⁺ são denominados T *helper* ou auxiliares (Th) e os linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos com o processo de citotoxicidade.

A resposta imunológica é caracterizada por uma primeira linha de defesa rápida e pouco específica, denominada imunidade inata; seguida de uma resposta de grande especificidade, denominada imunidade adaptativa. As células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, são as responsáveis pela eliminação local dos antígenos através da fagocitose e da produção de citocinas inflamatórias. As células NK são também encontradas nestes sítios e apresentam uma grande capacidade citotóxica, além de serem excelentes produtoras de interferon-gama (IFN- γ), aumentando o poder de endocitose das células fagocíticas residentes. O sistema complemento e outras substâncias presentes na circulação

sanguínea também compõem o sistema imune inato. Além disso, o sistema imune inato é capaz de estimular uma resposta imune mais específica (adaptativa), oferecendo sinais para a ativação de linfócitos T e B específicos para determinado antígeno.

ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA

A ativação de linfócitos T desempenha um papel central na resposta imune. Os linfócitos T apenas reconhecem antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APC, *Antigen-Presenting Cell*), sendo as células dendríticas e macrófagos os mais eficientes neste processo. As APCs processam os antígenos em fragmentos peptídicos que são colocados em estruturas denominadas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). O reconhecimento antigênico através do receptor de células T (TCR, *T Cell Receptor*) é o estímulo inicial para sua ativação e está relacionado com a resposta funcional destas células. Esta resposta desempenha uma função de extrema importância tanto na resposta imune celular quanto na resposta humoral. As células T maduras apresentam o complexo TCR completamente formado em sua superfície e podem ser diferenciadas quanto à expressão dos co-receptores CD4 ou CD8. Para iniciar a resposta imune, o TCR deve ligar-se ao MHC de classe I ou de classe II, que estão associados com fragmentos de antígenos ou de peptídeos próprios derivados da degradação de proteínas sintetizadas na própria célula (MHC de classe I) ou ingeridas por vias endocíticas (MHC de classe II). A ligação TCR-MHC-peptídeo forma as bases moleculares do reconhecimento específico do antígeno restrito ao MHC, onde o co-receptor CD4 reconhece as moléculas de MHC de classe II e o CD8 reconhece as moléculas de MHC de classe I. Este fenômeno está relacionado ao controle de rejeição a transplantes e à resposta imune a infecções e a tumores, uma vez que a ativação de células T é de extrema importância tanto na resposta imune celular quanto na resposta humoral.

Apesar de a ligação antígeno-TCR desempenhar um papel central na ativação de linfócitos T, várias moléculas acessórias apresentam uma função de extrema importância neste processo. Os sinais co-estimulatórios para a ativação de linfócitos T são mediados pelas interações moleculares entre os receptores expressos nos linfócitos T e seus respectivos ligantes nas APCs. Os principais sinais co-estimuladores resultam da ligação entre os receptores CD28 e CTLA-4 (CD152) expressos em linfócitos T, com seus ligantes B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) expressos nas APCs. As proteínas da família B7 apresentam um papel dual na resposta imune, podendo interagir com CD28, aumentando e sustentando a ativação de linfócitos T; e também interagir com CTLA-4, gerando um sinal inibitório. Estes sinais co-estimuladores são denominados de segundo sinal de ativação, e o conjunto de sinais intracelulares gerados pela interação TCR-MHC-peptídeo (primeiro sinal) e as moléculas co-estimuladoras (segundo sinal) é que levarão à ativação celular e à aquisição das funções efetoras pelos linfócitos T, determinando uma resposta imune eficiente e específica.

A resposta ao estímulo antigênico leva os linfócitos Th ($CD4^+$) *naive* a diferenciarem em pelo menos dois tipos de células efetoras, denominadas Th1 ou Th2. Estas células são caracterizadas pelos seus padrões distintos de expressão de citocinas, assim como pelos seus diferentes efeitos sobre a resposta imune. A principal característica das células Th1 é a secreção de $IFN-\gamma$, mediando principalmente a imunidade celular, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, mediando a resposta imune dependente de células B (humoral). A descrição inicial desta dicotomia na diferenciação de células Th foi relacionada a um possível efeito na patogênese de diferentes síndromes clínicas, como nas doenças infecciosas, auto-imunes, alérgicas e tumorais. Vários fatores influenciam a diferenciação do fenótipo de células T durante o processo de ativação. Este processo parece ser dividido em diferentes estágios de diferenciação, e o microambiente onde as células T maduras entram em contato com o antígeno desempenha uma função central neste processo. Tem sido demonstrado que $IFN-\gamma$ e IL-12 estão envolvidos na diferenciação para o fenótipo Th1 e IL-4 para o fenótipo Th2. Além disso, a diferenciação dos linfócitos para os tipos Th1 ou Th2 também apresenta um importante componente genético. Uma região do cromossomo 11 de camundongo, que apresenta um conjunto de genes incluindo os das cito-

cinas GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13, foi anteriormente identificada como sendo um *locus* que pode estar relacionado com o controle genético na diferenciação Th1/Th2. Esta região gênica foi mapeada em humanos no cromossomo 5, e em estudos genéticos foi correlacionada com níveis elevados de IgE em pacientes atópicos. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação Th1/Th2 ainda não estão bem compreendidos e têm sido alvo de intensa investigação. A melhor compreensão deste fenômeno pode trazer novas propostas terapêuticas para diversas síndromes clínicas¹ (Fig. 10.1).

