

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Área de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

INTERLEUCINA-7 REGULA NEGATIVAMENTE O DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS T E A
EXPRESSÃO GÊNICA DE TIMOS ADULTOS EM CULTURA (ATOC)

Dissertação de Mestrado

MARINA OLIVEIRA E PAULA

Ribeirão Preto
2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARINA OLIVEIRA E PAULA

INTERLEUCINA-7 REGULA NEGATIVAMENTE O DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS T E A
EXPRESSÃO GÊNICA DE TIMOS ADULTOS EM CULTURA (ATOC)

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em Ciências;
àrea de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. GERALDO ALEIXO DA SILVA PASSOS JUNIOR

Ribeirão Preto
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Paula, Marina Oliveira

Interleucina-7 Regula Negativamente o Desenvolvimento de Células T e a Expressão Gênica de Timos Adultos em Cultura (ATOC)
Ribeirão Preto, 2005.

91 pp. 28cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Área de Concentração em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo da Silva

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Trabalho realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular, Departamento de Genética, FMRP-USP com auxílio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (FAEPA)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP)

RESUMO.....	i
1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1) O PAPEL DO TIMO NA MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T.....	1
1.2) O PAPEL DA IL-7 NO DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS T.....	7
1.3) RECOMBINAÇÃO V(D)J EM TIMÓCITOS.....	12
1.3.1) IL-7 E A RECOMBINAÇÃO V(D)J EM TIMÓCITOS.....	15
1.4) A IMPORTÂNCIA DA ATOC NA PESQUISA SOBRE A MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS.....	17
1.5) A UTILIZAÇÃO DE CDNA <i>MICROARRAYS</i> NA PESQUISA EM IMUNOLOGIA.....	19
2) HIPÓTESES.....	22
3) OBJETIVOS.....	23
4) MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1) LINHAGEM ISOGÊNICA C57BL/6.....	24
4.2) CULTURA DE TIMO ADULTO (ATOC) E TRATAMENTO COM IL-7.....	24
4.3) EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE TIMÓCITOS	24
4.4) QUANTIFICAÇÃO E ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE RNA TOTAL...25	25
4.5) EXTRAÇÃO DE DNA DE TIMÓCITOS	26
4.6) ENSAIO DE RECOMBINAÇÃO V(D)J DE TCRVB8.1.....	26
4.7) <i>NORTHERN BLOTTING</i>	27
4.8) PREPARAÇÃO DE CDNA <i>MICROARRAYS</i> EM <i>NYLON</i>	28
4.8.1) BIBLIOTECA DE CDNAS MURINOS.....	28
4.8.2) AMPLIFICAÇÃO DE CDNA PARA A CONFECÇÃO DE <i>MICROARRAYS</i>	28
4.8.3) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	30
4.8.4) CONFECÇÃO DOS <i>MICROARRAYS</i> EM MEMBRANA DE <i>NYLON</i> (HYBOND N ⁺ ®).....	30
4.8.5) AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE PONTOS POR HIBRIDAÇÃO COM OLIGO-VETOR.....	31
4.9) PREPARAÇÃO DE SONDAS COMPLEXAS DE CDNA A PARTIR DE RNA TOTAL.....	33

4.10) HIBRIDAÇÃO DE <i>MICROARRAYS</i> COM SONDAS COMPLEXAS.....	34
4.11) DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SINAIS DE HIBRIDAÇÃO.....	35
4.12) SUBTRAÇÃO DO <i>BACKGROUND</i> E FILTRAGEM DE DADOS QUESTIONÁVEIS.....	35
4.13) NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.....	36
4.14) ORGANIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS DADOS.....	37
4.15) ANÁLISE ESTATÍSTICA E AGRUPAMENTO DOS DADOS.....	37
4.16) NOMENCLATURA DOS GENES.....	39
5) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
5.1) PREPARAÇÃO DOS MICROARRAYS.....	40
5.2) CULTURA E EXTRAÇÃO DE DNA E RNA.....	41
6) RESULTADOS.....	42
6.1) AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA.....	42
6.2) ENSAIO DE RECOMBINAÇÃO V(D)J DE TRVB8.1.....	42
6.3) SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES DA BIBLIOTECA IMAGE MURINA.....	44
6.4) IMAGENS DAS HIBRIDAÇÕES COM OLIGO-VETOR.....	45
6.4) IMAGENS DAS HIBRIDAÇÕES COM SONDA COMPLEXA.....	45
6.5) ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO.....	48
6.6) ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES	48
7) DISCUSSÃO.....	56
8) CONCLUSÕES.....	67
9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO 1.....	79
ANEXO 2.....	91

FIGURA 1: Organização Celular Tímica.....	2
FIGURA 2: Recombinação e expressão do gene das cadeias β e α do TCR...14	14
FIGURA 3: Seqüências de reconhecimento da recombinação V(D)J.....14	14
FIGURA 4: Padrão de pontos das membranas de <i>microarray</i>32	32
FIGURA 5: Gráfico de dispersão mostrado pelo Programa SAM.....40	40
FIGURA 6: Integridade das amostras de RNA.....44	44
FIGURA 7: <i>Southern Blotting</i> mostrando recombinação V(D)J.....45	45
FIGURA 8: Frequência relativa de recombinação V(D)J de TRVB8.1 em culturas ATOC tratadas com IL-7.....45	45
FIGURA 9: Eficiência da amplificação dos clones de cDNA.....46	46
FIGURA 10: Avaliação da amplificação dos clones de cDNA.....47	47
FIGURA 11: Hibridação do <i>microarray</i> com oligo-vetor.....48	48
FIGURA 12: Hibridação do <i>microarray</i> com sonda complexa.....49	49
FIGURA 13: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não tratada e tratada com 0,1ng de IL-7/mL.....51	51
FIGURA 14: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não tratada e tratada com 1,0ng de IL-7/mL.....52	52
FIGURA 15: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não tratada e tratada com 10ng de IL-7/mL.....53	53
FIGURA 16: Análise da expressão do mRNA do gene Stat1 por <i>Northern Blotting</i>57	57
FIGURA 17: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC tratadas com diferentes concentrações de IL-7.....60	60
FIGURA 18: Diagrama de Venn: genes escolhidos para compor a discussão desse trabalho.....61	61

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Primers usados na amplificação por PCR de VB8.1 e DJB2.1.....	27
TABELA 2: Primers usados na amplificação por PCR de clones provenientes da biblioteca IMAGE.....	29
TABELA 3: Primers usados na amplificação por PCR de clones provenientes do consórcio RZPD.....	30
TABELA 4: Genes diferencialmente expressos (44) de acordo com o programa SAM em ATOC tratada com 0,1ng/mL de IL-7.	54
TABELA 5: Genes diferencialmente expressos (43) de acordo com o programa SAM em ATOC tratada com 10ng/mL de IL-7.	55
TABELA 6: Genes diferencialmente expressos (50) de acordo com o programa SAM em ATOC tratada com 1,0ng/mL de IL-7.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