IMUNIDADE TUMORAL

O acúmulo sucessivo de eventos mutacionais herdados ou adquiridos em uma célula normal leva ao surgimento de uma célula tumoral. A transformação celular maligna é caracterizada por mutações genéticas que causam uma desregulação na expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação ou apoptose celular. Assim, ao longo desta transformação, uma célula normal pode vir a expressar uma proteína em níveis anormais ou mesmo novas proteínas que não eram expressas anteriormente, perdendo o controle dos processos celulares vitais. Isto faz com que células tumorais

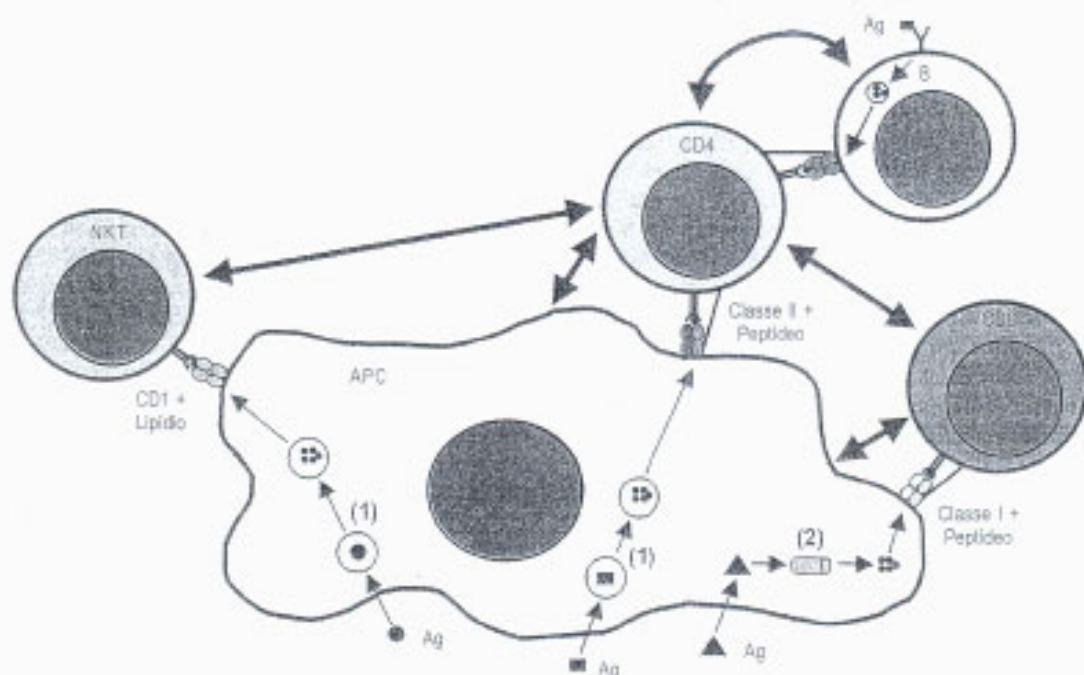


Fig. 10.1 — Representação esquemática da integração do sistema imune. A célula apresentadora de antígeno (APC) é mostrada apresentando antígenos (Peptídeo) no contexto do MHC de classe I (Classe I), MHC de classe II (Classe II) ou CD1. O processamento de antígenos (Ag) pela APC está sendo representado por duas vias: dependente de lisossomo (1) e dependente de proteossomo (2). O reconhecimento de antígenos está sendo feito por células CD4, CD8 ou NKT através do receptor de célula T (TCR). A célula B está representada após a captação de antígeno (Ag) por uma imunoglobulina de superfície (BCR), e apresentando o mesmo antígeno processado (Peptídeo) no contexto do MHC de classe II. As setas representam estimulação celular por fatores solúveis secretados, possivelmente citocinas, pelas diferentes células. O contato simultâneo entre as diferentes células e a APC não significa que este fenômeno ocorre desta maneira *in vivo*, entretanto vários resultados sugerem que pode ocorrer no centro germinativo.

apresentem na sua superfície antígenos alterados em relação às células normais (TAAs: *Tumor-Associated Antigens*) ou mesmo antígenos específicos de tumores (TSAs: *Tumor-Specific Antigens*). Algumas metodologias de biologia molecular têm possibilitado análises de expressão gênica em larga escala comparando as informações existentes em células normais e tumorais. Estes estudos visam à identificação de antígenos tumorais imunogênicos para que seja estabelecida uma ligação entre a genômica do câncer e a imunologia de tumores. A caracterização de antígenos tumorais eficazes na geração da resposta imune do hospedeiro através de vacinas ou abordagens de imunoterapia é certamente um dos maiores desafios desta área¹².