³³P: Isótopo Radioativo Fósforo 33
ATOC: *Adult Thymus Organ Culture*
CD: Células Dendríticas
cDNA: DNA complementar
cTEC: Célula Epitelial do Córtex Tímico
DLU: *Digital Ligth Units*
DN: Timócito Duplo Negativo (Estágios 1 a 3)
DP: Timócito Duplo Negativo
FDR: *False Discovery Rate*
FTOC: *Fetal Thymus Organ Culture*
IL-7: Interleucina-7
IL-7R: Receptor de Interleucina-7
IL-7R α : Cadeia Alfa do Receptor de Interleucina-7
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA: RNA mensageiro
mTEC: Célula Epitelial da Medula Tímica
pb: Pares de Bases
qsp: Quantidade Suficiente Para
RAG: Gene Ativador de Recombinação
RSS: Seqüência Sinal de Recombinação
SAM: Significance Analysis of Microarrays
SCF: Stem Cell Factor
SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*
SP: Timócitos com Positividae Simples
TCR: receptor de célula T
TEC: Célula Epitelial Tímica
TR: Conjunto gênico que codifica o Receptor de Célula T
TSA: Antígenos Tecido-Específicos

A maturação dos linfócitos T a partir de progenitores comprometidos passa por estágios definidos e é principalmente associada à recombinação samática e expressão de genes de receptores de células T (TR), proliferação celular, seleção induzida por antígeno e aquisição de fenótipos maduros e de capacidades funcionais. A estrutura tridimensional do timo, bem como a ação das citocinas, é de fundamental importância durante esse processo de maturação dos timócitos. Ao contrário das culturas de células dispersas, a técnica de ATOC (*Adult Thymus Organ Culture*) preserva toda a arquitetura do timo e representa fielmente o microambiente onde ocorre a diferenciação de células T. Por esse motivo, esta técnica é tida como o modelo experimental ideal para o estudo da ação das citocinas nas células tímicas. A interleucina 7 tem papel fundamental durante todo o processo de maturação dos timócitos no timo, como garantir sua sobrevivência e estimular a recombinação V(D)J dos TR em timos de feto quando se inicia a maturação de linfócitos T. No timo maduro, a IL-7 tem efeito contrário, inibindo o desenvolvimento de células T. O objetivo principal deste projeto foi avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com IL-7 em células de timo de camundongos adultos (*adult thymus organ culture*, ATOC). A quantificação da recombinação V(D)J entre os segmentos TRVB8.1 e DB2.1 foi utilizada para avaliarmos se a IL-7 exógena poderia modular a maturação dos linfócitos T em ATOC. Nossos resultados mostraram que o timo adulto em cultura abriga linfócitos T com o segmento recombinado, mas a IL-7 exógena não incrementou de maneira significativa a frequência da recombinação V(D)J e, portanto, não estimulou a maturação destas células no timo adulto. Na realidade, existem evidências de que a IL-7 exerce efeito regulatório negativo no desenvolvimento progressivo de células T maduras. Com o intuito de avaliarmos então o efeito desta citocina sobre a expressão gênica de ATOC, utilizamos a tecnologia de cDNA microarrays, incluindo programas de bioinformática, como SAM (*Significance Analysis of microarrays*) e Cluster & TreeView, para análise dos dados. Desta vez, foi possível mostrar que a IL-7 exógena em ATOC exerceu efeito regulatório negativo sobre a expressão de vários genes, ou seja, inibiu a expressão gênica. Dentre estes genes, salientamos Lck, Mapkapk2, Myb, Stat-1, Ubex1, Ube2r2, Ccl11, CD97, G3bp, Hspa1a, dentre outros, os quais estão envolvidos em processos celulares essenciais como metabolismo, resposta a estímulos, processos fisiológicos celulares, comunicação

celular, ciclo celular e apoptose. Nossos resultados mostraram que o sistema modelo de ATOC, ensaio de recombinação V(D)J de TR e análise da expressão gênica por microarrays foi adequado para entendermos melhor as bases genético-moleculares do efeito regulatório negativo de IL-7 no timo adulto.

The maturation of T lymphocytes from progenitor cells has well defined stages and is mainly associated to recombination and somatic expression of TCR genes, cellular proliferation and selection induced by antigens. The three-dimensional structure of thymus, besides cytokines action, is quite important during the process of thymocyte maturation. Unlike suspension cultures, ATOC (Adult Thymus Organ Culture) preserves the thymus architecture and faithfully represents the microenvironment where differentiation of thymocytes takes place. Therefore, the ATOC technique is considered the ideal model system for the study of the effects of cytokines on thymocytes. Interleukin-7, an important cytokine produced by epithelial cortical cells in thymus, plays an essential role during thymocyte maturation process, as to assure the survival and to stimulate V(D)J recombination of TR genes. In adult thymus, IL-7 play a opposite effect, inhibiting the development of T cells. The main goal of this project was to evaluate the in vitro effect of IL-7 in ATOC. The quantification of V(D)J recombination between TRVB8.1 and TRDB2.1 segments in ATOC was used to evaluate if exogenous IL-7 could modulate T lymphocyte maturation in this culture system. Our results showed the presence of T cells with recombined segment in ATOC, but exogenous IL-7 didn't augment significantly the frequency of V(D)J recombination and, therefore, didn't stimulate the maturation of T cells in adult thymus. There is evidence that IL-7 plays a negative regulatory effect in the progressive development of mature T cells. To evaluate the effect of this cytokine on ATOC gene expression, we used the cDNA microarray technology, including bioinformatics softwares, as SAM (*Significance Analysis of microarrays*) and Cluster & TreeView, to analyse the data. It was possible to show that exogenous IL-7 in ATOC play a negative regulatory effect in the expression of various genes, inhibiting the gene expression. Among these repressed genes, we emphasize Lck, Mapkapk2, Myb, Stat-1, Ubex1, Ube2r2, Ccl11, CD97, G3bp, Hspa1a, that are involved in essential cellular process as metabolism, response to stimulus, cellular physiologic processes, cellular communication, cell cycle and apoptosis. Our results showed that this model system including T cell receptor V(D)J recombination assay and analysis of gene expression in ATOC was adequate to study the molecular bases of the negative regulatory effect of IL-7 in the mature thymus.

1.1) O PAPEL DO TIMO NA MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T (Baseado em JANEWAY et al., 2002)

O timo tem um papel central no sistema imune, já que é responsável pela crucial diferenciação de linfócitos T e pela seleção de repertório destas células. Esses processos são mediados pelo estroma tímico, que apresenta uma complexa composição celular (ANDERSON and JENKINSON, 2001). Nesse microambiente especializado, as células T em desenvolvimento, então denominadas timócitos, iniciam um processo de diferenciação caracterizado por mudanças fenotípicas, funcionais, no status de proliferação e por recombinações genéticas, visando à produção de um único receptor de antígeno (TCR – Receptor de Célula T) em cada célula, o que define os diferentes clones.

O timo, que se situa na porção mediana do corpo, acima do coração, é um órgão bilobado composto de vários lóbulos, cada um dos quais contém discretas regiões corticais (mais externas) e medulares (centrais). Essas subregiões constituem microambientes intratímicos discretos, cada um especializado em mediar um aspecto particular do desenvolvimento dos timócitos. Essa distribuição reflete eventos diferenciais do desenvolvimento que ocorre nesses dois compartimentos.