ANTÍGENOS TUMORAIS

Alguns dos principais antígenos capazes de gerar uma resposta imunológica eficiente do organismo no combate às células tumorais são produtos de oncogenes ou genes supressores de tumor. No processo de transformação, as células passam a expressar, de maneira desregulada, proteínas envolvidas no ciclo celular, como exemplo Ras, BCR-ABL e p53, dentre outras. Essas proteínas são sintetizadas normalmente pela célula transformada e seguem o caminho natural de processamento e apresentação de peptídeos na membrana plasmática celular através de moléculas de MHC de classe I. Linfócitos T CD8⁺ são capazes de reconhecer estes antígenos na superfície das células tumorais e desenvolver uma resposta citotóxica contra estas células. A apresentação de peptídeos através de moléculas de MHC de classe II, através da fagocitose de células tumorais, também pode ativar linfócitos T CD4⁺ específicos. Estas células são responsáveis pela produção de diversas citocinas que irão atuar desde o aumento da eficiência de fagocitose de células tumorais, até a expansão dos clones de linfócitos B e T CD8⁺ específicos ao reconhecimento dos antígenos tumorais. Em pacientes com câncer, são encontrados linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ responsivos a antígenos tumorais em um número bastante aumentado. Estes antígenos são considerados excelentes alvos para o desenvolvimento de vacinas, já que são potentes indutores de resposta imune antitumoral. Outras diversas proteínas celulares normais podem atuar como antígenos tumorais, caso ocorra a perda no controle da expressão destes genes. Além da desregulação nos níveis de expressão, algumas proteínas podem vir a ser expressas em momentos inoportunos para o tecido ou mesmo em tecidos sadios onde normalmente não seriam detectadas, levando uma célula à transformação maligna. A tirosinase, enzima envolvida na síntese de melanina, é constantemente encontrada em níveis aumentados em melanomas, assim como as proteínas MAGE (*Melanoma Antigen Genes*) são detectadas em diferentes carcinomas e melanomas, mas somente expressas em testículos e placenta de indivíduos normais. Existem ainda alguns trabalhos na literatura propondo que a invasividade tecidual, ou malignização do tumor, está relacionada com a expressão desordenada de algumas glicoproteínas de membrana nas células cancerosas, como alguns gangliosídeos (GM2, GD2 e GD3, por exemplo) e mucinas (MUC-1, CA-19.9, CA-125).

Além disso, o processo de metástase conta ainda com uma desregulação na expressão de quimiocinas (citocinas quimiotáticas) e de seus receptores presentes nas células tumorais, levando a um aumento no poder de migração e invasão tecidual¹³.

Diversos agentes externos ao organismo podem funcionar como indutores de tumor. Os vírus, as radiações UV e algumas drogas são capazes de induzir mutações genéticas e levar as células ao processo de transformação. Antígenos presentes em vírus como o Epstein-Barr, herpes, papilomavírus e HIV estão entre os principais ativadores da resposta imunológica antitumoral. A infecção pelo vírus Epstein-Barr está associada ao surgimento do carcinoma de faringe, linfoma de Burkitt e diversos outros tipos de linfomas. A proteína EBNA-1 (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*) deste vírus é extremamente imunogênica e capaz de gerar uma resposta imunológica complexa que envolve linfócitos T CD8⁺, CD4⁺, macrófagos, células NK, dentre outras células. Um sistema imune competente tem um papel de vigilância contra tumores induzidos por vírus, uma vez que apresenta células específicas para o reconhecimento e eliminação das células infectadas por estes patógenos. Os peptídeos virais imunogênicos são apresentados para células T específicas através das moléculas de MHC de classe I. Este contato dispara inúmeros eventos responsáveis pela eliminação da célula tumoral do organismo. Contudo, indivíduos imunossuprimidos ou imunodeficientes apresentam dificuldades em controlar infecções deste tipo e, portanto, são mais susceptíveis ao aparecimento de tumores. Pacientes infectados com o vírus HIV, e que tenham desenvolvido a AIDS, apresentam alta incidência de carcinomas, sarcoma de Kaposi e linfomas de células B. Outro vírus causador de linfomas e com mecanismo de atuação semelhante ao do HIV, o HTLV-1 (*Human T cell Lymphotropic Virus-1*), é capaz de infectar linfócitos T CD4⁺, causando um comprometimento deste tipo celular no indivíduo infectado e gerando uma leucemia de células T nesses pacientes.

RECONHECIMENTO E ELIMINAÇÃO DO TUMOR

O reconhecimento de antígenos tumorais envolve vários tipos celulares e moléculas do sistema imunológico^{14,15}. Em tecidos neoplásicos são encontrados macrófagos ativados, células NK, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos para peptídeos tumorais, assim como altos títulos de imunoglobulinas contra um vasto repertório destes antígenos. Lesões tumorais de carcinoma de cólon e melanomas com infiltrados celulares que apresentem esta composição estão relacionados com um melhor prognóstico da doença. A presença destas células permite um aumento da capacidade proliferativa do sistema imune e da frequência de células específicas contra antígenos tumorais, principalmente linfócitos T CD8⁺. A eliminação das células tumorais requer, portanto, o envolvimento dos componentes da imunidade inata, assim como os da imunidade adaptativa, através da geração de uma resposta imune humoral e celular integrada.

Certamente, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, juntamente com as células NK, são as principais células efetoras da imunidade celular tumoral. Estas células são responsáveis pelo

reconhecimento de antígenos na superfície de células tumorais induzidas por infecção viral ou por agente químico. O reconhecimento dos antígenos tumorais pode acontecer ainda por um processo alternativo, conhecido como apresentação cruzada. Neste evento, células tumorais são ingeridas por fagócitos e seus antígenos podem ser deslocados do fagossoma para o citoplasma, onde serão processados e apresentados para linfócitos T CD8⁺ através de moléculas de MHC de classe I. Este processo de fagocitose é o caminho natural para a ativação de linfócitos T CD4⁺ através da apresentação de peptídeos tumorais por moléculas de MHC de classe II. Após o reconhecimento, os linfócitos são ativados e iniciam um processo de proliferação e diferenciação celular, originando linfócitos T CD8⁺ efetores capazes de induzir a lise das células-alvo. O contato com a célula tumoral induz os linfócitos T CD8⁺ a liberarem grânulos citoplasmáticos contendo perforinas e granzimas. As perforinas induzem a formação de poros nas células-alvo, permitindo a entrada das granzimas que induzem apoptose através da ativação de caspases. Outro mecanismo de indução de apoptose das células tumorais pelos linfócitos T CD8⁺ é a expressão do ligante de Fas (Fas-L) na superfície destes linfócitos. A interação de Fas-L com a molécula Fas, presente na superfície de diversos tipos celulares, leva à transdução de sinais intracitoplasmáticos para a ativação de caspases. Modelos experimentais em camundongos demonstraram que deficiências na sinalização de Fas/FasL estão relacionadas com um aumento na incidência de linfomas. Além disso, linfócitos T CD8⁺ efetores são excelentes produtores de citocinas, como IFN- γ , linfotoxinas e TNF- α . Estas citocinas estão relacionadas com a ativação de macrófagos pela expressão de moléculas co-estimuladoras (B7.1 e B7.2) e com a indução de inflamação, e portanto exercem um papel na atividade antitumoral.

Através da produção de citocinas, os linfócitos T CD4⁺ possuem um papel fundamental na sustentação da expansão clonal linfocitária e na geração de uma resposta inflamatória. A ativação destes linfócitos acontece através do reconhecimento de antígenos associados a moléculas de MHC de classe II na superfície de fagócitos. Estes antígenos são produtos da endocitose de células tumorais e do processamento de seus peptídeos no citoplasma das células apresentadoras. Após a ativação, os linfócitos T CD4⁺ produzem altos níveis de IL-2, que é um fator de crescimento e proliferação linfocitária, tanto para linfócitos T CD4⁺ como para linfócitos T CD8⁺. Além de IL-2, estes linfócitos produzem altos níveis de IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 e TNF- α , entre outras citocinas.

Através da produção destas citocinas, os linfócitos T CD4⁺ estabelecem uma comunicação estreita entre a resposta imune inata e a adaptativa, que é fundamental para uma resposta antitumoral eficiente. A produção de TNF- α e algumas quimiocinas induzem a expressão de ligantes específicos para leucócitos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, recrutando estas células para o local da inflamação. A alta produção de IL-4 e IL-5 por linfócitos T CD4⁺ estimula a produção de IgE por linfócitos B e a ativação e diferenciação de eosinófilos, respectivamente, induzindo respostas inflamatórias com predominância de mastócitos e eosinófilos. As citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺ também levam à ex-

pansão de linfócitos B específicos que tenham sido ativados contra determinado antígeno tumoral. Esta expansão de clones específicos de linfócitos B leva à produção de diversas imunoglobulinas. As imunoglobulinas exercem um papel importante tanto na ativação do sistema complemento contra células tumorais, como na indução de uma forma de citotoxicidade mediada por anticorpos. Uma vez produzidas, as imunoglobulinas podem reconhecer antígenos na superfície das células tumorais e induzir a formação de poros na membrana destas células através da ativação do sistema complemento. Alternativamente, células NK ou macrófagos são atraídos pela ligação das imunoglobulinas na superfície das células tumorais, induzindo a lise destas células por citotoxicidade (ADCC; *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*).