Durante o desenvolvimento embrionário, a formação do esboço tímico atrai células de origem hematopoiética, que o colonizam. Uma vez formado e seguido da invaginação de células mesenquimais, o epitélio tímico pode ser dividido nos compartimentos subcapsular, cortical e medular com base na localização anatômica no órgão, nas propriedades morfológicas, no padrão fenotípico e na expressão de queratina nas células constituintes (ANDERSON and JENKINSON, 2001) (Figura 1). As regiões cortical e medular tímicas contêm tipos celulares característicos, diferenciados estrutural e fenotipicamente, denominados células epiteliais tímicas (TEC). Estudos demonstram que as TEC corticais (cTEC) e as TEC medulares (mTEC) compartilham um fenótipo comum nos estágios iniciais de desenvolvimento, o que sugere fortemente a existência de um progenitor comum para tais tipos celulares (FARR, DOOLEY and ERICKSON, 2002).

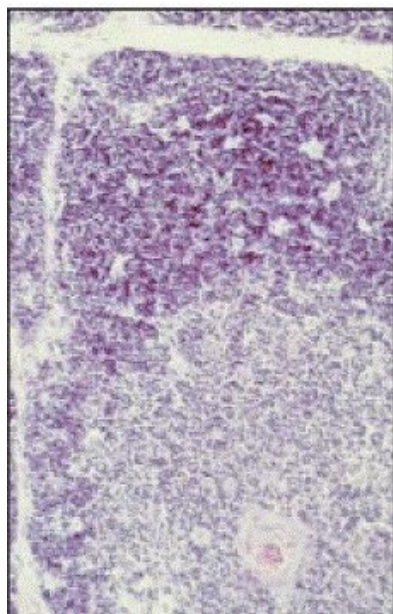
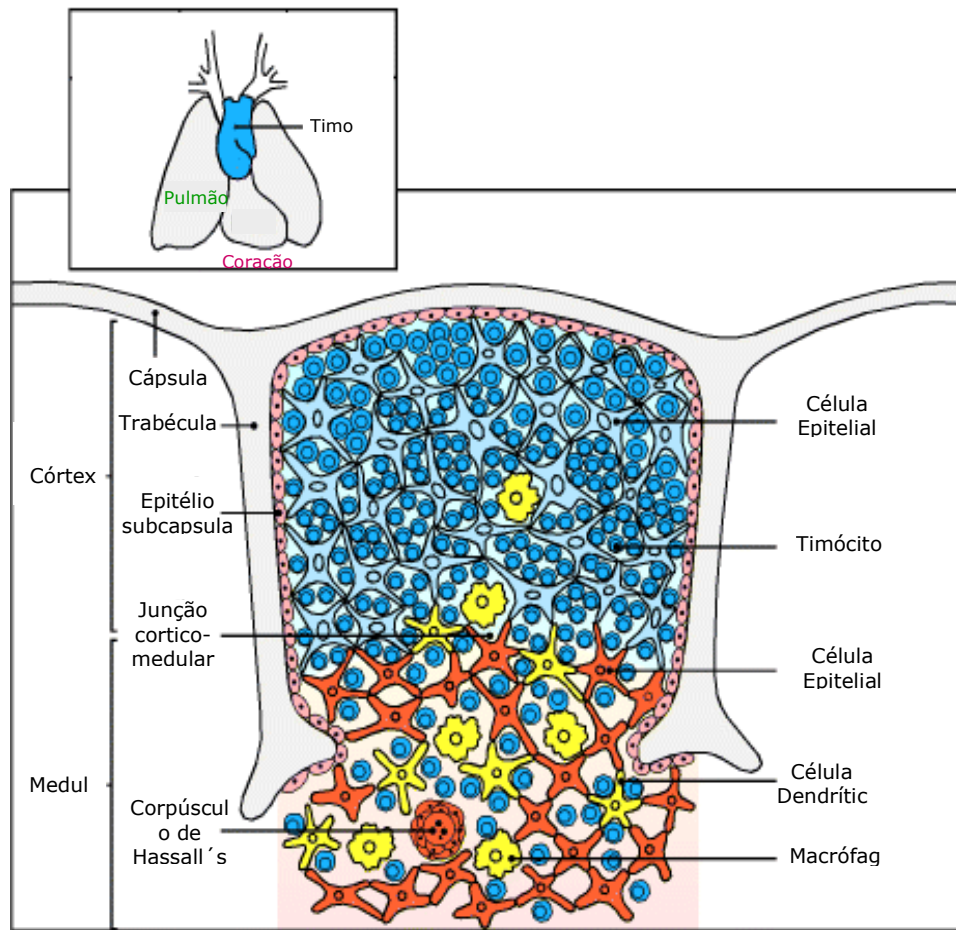


Figura 1: Organização celular tímica. Acima, esquema gráfico dos tipos celulares e de suas distribuições nas diferentes subregiões do timo. A fotografia ao lado mostra um corte histológico de timo humano corado com hematoxilina e eosina. O córtex é a região mais escura e a medula a região mais clara. (Retirado de JANEWAY et al., 2002).

Em adição a esses tipos celulares, um importante tecido do estroma tímico que influencia no desenvolvimento do timócito é o mesênquima. As células mesenquimais também apresentam grande diversidade e formam a cápsula e os septos tímicos. Além disso, essas células podem estar localizadas no córtex, onde interagem com timócitos imaturos e liberam fatores de crescimento solúveis essenciais para um desenvolvimento epitelial tímico normal (ANDERSON and JENKINSON, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que a geração de um ambiente cortical tímico capaz de promover o desenvolvimento adequado de timócitos envolve a interação e *feedback* com timócitos imaturos, de forma que estas células influenciam diretamente a formação do microambiente requerido para seu próprio desenvolvimento (VAN EWIJK et al., 2000). Esse processo é denominado instrução cruzada do timo (*thymic crosstalk*) e, embora seja bem aceito entre os estudiosos, pouco se sabe sobre como os timócitos em desenvolvimento regulam a diferenciação do epitélio cortical tímico (ANDERSON and JENKINSON, 2001).

A primeira demonstração de que a organização medular tímica pode ser regulada pela subpopulação de timócitos aí existentes vem de estudos nos quais tanto timócitos transgênicos para os genes que codificam o receptor de células T (TR) (SHORES, VAN EWIJK and SINGER, 1991) quanto células T periféricas maduras (SURH, ERNST and SPRENT, 1992) foram introduzidas em camundongos com *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID). Nas duas situações, as células epiteliais medulares tornaram-se organizadas em discretas regiões, o que não ocorre em camundongos SCID que não receberam tais células. A natureza da instrução cruzada na medula tímica é desconhecida, mas experimentos demonstraram que a introdução de timócitos maduros não envolve a expansão de epitélio medular pré-existente (PENIT et al, 1996).

O córtex tímico representa um importante microambiente no qual precursores imaturos de células T são envolvidos por uma complexa rede reticular tridimensional de cTEC com longos processos de ramificações, o que favorece o contato com a maioria dos timócitos aí presentes, apresentando moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classes I e II. Tais células parecem ser altamente especializadas na habilidade de promover uma série de eventos-chave no desenvolvimento de timócitos. Um exemplo é o processo de seleção positiva, que seleciona timócitos cujos receptores se ligam à molécula de MHC-próprio com baixa avidéz. Essa seleção garante que os linfócitos T da periferia só reconheçam antígenos apresentados por moléculas de MHC próprias.