Os níveis de IFN- γ produzidos por células CD4⁺, CD8⁺ e NK participam em diversas etapas da montagem de uma resposta imune eficiente contra o tumor. Esta citocina induz a ativação de macrófagos através do aumento da expressão de moléculas de MHC de classe I, de moléculas co-estimuladoras (B7.1 e B7.2), do aumento do poder de fagocitose destas células e da produção de IL-12. De fato, Schreiber e col. demonstraram que camundongos deficientes para a via de sinalização de IFN- γ são mais susceptíveis à formação de tumor quando tratados com agentes carcinogênicos, evidenciando um papel direto para o IFN- γ na ativação de células específicas que atuam durante a eliminação do tumor⁹. Camundongos deficientes para IFN- γ , IL-12, CD8⁺ ou células NK também desenvolvem mais tumores em modelos semelhantes, indicando um papel crucial para o IFN- γ na imunidade tumoral. A produção aberrante ou o defeito na sinalização destas citocinas levam a alterações no crescimento celular, na diferenciação e na apoptose, culminando com o estabelecimento do tumor.

As células NK representam a primeira linha de defesa na imunidade antitumoral e são capazes de induzir a lise de células que apresentem uma diminuição na expressão de MHC de classe I em sua superfície. Este é um artifício bastante encontrado em células tumorais como mecanismo de escape. A diminuição de moléculas de MHC I na superfície evita que estas células sejam reconhecidas e lisadas por linfócitos T CD8⁺ específicos. Neste contexto, a função das células NK se torna primordial no combate à carcinogênese. O reconhecimento das células tumorais ocorre através de uma série de receptores específicos encontrados na superfície das células NK, como os receptores NKG2C e D, NKp e a família KIR/LIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*). Uma vez ativadas, as células NK liberam diversas citocinas, principalmente IFN- γ , e perforinas que induzem a formação de poros nas células tumorais em um processo de citotoxicidade muito semelhante ao desempenhado por linfócitos T CD8⁺. A atividade das células NK pode ser aumentada por citocinas produzidas por linfócitos, como IL-2, IL-12 e IFN- γ , induzindo assim suas funções proliferativas, citolíticas e antitumorais. Uma subpopulação de linfócitos T que expressa na membrana plasmática marcadores de células NK, chamadas células NKT, também apresenta extensa atividade antitumoral. Estas células são excelentes produtoras de citocinas, indutoras de lise e reguladoras da atividade de células T CD8⁺ e células

NK, funcionando como uma ponte entre os sistemas inato e adquirido. Em modelos experimentais, tanto camundongos deficientes em células NK como em células NKT são mais susceptíveis ao desenvolvimento de sarcomas induzidos por agentes carcinogênicos, como o metilcolantreno, indicando um papel *in vivo* fundamental para estes tipos celulares durante a carcinogênese.

Considerando o sistema imune inato, os macrófagos também ocupam um papel central no combate a células neoplásicas. A ativação destas células acontece por reconhecimento de antígenos na superfície de células tumorais ou ainda, de forma indireta, pela produção de IFN- γ por linfócitos T específicos. Após maturação e expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície, estas células produzem diversas citocinas, liberam enzimas lisossômicas e produzem espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico (NO), todas importantes na destruição de células tumorais. Estas células também produzem grandes quantidades de TNF- α , que induz a apoptose de células tumorais através da ativação de caspases efetoras acopladas à via do receptor de TNF. O TNF- α , também produzido por células NK e linfócitos T, tem um papel na inflamação, atuando na vasculatura do endotélio e permitindo o recrutamento e ativação de neutrófilos. Inflamações crônicas induzem um aumento na taxa de reposição celular e podem contribuir de diferentes maneiras para a carcinogênese. Diversos estudos têm demonstrado que a administração crônica de aspirina e de outros anti-inflamatórios não-esteroidais (NSAIDs, *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*) reduz significativamente a incidência da formação de tumores, principalmente em câncer de cólon e outros adenocarcinomas¹⁸. Estas drogas são inibidoras diretas da enzima ciclooxigenase, (COX) que está envolvida na síntese de prostaglandinas e na regulação de proteínas relacionadas com a apoptose, a proliferação celular e a angiogênese, como Bcl-2 e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Estas drogas exercem um papel antiproliferativo e pró-apoptótico através da inibição de COX-2 em diversas linhagens celulares e culturas de células primárias humanas, sugerindo, assim, um papel na prevenção da formação de tumores²⁰.