Apesar do papel central das cTEC na seleção positiva ser devido à apresentação de complexos peptídeo/MHC aos TCR $\alpha\beta$ de timócitos, muitos estudos indicam que a habilidade dessas células em promover essa seleção não é devido à provisão de um repertório especializado de peptídeos ligados a MHC (HOGQUIST, 2001), nem à capacidade de manter a viabilidade de timócitos pela produção de sinais promotores de sobrevivência (ANDERSON et al., 1997). É provável, portanto, que as cTEC expressem uma combinação única de moléculas de superfície que forneçam sinais co-estimulatórios ou acessórios durante a seleção positiva. É claro, porém, que essas moléculas acessórias não são as mesmas requeridas para a ativação de linfócitos T maduros, já que, sob circunstâncias normais, as cTEC não são capazes de promover co-estimulação em linfócitos T periféricos (JENKINSON et al., 1994). Além disso, experimentos demonstraram que as cTEC não são eficientes em promover seleção negativa (MCGARGILL, DERBINSKI and HOGQUIST, 2000).

Em algum ponto durante seu desenvolvimento no córtex tímico e antes do seu aparecimento na medula tímica, os timócitos em desenvolvimento sofrem seleção negativa. Nesta seleção, os timócitos que se ligam com alta afinidade a antígenos próprios apresentados por moléculas de MHC próprias são mortos ou deletados. Os mediadores tímicos mais eficientes para a realização da seleção negativa são as células dendríticas (CDs) derivadas da medula óssea e as mTEC, que residem na junção cortico-medular do órgão (BLACKBURN and MANLEY, 2004). Estudos recentes demonstraram que antígenos tecido-específicos (TSAs) são expressos no timo e participam da seleção de repertório de células T (KYEWSKI and DERBINSKI, 2004). A expressão de TSAs no timo, conhecida como expressão gênica promíscua, é uma propriedade fisiológica das TEC, em particular das mTEC (GOTTER et al., 2004; DERBINSKI et al., 2001). Através desse mecanismo, essas células expressam antígenos próprios da maioria, se não de todos, os órgãos parenquimais. Esses dados sugerem um papel central do timo na tolerância a antígenos presentes na periferia (KLEIN et al., 2000).

Além do possível papel na indução de tolerância no timo, é sabido que as mTEC estão envolvidas na regulação dos eventos de diferenciação pós-seleção de timócitos positivos simples (SP): CD4+CD8- e CD4-CD8+. Tais timócitos residem na área medular por mais de duas semanas, período no qual eles sofrem mudanças na expressão de uma variedade de moléculas de superfície, antes que sejam exportados para a periferia (ANDERSON and JENKINSON, 2001). Além disso, acredita-se que esse compartimento tímico possa estar envolvido na regulação da expansão dos timócitos SP recém-selecionados (HARE et al., 1998). Este processo é

dependente da cadeia α do receptor interleucina-7 (IL-7R α) (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 2000) e independente de interações TCR-MHC (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 1999a). Esta fase de proliferação antígeno-independente deve ocorrer para aumentar o número de timócitos SP e, assim, garantir o estabelecimento de um *pool* adequado de células T periféricas.

Em ambas as seleções mencionadas sofridas pelos timócitos, ocorrem eliminações daquelas células portadoras de receptores com especificidade inadequada. Em camundongos adultos jovens, o timo contém cerca de 1 a 2 x 10⁸ timócitos. No entanto, somente 1 x 10⁶ dessas células deixarão o timo a cada dia como linfócitos T maduros; as demais morrem por apoptose. A aparente extravagância do desperdício dessa maciça morte celular é uma parte crucial no desenvolvimento das células T, refletindo a intensa seleção que cada novo linfócito T sofre quanto à restrição ao MHC próprio e à autotolerância.

É também no timo que ocorre a diferenciação das células T em subpopulações que, pela presença de marcadores de superfície celular, definem funções específicas na resposta imune. A seleção positiva, mencionada acima, fixa a restrição à classe I ou classe II das subpopulações de células T, assegurando que as células T CD8+ sejam específicas para os peptídeos exibidos pelas moléculas de MHC de classe I e as células T CD4+ para os peptídeos associados à classe II do MHC (ABBAS et al, 2000).

Vários pesquisadores demonstraram que uma grande proporção de progenitores intratímicos tem potencial de gerar células de linhagem "não-T" (MOORE and ZLOTNIK, 1995). Para esses progenitores multipotentes, o comprometimento com a linhagem de células T só ocorre como consequência da exposição ao microambiente tímico. Mesmo após a exposição a esse microambiente, entretanto, várias possibilidades ainda são possíveis, já que o timo produz diferentes linhagens de células T, como células T CD4+ $\alpha\beta$, CD8+ $\alpha\beta$, $\gamma\delta$, CD8+ $\gamma\delta$, células NKT e células T regulatórias. Dessa forma, o ambiente tímico deve ser capaz não só de comprometer os progenitores com a linhagem T e expandi-los, como também de induzir nichos microambientais distintos o suficiente para possibilitar o desenvolvimento dessa grande variedade de linhagens. O sucesso da linhagem de células T depende, portanto, do movimento ativo dos progenitores, primeiro do sangue até o timo e, então, dentro dos diferentes nichos tímicos até a sua exportação de volta ao sangue (PETRIE, 2003).

Em resumo, novos progenitores são periodicamente recrutados do sangue e entram no timo através das vênulas capilares na junção cortico-medular. Após um

período nessa região, os timócitos duplo-negativos (DN) CD4-CD8-, no estágio 1 (CD25-CD44+) (DN1) movem-se para o interior do córtex, e se diferenciam progressivamente em DN2 (CD25+CD44+) e DN3 (CD25+CD44^{low}) antes de se acumularem na região subcapsular. A transição para o estágio duplo-positivo (DP) CD4+CD8+ corresponde a uma reversão na polaridade da migração, que passa a ocorrer no córtex em direção à medula. Porém, somente as células que sobreviveram à seleção positiva são permitidas a acessar a medula, onde a maturação final ocorre. Finalmente, células T maduras SP CD4+CD8- e CD4-CD8+ são induzidas a deixar o timo e integrar o *pool* de células T da periferia (PETRIE, 2003).

Essa migração celular polarizada para dentro, dentro e para fora do timo é dependente da presença de receptores para moléculas de adesão e quimiocinas nas células progenitoras e nos subsequentes estágios de desenvolvimento dos timócitos. Não é claro, porém, quais são os receptores precisamente envolvidos nesses processos. Como o mecanismo envolve movimento direcional, acredita-se que padrões regionais diferenciados de expressão de quimiocinas e/ou ligantes para integrinas estejam fortemente envolvidos; bem como diferentes estágios de desenvolvimento de timócitos expressem receptores distintos para tais moléculas. As únicas exceções são a integrina α_6 e a molécula CD44, que são reconhecidamente responsáveis pela interação entre células pró-T circulantes com o endotélio vascular e pelo *homing* para o timo, respectivamente (PETRIE, 2003). Além disso, experimentos realizados por PROCKOP e colaboradores (2002) mostraram que as células do estroma cortical que expressam a molécula VCAM-1 têm um papel crucial no processo de migração.

Após todo esse processo, os linfócitos T maduros estão prontos para reconhecer antígenos e para circular pelo corpo, exercendo um papel imprescindível no combate às infecções e às neoplasias.

É clara, portanto, a importância de toda estrutura tridimensional tímica para maturação e, conseqüentemente, para o funcionamento normal dos linfócitos T. Um exemplo bem claro para reforçar essa importância são os camundongos *nude*, cujo epitélio tímico falha em se diferenciar e, conseqüentemente, os animais afetados produzem quantidades baixíssimas de linfócitos T.

Interações complexas e dinâmicas acontecem entre os linfócitos em desenvolvimento e o ambiente em que eles se localizam para levar à completa maturação de linfócitos T. Tais interações ocorrem principalmente de duas formas: por sinais dependentes de contato celular e por sinais transduzidos por fatores

solúveis. A primeira forma é decorrente, principalmente, da interação do TCR com moléculas de MHC associadas a peptídeos, contato que possibilita os processos de seleção e o envio de sinais de sobrevivência. Os fatores solúveis, em geral, são secretados pelas células estromais tímicas e estimulam a proliferação de células T imaturas, podendo também influenciar em diversos aspectos do processo de amadurecimento de acordo com o estágio em que as células T se encontram quando entram em contato com tais moléculas, denominadas citocinas (ABBAS et al, 2000).

Ao contrário do que ocorre na periferia, onde as citocinas podem estimular respostas inflamatórias e/ou contra patógenos, no timo a ação dessas moléculas é limitada à indução de processos constitutivos, como migração, proliferação e desenvolvimento de linfócitos T (YARILIN and BELYAKOV, 2004). Muitas citocinas têm efeitos em timócitos, entretanto, a análise de várias delas revelou que a interleucina-7 (IL-7) se situa no ápice da hierarquia das citocinas em termos de significância funcional durante o desenvolvimento de linfócitos T (KANG and DER, 2004).

1.2) O PAPEL DA IL-7 NO DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS T

A IL-7 foi descoberta devido à sua capacidade de induzir proliferação de linfócitos pré-B murinos (NAMEN et al., 1988). Atualmente, é sabido que a IL-7 tem papel crítico no desenvolvimento de linfócitos T e B de camundongos e de linfócitos T (mas não de linfócitos B) humanos (HOFMEISTER et al., 1999). Animais *knockout* de IL-7 mostram desenvolvimento linfóide altamente reprimido (VON FREEDEN-JEFFRY et al., 1998), já que esta citocina está envolvida na maturação, homeostase e proliferação de linfócitos.

O timo é considerado o sítio anatômico com maior produção de IL-7 (WILES, RUIZ and IMHOF, 1992). As células tímicas produtoras de IL-7 expressam MHC de classe II e, provavelmente, correspondem às cTEC (OOSTERWEGEL et al., 1997). Esta mesma subpopulação produz a citocina *Stem Cell Factor* (SCF), que possivelmente tem uma ação sinérgica com IL-7 na indução da proliferação de timócitos (HOFMEISTER et al., 1999) Além disso, IL-7 constitui um fator de crescimento de linfócitos T com atuação tanto em linfócitos T maduros periféricos (desde que haja um segundo sinal), quanto em timócitos fetais (THOMSON, 1998).

Estudos demonstraram, com a utilização de *Fetal Thymus Organ Culture* (FTOC), a importância de IL-7 para o desenvolvimento de células dendríticas

tímicas. A adição desta citocina na cultura resultou em um drástico aumento no número de células expressando marcadores característicos de células dendríticas e exibindo características morfológicas e ultraestruturais típicas dessas células, bem como apresentando a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T autoreativos (VARAS et al., 1998). Na ontogenia do timo, a perda da função da IL-7 resulta em um decréscimo de 5 a 10 vezes na celularidade tímica fetal. Em adultos, o efeito é mais severo e somente 1 a 2% de timócitos normais são observados (KANG and DER, 2004). Células tímicas fetais irradiadas em FTOC mostraram um aumento na expressão do RNA mensageiro (mRNA) de IL-7 24h após a radiação (CARDOSO et al., 2005; TOKI et al., 2003).

A regulação do gene da IL-7 não é bem entendida. Não existem seqüências típicas de indução como TATA ou CAAT e a região promotora que regula a expressão desse gene no timo e na medula óssea não tem sido estudada (HOFMEISTER et al., 1999).

A IL-7 foi incluída na família das hematopoiéticas. Já foram descritas 4 isoformas derivadas de *splicing* alternativo (KROEMER, 1998). A isoforma predominante tem 25kDa e contém 4 alfa-hélices ligadas internamente por pontes dissulfeto (HOFMEISTER et al., 1999). Esta citocina tem capacidade de se associar à matriz extracelular no timo, especialmente com fibroblastos (BANWELL, 2000).

O complexo receptor de IL-7 (IL-7R) consiste de 2 componentes: a cadeia α do receptor IL-7 (IL-7R α), que é específica pra essa citocina, e a cadeia γ , que é compartilhada por receptores das citocinas IL-2, IL-4, IL-9 e IL-15 (HOFMEISTER et al., 1999). Parece que a porção semi-conservada na região intracelular, próxima à membrana, da cadeia α exerce um papel crucial na associação com Jak (RUSSEL et al., 1993).

O IL-7R pode ser encontrado em células pré-B, timócitos e outras linhagens de células T, bem como em macrófagos derivados da medula óssea (THOMSON, 1998). Após a ativação da célula, o IL-7R é negativamente regulado (KANG and DER, 2004). No ambiente tímico, a perda da sinalização proveniente do IL-7R causa redução significativa na celularidade tímica e bloqueio no desenvolvimento de linfócitos T ainda nos primeiros estágios (GRABSTEIN et al., 1993).

Enquanto a expressão da cadeia γ do IL-7R é relativamente ubíqua, a cadeia α desse receptor tem sua expressão altamente regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento em que o timócito se encontra (KANG and DER, 2004). No estágio DN, a expressão da cadeia α é requerida para transduzir sinais de sobrevivência e possibilitar a expansão das células. A perda desse receptor no

estágio DP é de grande importância. Se células em tal estágio fossem responsivas à IL-7 durante o processo de seleção positiva, aquelas que expressam TCR inapropriado seriam protegidas contra a deleção. No estágio seguinte, SP, a cadeia α do IL-7R volta a ser expressa na célula (AKASHI, KONDO and WEISSMAN, 1998).

A sinalização via pré-TCR em timócitos é o primeiro ponto crítico da fase precoce de desenvolvimento dos linfócitos T e é essencial para a progressão e diferenciação dessas células. Entretanto, tal progressão e diferenciação são severamente comprometidas na ausência do IL-7R (LAOUAR, CRISPE and FLAVELL, 2004).

A IL-7 exerce um papel único no desenvolvimento do sistema imune, especialmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos linfócitos T. Entretanto, o requerimento de citocinas durante o desenvolvimento de linfócitos no feto e no adulto é diferente. Isto pode ser parcialmente explicado pelas distinções no microambiente tímico nestas duas idades, especialmente no que diz respeito à concentração de fatores provenientes do estroma e dos timócitos, que influenciam o desenvolvimento e a proliferação destes últimos (HOFMEISTER et al., 1999). Um estudo recente demonstrou que ocorrem mudanças marcantes na localização e na regulação de TEC produtoras de IL-7 durante o desenvolvimento (ZAMISCH et al., 2005).