Em resumo, o reconhecimento e a eliminação de células tumorais acontecem freqüentemente no organismo através da geração de uma imunidade antitumoral. Esta resposta imunológica conta com a participação de diversos tipos celulares e moléculas que estão interconectados e são capazes de gerar eficientemente tanto uma resposta celular quanto humoral. O estreito contato entre o sistema imune inato e adaptativo permite uma ação contra tumores em diferentes níveis, evitando o surgimento do câncer. Contudo, em algumas situações discutidas a seguir, o sistema imunológico não é capaz de conter o avanço de células transformadas e permite o estabelecimento tumoral.

MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL

EVASÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Tumores são capazes de desenvolver mecanismos de resistência à resposta imunológica gerada pelo organismo e

escapar do combate do sistema imune²¹. A alta taxa de reposição e proliferação das células cancerosas dificulta um controle efetivo do sistema imune e, assim, algumas células conseguem escapar dos mecanismos de defesa. Um dos principais recursos para o escape encontrado em alguns tipos de tumores é a diminuição da expressão de moléculas de MHC de classe I. Como descrito anteriormente, a ativação de linfócitos T CD8⁺ depende da interação entre seu TCR e a molécula de MHC de classe I expressa na superfície da célula-alvo. O receptor de linfócitos T CD8⁺, portanto, reconhece especificamente peptídeos encontrados nas células tumorais provenientes de proteínas normais modificadas ou expressas em níveis anormais. A diminuição da expressão de MHC de classe I confere vantagens à célula-alvo, uma vez que isto implica uma menor apresentação de antígenos na sua superfície, diminuindo as chances de exposição dos antígenos tumorais ao reconhecimento por linfócitos T CD8⁺. Alterações na expressão de moléculas de MHC de classe II também estão associadas com o infiltrado de linfócitos T CD4⁺ encontrado na região tumoral e com a progressão de alguns tumores, como melanomas e osteosarcomas.

Diversos estudos demonstram que a expressão de outras proteínas envolvidas em diferentes etapas do processamento de antígenos, como as proteínas LMP2 e LMP7 (*Low-Molecular-weight Protein*) do proteossomo e a proteína TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), também se encontra diminuída em tumores *in vivo*, como linfomas de Burkitt, câncer de mama e carcinoma renal. De maneira geral, estes eventos dificultam a apresentação de antígenos tumorais em células cancerosas e, portanto, limitam a geração de uma resposta imune específica contra o tumor¹⁴. Os vírus do herpes e os adenovírus são bastante eficientes nestes mecanismos de escape tumoral. Eles são capazes de induzir a diminuição da expressão de proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e assim dificultar a ativação linfocitária. Estes vírus ainda evoluíram a capacidade de diminuir a expressão de alguns dos antígenos virais mais imunogênicos com o objetivo de mascarar a infecção viral e evitar o ataque do sistema imunológico.

Outro mecanismo de escape freqüentemente encontrado em tumores é a indução da diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs, uma vez que a presença destes receptores na superfície das células fagocíticas é fundamental para a ativação de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ específicos contra o tumor. Abordagens de imunoterapia incluem uma busca no aumento da expressão das moléculas B7.1 e B7.2, visando à estimulação de linfócitos T específicos contra o tumor. Finalmente, a expressão de algumas proteínas na membrana de células tumorais pode gerar uma inibição tanto de células NK quanto de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e consolidar o estabelecimento do tumor. Este fenômeno se torna evidente em alguns trabalhos que demonstram uma incapacidade do organismo em rejeitar certos tumores sólidos que apresentam um importante infiltrado linfocitário.

A análise de células tumorais demonstrou que alguns tipos de tumores expressam proteínas como o TGF- β , que tem um papel importante na supressão da resposta imunológica. Esta citocina, além de apresentar uma importante ação inibi-

tória em linfócitos que infiltram o tecido neoplásico, também modifica a expressão de moléculas de adesão e de seus ligantes em células endoteliais. Desta forma, o TGF- β leva a uma diminuição do influxo de células inflamatórias para o tecido tumoral, diminuindo a inflamação e conseqüentemente a resposta imune local. Além disso, alguns trabalhos mostram que o TGF- β apresenta diferentes efeitos dependendo do estágio de desenvolvimento do tumor. Esta citocina, quando presente no início do desenvolvimento tumoral, é importante para o escape da resposta imune, mas se presente em momentos mais tardios é capaz de induzir metástase.

O controle da resposta imune é fundamental durante a prevenção do surgimento de doenças auto-imunes. Algumas células do organismo exercem um papel regulatório da resposta imunológica, agindo como células supressoras desta resposta a fim de que seja evitada uma destruição do sistema. As células T regulatórias, em certo momento definidas como linfócitos T CD4⁺/CD25⁺, suprimem a ativação e proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺ através do contato direto com a célula efetora, ou pela produção de algumas citocinas, como TGF- β e IL-10. As células NKT também apresentam uma atividade supressora através da produção de IL-13, que é um potente inibidor da resposta imune. Estas células exercem, portanto, não só um papel na regulação da geração de uma resposta imune, mas também podem atuar como repressoras da imunidade tumoral, permitindo assim o estabelecimento do tumor.

ESTABELECIMENTO DO TUMOR

Em humanos, o perfil da resposta imunológica em situações tumorais parece estar mais relacionado com um fenótipo do tipo Th2, caracterizado pela alta produção das citocinas IL-4 e IL-10, e baixa produção de IFN- γ ¹². De fato, o infiltrado linfocitário em tumores benignos de pele tem predominância de linfócitos do tipo Th1, ao passo que em carcinomas são encontrados preferencialmente células com o fenótipo Th2¹³. Em modelos murinos de melanomas, células com alto poder metastático apresentam a capacidade de induzir uma resposta com perfil Th2, enquanto células menos agressivas induzem uma resposta do tipo Th1¹⁴. De maneira geral, uma resposta do tipo Th2 permite o escape de células cancerosas e parece estar associada a um pior prognóstico para o paciente, uma vez que inibe a geração da resposta imune celular que é fundamental para a rejeição do tumor.

Outro fator importante no fenômeno de escape tumoral é a expressão da molécula Fas-L. Linfócitos expressam constitutivamente o receptor Fas em sua superfície, ao passo que algumas células tumorais expressam Fas-L na sua própria membrana. A interação da molécula Fas com o seu ligante na superfície da célula tumoral promove a morte do linfócito por apoptose através da ativação de caspases. Desta forma, a célula neoplásica induz a morte de células efectoras do sistema imune e se protege do ataque específico de linfócitos T.

Conforme discutimos, a integridade do sistema imunológico é fundamental para a montagem de uma resposta antitumoral eficiente. Indivíduos imunodeficientes ou imunocomprometidos, seja em virtude de uma infecção viral ou mesmo

de uma doença congênita, apresentam dificuldades em resolver os mecanismos de escape impostos pelas células tumorais e, portanto, apresentam uma maior incidência de tumores. Mesmo em situações normais, alguns antígenos tumorais parecem invisíveis ao reconhecimento do sistema imunológico. Em sua grande maioria, a natureza destes antígenos é própria do organismo (*self-antigens*). Desta forma, células tumorais podem ser normalmente ignoradas ou ainda reconhecidas como próprias pelo sistema imune, caracterizando um mecanismo conhecido por tolerância imunológica. Alguns tumores podem também induzir um estado de anergia em linfócitos T específicos¹⁵. No momento do reconhecimento do antígeno tumoral pela célula T, via interação TCR-MHC, o linfócito T depende de sinais co-estimulatórios expressos pela célula apresentadora para ser ativado. Um mecanismo de escape frequentemente encontrado em tumores e discutido anteriormente é a indução da diminuição destas moléculas co-estimulatórias nas APCs. Assim, não ocorre a ativação de linfócitos T específicos contra os peptídeos tumorais, comprometendo a montagem da resposta antitumoral. Todos estes mecanismos de regulação intrínsecos ao sistema imunológico previnem o desenvolvimento de doenças auto-imunes. A anergia, a ignorância imunológica e a deleção de clones de linfócitos T auto-reativos são mecanismos necessários para a tolerância imunológica normal em um indivíduo, mas podem estar implicados na falência do reconhecimento e eliminação de células tumorais.

CONCLUSÕES

O câncer é um importante problema de saúde em todo o mundo e apresenta uma alta taxa de mortalidade. As células neoplásicas se caracterizam por apresentarem uma desregulação na taxa de proliferação e morte celular que ocorre devido a eventos mutacionais em vias que regulam estes processos. Estas mutações levam a célula transformada a perder o controle de divisão e diferenciação celular. Entretanto, para gerar doença, as células tumorais devem escapar dos mecanismos de defesa do organismo, incluindo a resposta imune. O sistema imunológico está em constante "vigilância", sendo capaz de reconhecer e destruir células tumorais. Contudo, o desenvolvimento do tumor pode acontecer por falhas do sistema imunológico no reconhecimento destas células, normalmente pelos mecanismos de escape que as células tumorais podem desenvolver ou por uma imunodeficiência do organismo. A ativação do sistema imunológico envolve a participação de diferentes tipos celulares e mecanismos efetores. Esta resposta é caracterizada por uma primeira defesa rápida e inespecífica, chamada de imunidade inata, onde granulócitos, macrófagos e células NK são as principais células efectoras; seguida de uma resposta específica ao antígeno, denominada de imunidade adaptativa, onde as APCs e os linfócitos B e T desempenham as suas atividades principais. Várias moléculas, como citocinas e moléculas co-ativadoras, além do processo inflamatório local, desempenham um papel central no desenvolvimento da resposta imune. Deve ser ressaltado que o mecanismo efetor mais importante na resposta antitumoral é a citotoxicidade, sendo as células NK e os