Sabe-se que os linfócitos requerem estimulação extrínseca para induzir a expressão de receptores de superfície, tais como glut-1, que promovem o *uptake* de nutrientes e um aumento na atividade metabólica. A sinalização via TCR e via IL-7R estão entre os sinais que induzem glut-1 nessas células (RATHMELL et al., 2001; RATHMELL et al., 2000). Acredita-se, portanto, que IL-7 seja necessária para o desenvolvimento de timócitos por, dentre outras funções, fornecer energia metabólica para iniciar e alterar programas gênicos durante a diferenciação destas células em linfócitos maduros (YU et al., 2003).

Os mecanismos intracelulares que estão envolvidos na sinalização dos vários efeitos da IL-7 não estão claramente estabelecidos (HOFMEISTER et al., 1999). A ligação de IL-7 com seu receptor resulta na ativação das kinases JAK3 e JAK1, as quais estão associadas com as cadeias γ e α do IL-7R, respectivamente. As JAKs ativadas transfosforilam o receptor, possibilitando o recrutamento de inúmeros transdutores de sinais, como PI3K, e do transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT5 para os resíduos fosforilados na cauda da cadeia α do receptor. PyK2 está associado com JAK1 e se torna fosforilado após ativação via IL-7R. A via RAS se torna, então, acessível para interação com Grb-2 e com membros das famílias Rho

GTPase. RAS ativa a via MAPK, incluindo Raf/MEK, que modula as atividades de ERK1/ERK2. STATs fosforilados e ERKs ativados se translocam para o núcleo onde, em associação com vários modificadores de cromatina e ativadores de transcrição, controlam a expressão de vários genes críticos para a diferenciação e sobrevivência celular (KANG and DER, 2004).

A citocina IL-7 mantém a viabilidade celular ao reprimir fatores "indutores de morte" e/ou ao ativar fatores "promotores de sobrevivência", respectivamente, proteínas pró- e anti-apoptóticas. A família Bcl-2, composta por importantes reguladores de morte celular programada, é uma candidata atrativa de agente através do qual a IL-7 leva à sobrevivência celular (HOFMEISTER et al., 1999).

A proteína Bcl-2, um poderoso inibidor de apoptose que mantém a viabilidade celular mesmo com várias sinalizações indutoras de morte, é expressa em altos níveis em timócitos DN e em timócitos SP; mas seus níveis são baixos no estágio intermediário, timócitos DP (YANG et al., 1997). Esta expressão bifásica de Bcl-2 coincide com a expressão da cadeia α do IL-7R, sugerindo que Bcl-2 pode mediar os efeitos da IL-7 na maturação e sobrevivência de timócitos (HOFMEISTER et al., 1999). Entretanto, bcl-2 não é a única proteína anti-apoptótica induzida por IL-7. Isto foi demonstrado em timócitos deficientes em bcl-2 que mantiveram a sobrevivência induzida pela citocina (MATSUZAK et al., 1997).

Em relação a proteínas pró-apoptóticas, bax é provavelmente o alvo da ação de IL-7. Camundongos deficientes de bax desenvolvem uma hiperplasia linfóide com o número de timócitos aumentados 2x em relação ao controle (KNUDSON et al., 1995). Além disso, a super-expressão tímica de bax leva a uma perda substancial de linfócitos T maduros (WILLIAMS et al., 1998). Bcl-2 parece interferir na liberação de citocromo c induzida por bax (ROSSE et al., 1998).

Estes dados sugerem que a sobrevivência induzida por IL-7 envolve o estabelecimento de um balanço em favor de proteínas anti-apoptóticas através da modulação das atividades das proteínas da família Bcl-2, bem como pela modificação de vias bioquímicas alternativas de morte celular (KANG and DER, 2004).

Evidências de que IL-7 representa uma importante linfopoiética e uma possível importância clínica vêm de estudos de investigação *in vivo*. A administração de IL-7 em camundongos normais leva a um aumento de 2 a 5 vezes no número de linfócitos periféricos e esplênicos sem uma alteração significativa na celularidade da medula óssea. Em camundongos que se tornaram linfopênicos, por

radiação ou administração de ciclofosfamida, a administração exógena de IL-7 acelera a recuperação celular (THOMSON, 1998).

DELUCA e CLARK (2002) mostraram que a IL-7 atua como modulador da maturação dos linfócitos T no timo, mas dependendo do estágio de desenvolvimento ontogenético deste órgão, esta citocina pode exercer efeito contrário. Usando a técnica de FTOC, os pesquisadores observaram que a IL-7 estimula a diferenciação de linfócitos T SP em timo fetal recém-formado (*early*). Entretanto, IL-7 regula negativamente o desenvolvimento de células T maduras. Sugeriram os autores que IL-7 não somente mantém o desenvolvimento das células T fetais imaturas, como também pode inibir o desenvolvimento de células T maduras.

Uma grande variedade de estudos mostrou uma outra função importante para a citocina IL-7: a atuação na recombinação de genes que codificam TCR (KANG and DER, 2004). Células-tronco da medula óssea de camundongos adultos apresentam completa junção dos segmentos VJ (Segmentos Variável e de Junção) da cadeia γ do TCR na presença de IL-7 recombinante (SOLOFF et al., 1997). Células do estroma tímico derivadas de animais com deleção no gene da IL-7 perdem a habilidade de induzir o rearranjo de TRB e TRG (OOSTERWEGEL et al., 1997).

1.3) RECOMBINAÇÃO V(D)J EM TIMÓCITOS (Baseado em ABBAS et al., 2002)

A única característica comum a todos os linfócitos T é a expressão do TCR, uma glicoproteína capaz de se ligar a antígenos associados a moléculas de MHC de forma específica. A molécula funcional de TCR é um heterodímero composto por duas cadeias polipeptídicas transmembrana, designadas α e β , covalentemente ligadas por pontes dissulfeto. Um tipo menos comum de TCR é composto por cadeias δ e γ e a função desta subpopulação não está completamente definida.

Cada cadeia α e β consiste de um domínio variável (V) N-terminal, um domínio constante (C), uma região transmembrana e uma curta região citoplasmática. As regiões variáveis do TCR possuem curtos segmentos de seqüências onde se concentra a variabilidade dos diferentes TCR, formando as regiões hipervariáveis ou de determinação de complementariedade (CDR). Três CDR da cadeia α se justapõem a 3 CDR da cadeia β para formar a parte do TCR que reconhece de maneira específica os complexos peptídeo-MHC.

As cadeias do TCR são codificadas por vários segmentos de genes que sofrem rearranjos somáticos durante a maturação de linfócitos T. Esse rearranjo é denominado recombinação V(D)J e consiste em um processo de recombinação sítio-específica da molécula de DNA. Esse rearranjo gera grande diversidade nas regiões variáveis do receptor de antígeno de linfócitos T, o que é crucial para que os organismos possam reconhecer e responder contra, virtualmente, todo e qualquer antígeno estranho.