linfócitos T CD8⁺ as principais células efetoras envolvidas neste processo. O grande desafio atual na área de imunologia tumoral é o desenvolvimento de terapias antitumorais baseadas na imunoterapia e vacina. Estas terapias têm como objetivo principal estimular a resposta imune do organismo, levando a uma ativação da vigilância imunológica e a uma quebra do escape tumoral, e que tenham poucos efeitos adversos. A imunoterapia se baseia na ativação de mecanismos efetores da resposta imune, sendo empregado no tratamento de tumores já estabelecidos. Por outro lado, a vacina antitumoral é empregada na prevenção de tumores. Atualmente, várias estratégias estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de vacinas antitumorais, como a utilização de diferentes formas de antígenos tumorais associados a citocinas, adjuvantes ou células dendríticas. Os grandes avanços recentes no aprimoramento de técnicas em genética, biologia molecular e bioquímica têm impulsionado a aquisição de conhecimento em imunologia tumoral. Estas técnicas estão caracterizando diferentes antígenos tumorais em larga escala, como nas áreas de genômica e proteômica, possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens em imunoterapia ou no desenvolvimento de vacinas antitumorais. Estudos recentes demonstraram que o desenvolvimento de vacinas utilizadas na profilaxia de tumores deve ser o caminho a ser seguido para o desenvolvimento de novas terapias para as doenças neoplásicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-93, 1996.
2. Abbas AK, Janeway Jr CH. Immunology: Improving on nature in the twenty-first Century. *Cell* 100:129-38, 2000.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to tumors. In: Cellular and molecular immunology, 4th ed. W.B. Saunders Company USA, Philadelphia, 384-403, 2000.
4. Drake CG, Pardoll DM. Tumor immunology - towards a paradigm of reciprocal research. *Semin Cancer Biol* 12:73-80, 2002.
5. Dranoff G. Tumor immunology - immune recognition and tumor protection. *Curr Opin Immunol* 14:161-4, 2002.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.
7. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade de câncer no Brasil. Disponível na Internet: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>, 2003.
8. Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* 154:745-54, 1999.
9. Kaplan D, Shankaran V, Dighe A, Stockert E, Aguet M, Old L et al. Demonstration of an interferon-g-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7556-61, 1998.
10. Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol* 160:5869-73, 1998.
11. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-6, 2001.
12. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 190:617-27, 1999.
13. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends in Immunol* 21:516-23, 2001.
14. Selinger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21:455-64, 2000.
15. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 167:2972-78, 2001.
16. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293-9, 2001.
17. Sogn JA. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 9:757-63, 1998.
18. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1178-83, 1998.
19. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342:1946-52, 2000.
20. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 18:7908-16, 1999.

Nome: Leonardo Augusto Karam Teixeira

Nascimento: 20/09/1975

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica:

Graduação em Ciências Biológicas (Modalidade Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Período: março de 1994 a agosto de 1997

Mestrado em Genética e Biologia Molecular - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: março de 1998 a março de 2000

Professor Substituto - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: março de 2000 a janeiro de 2001

Doutorado em Química Biológica - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Período: outubro de 2001 a fevereiro de 2006

Publicações:

Teixeira LAK, Fricke CH, Bonorino CB, Bogo MR, Nardi NB (2000). An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol*, 88: 159-165.

Nardi NB, Teixeira LK, Silva EFA (2002). Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7: 109-116.

Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA, Viola JPB (2002). NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J*, 16: 1940-1942.

Teixeira LK, Fonseca BPF, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, Bozza PT, Viola JPB (2005). IFN- γ production by CD8⁺ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol*, 175: 5931-5939.

Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK (2005). NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res*, 38: 335-344.

Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, Viola JPB (2005). The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 137-144.

Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF (2004). Imunologia tumoral. In: *Oncologia Molecular*. p. 105-112. Editores: CG Ferreira e JCC da Rocha. São Paulo, Editora Atheneu.

Outros:

Trabalhos apresentados em congressos nacionais: 16

Trabalhos apresentados em congressos internacionais: 3

Premiações em congressos nacionais/internacionais: 5

Conferências em eventos nacionais/internacionais: 7

Co-orientações de trabalhos de conclusão de curso de graduação: 2

Participação em bancas examinadoras de trabalhos de conclusão de curso de graduação: 4

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)