Os segmentos gênicos que codificam as subunidades do TCR estão agrupados em 6 *loci* distintos. As terceiras regiões variáveis (CDR3) são compostas de seqüências codificadas pelos segmentos gênicos V, J (junção) e, no caso da cadeia β , D (diversidade). Os genes de TCR em precursores de células T apresentam configuração não funcional, caracterizada por distanciamento entre tais segmentos (V(D)J e C) no cromossomo. Durante a maturação de células T, os éxons que codificam os domínios variáveis são formados pela justaposição de 2 (V e J para TRA) ou 3 (V, D e J para TRB) segmentos gênicos (CANDEIAS et al., 1997). A região constante C é codificada em éxons separados e se une ao éxon da região variável durante o processamento do RNA (LEFRANC and LEFRANC, 2002).

A figura 2 ilustra os passos da recombinação que levam à expressão de um TCR na superfície celular. Resumidamente, o *locus* da cadeia β sofre recombinação antes do *locus* da cadeia α . O rearranjo D β com J β ocorre primeiro e envolve a junção do segmento gênico DB com um dos 6 segmentos gênicos J β . Em seguida, ocorre a junção de V β a DJ β . O transcrito primário do gene TRB contém seqüências não codificadoras entre os genes VDJ e C. Uma cauda de poli A é adicionada ao sítio consenso de poliadenilação localizado na extremidade 3' do RNA C β e a seqüência entre de RNA entre VDJ e C é cortada. Assim, forma-se o mRNA maduro, no qual os segmentos VDJ estão unidos a um dos 2 genes C. A expressão da cadeia β (pré-TCR) inibe outro rearranjo no *locus* TRB do outro cromossomo, presumivelmente pela supressão das enzimas que medeiam a recombinação e/ou limitando a acessibilidade dessas enzimas a outros alelos. Este processo é denominado exclusão alélica da cadeia β .

Os passos no rearranjo dos genes da cadeia α são similares. Como não há segmento D no *locus* α , o rearranjo consiste somente na junção dos segmentos V e J. O grande número de segmentos J α possibilita múltiplas opções de junção VJ α , aumentando, dessa forma, a possibilidade de produzir um TCR $\alpha\beta$ funcional.

Todo esse processo de recombinação é mediado por atividades coordenadas de várias enzimas, algumas das quais expressas exclusivamente em linfócitos

imaturas, como a *Recombination-Activating Gene-1* (RAG-1) e RAG-2, e outras que são expressas de forma ubíqua, como as enzimas de reparo de DNA. Este conjunto enzimático é chamado de recombinase V(D)J.

A recombinase V(D)J atua após o reconhecimento das seqüências sinais de recombinação (RSS – do inglês *Recombination Signal Sequences*), que consistem de um heptâmero palindrômico e um nonâmero conservados, separados por seqüências espaçadoras de 12 ou 23 pares de bases (pb) não conservadas. A RSS está localizada a 3' de cada segmento V, a 5' de cada segmento J e flanqueando ambos os lados do segmento D. O rearranjo só ocorre entre os segmentos gênicos que apresentam seqüências espaçadoras de comprimentos diferentes e RSS de orientação inversa (Figura 3).

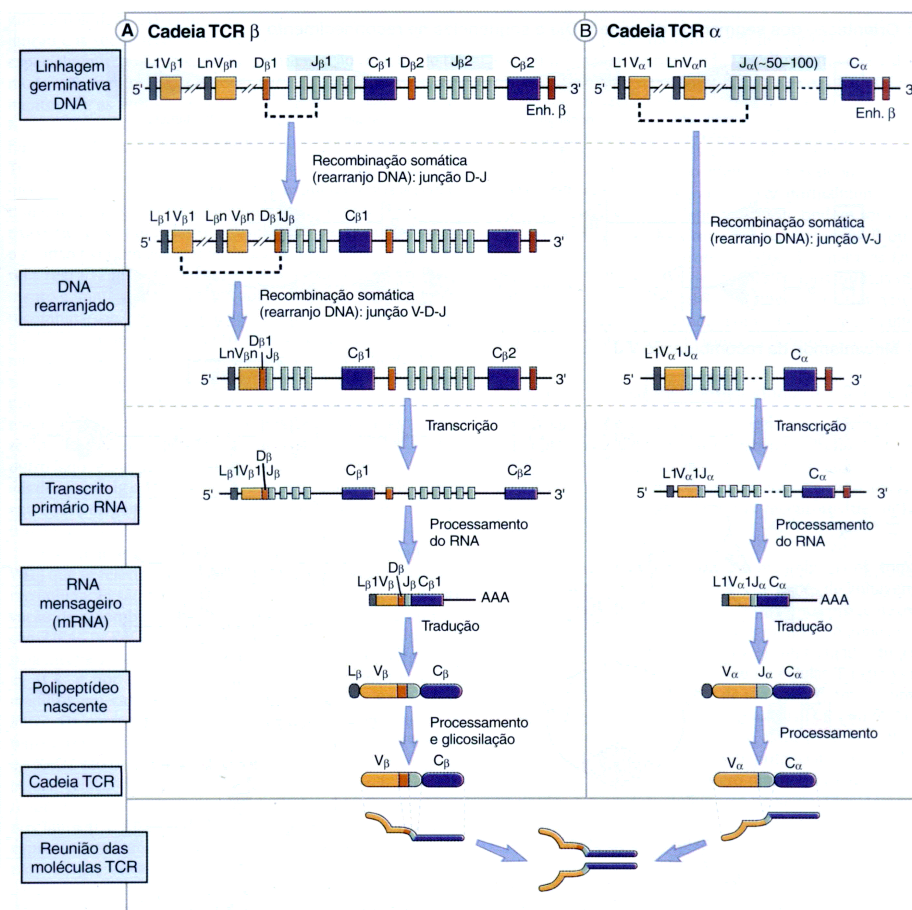


Figura 2: Recombinação e expressão do gene das cadeias β e α do TCR. É mostrada a seqüência de eventos de recombinação e expressão dos genes que codificam as cadeias TCR β (A) e TCR α (B).

Orientação dos segmentos do gene V(D)J e seqüências de reconhecimento

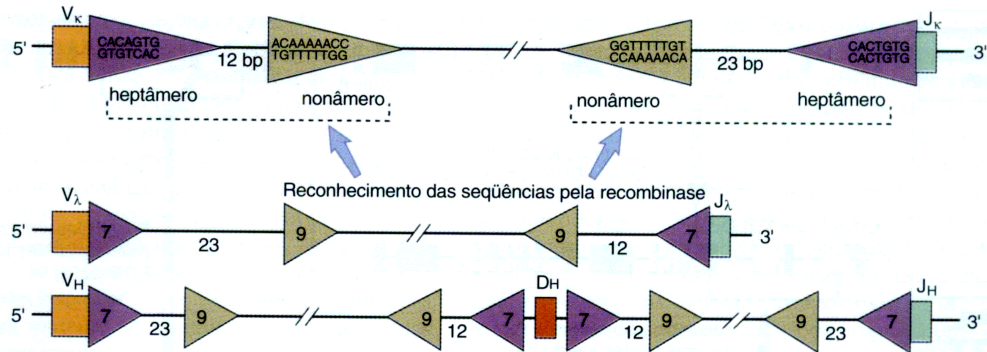


Figura 3: Seqüências de reconhecimento da recombinação V(D)J. A recombinase V(D)J é a enzima que medeia a recombinação do TCR. As seqüências conservadas no heptâmero (7bp) e do nonâmero (9bp), separadas por 12 ou 23 espaçadores, estão localizadas nas adjacências dos éxons V, (D) e J. A recombinase V(D)J reconhece essas regiões e une os éxons.

Este rearranjo requer a atividade de enzimas linfóide-específicas, RAG-1 e RAG-2, que realizam a clivagem do DNA (VAN GENT, RAMSDEN and GELLERT, 1996); de uma endonuclease e uma terminal deoxinucleotidil transferase, que modificam as extremidades terminais antes da ligação (CANDEIAS, MUEGGE and DURUM, 1996); e de pelo menos 4 proteínas que estão envolvidas no reparo do DNA, dentre elas a DNA-PK (LEWIS, 1994).

Em nosso grupo de pesquisa, MACEDO, JUNTA e PASSOS (1999) e JUNTA e PASSOS (1998) estudaram a recombinação V(D)J e a transcrição dos genes durante a ontogenia de BALB-c, C57BL/6 e CBA. Os resultados destes estudos mostraram que a emergência da recombinação do TRA e TRB é diferente entre as linhagens. MACEDO, JUNTA e PASSOS (1999) estudaram a recombinação V(D)J dos segmentos gênicos TRVB8.1 e JB2.1 durante o desenvolvimento fetal tímico de três linhagens distintas de camundongos: BALB-c, C57BL/6 e CBA *in vivo*. Os pesquisadores observaram diferenças na emergência da recombinação V(D)J dos *loci* nas diferentes linhagens. Os resultados destes trabalhos permitem sugerir um importante papel do *background* genético no controle temporal dos rearranjos gênicos. Dessa forma, fica evidente a importância de um estudo mais amplo da expressão gênica para o maior entendimento de todo esse importante processo.

1.3.1) IL-7 E A RECOMBINAÇÃO V(D)J EM TIMÓCITOS

É sabido que o rearranjo dos genes do TCR ocorre durante o estágio dependente de IL-7 da maturação dos timócitos. Entretanto, uma questão ainda

não foi resolvida: Qual a extensão do controle desta citocina no processo de rearranjo gênico? (CANDEIAS, MUEGGE and DURUM, 1997).

Existem dois tipos principais de controles considerados. O primeiro é o efeito trófico: IL-7 mantém a viabilidade das células durante o rearranjo gênico, enquanto o sinal que induz este rearranjo é distinto daquele promovido pela IL-7. O segundo controle possível é o mecanicista: IL-7 promove sinais que induzem a recombinação gênica, bem como mantém a viabilidade celular (CANDEIAS, MUEGGE and DURUM, 1997).

Inúmeros sistemas experimentais humanos e murinos têm mostrado que a IL-7 pode promover a recombinação V(D)J. Células de fígado de fetos de camundongos em cultura expressam transcritos das cadeias de TCR γ depois que IL-7 recombinante foi adicionada à cultura (APPASAMY, 1992). O tratamento de camundongos com anticorpos específicos contra o receptor de IL-7 resulta na supressão da expressão de *rag* no centro germinativo desses animais (KANG and DER, 2004)

O efeito da IL-7 na recombinação pode ser parcialmente explicado pela regulação da expressão do gene *rag*. A adição de IL-7 recombinante na cultura de células fetais tímicas ou hepáticas promove a expressão deste gene (APPASAMY et al., 1993). A comparação da expressão do gene *rag* em tímócitos de camundongos *knockout* para IL-7R e do tipo selvagem revela uma redução enorme na expressão de *rag-1* e *rag-2* nos primeiros (CROMPTON et al., 1997).

Observações *in vivo* em camundongos *knockout* levam a um possível papel da IL-7 no controle da acessibilidade ao *locus* γ do TCR para que ocorra a recombinação (SCHLISSEL, DURUM and MUEGGE, 2000). Estudos demonstraram que camundongos *knockout* para IL-7R α e γ c tem o *locus* TCR γ altamente metilado (HOFMEISTER et al, 1999). HUANG, DURUM e MUEGGE (2001) observaram que IL-7 regula a acessibilidade à cromatina para que ocorra a recombinação V(D)J através da alteração específica na acetilação de histonas dentro do *locus* TCR γ . DURUM e colaboradores (1998) sugerem que a IL-7 pode promover a demetilação desse mesmo *locus*, o que regularia a acessibilidade da maquinaria responsável pelo rearranjo ao TCR γ .

ESPANHOL e colaboradores (2003) estudaram a associação de 17 produtos gênicos (mRNA), entre eles o da IL-7, na evolução do rearranjo V(D)J do receptor TCRVB8.1 *in vivo* por meio de RT-PCR. O agrupamento dos dados demonstrou que o pico de expressão gênica de IL-7 acontecia anteriormente ou coincidia com a expressão dos genes *RAG-1* e *RAG-2*.

Em um estudo sobre recombinação V(D)J, MUEGGE, VILA e DURUM (1993) demonstraram a importância de IL-7 neste processo. Em culturas suspensas de timócitos não tratados ou tratados com IL-1, IL-2 e SCF, não foi possível detectar o rearranjo gênico. Somente em culturas tratadas com IL-7 essa detecção foi possível.

Nesses experimentos, MUEGGE, VILA e DURUM (1993) demonstraram um outro fato muito importante. Como já mencionado, somente a adição de IL-7 restaura a recombinação V(D)J em culturas suspensas; entretanto, na cultura do órgão intacto, esse importante processo da maturação de timócitos ocorre normalmente, sem que nada seja adicionado. Apesar do mRNA de IL-7 ser detectado em células do timo de fetos e animais adultos, não houve sua detecção nestas mesmas células em cultura suspensa. Isto provavelmente ocorre devido à ruptura das células epiteliais tímicas e/ou porque o contato celular é requerido para a produção de IL-7. Mesmo quando os timócitos suspensos foram cultivados em placas com fundo em U (o que possibilita um maior contato intercelular), o rearranjo não foi observado. Tudo isto sugere que os timócitos requerem sinais contínuos do microambiente tímico para que se desenvolvam normalmente, ressaltando a importância da estrutura tímica tridimensional para o estudo de timócitos.

1.4) A IMPORTÂNCIA DE ATOC NA PESQUISA SOBRE A MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS

O desenvolvimento das células T no ambiente tímico representa um excelente modelo experimental para estudar questões sobre o desenvolvimento destas células a partir de precursoras, a diferenciação em sublinhagens, seleção clonal e migração celular. O desenvolvimento do timócito não é um processo autônomo e a transição para o próximo estágio depende da interação com a complexa rede de células do estroma tímico que compõem o microambiente do órgão. Porém, a natureza dessas interações e os subseqüentes sinais envolvidos ainda não são completamente conhecidos (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 1999b).

Atualmente, um bom número de sistemas *in vitro* é utilizado para o estudo do desenvolvimento de timócitos e do papel das células do estroma tímico. A utilização de culturas dispersas é limitada, já que, nestes tipos de cultura, há um rompimento das interações celulares e moleculares que ocorrem na estrutura tridimensional normal do timo *in vivo*. Esta estrutura é crítica para o andamento

normal do processo de maturação (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 1999b). Foi demonstrado que a remoção de timócitos do microambiente tímico não só aumenta a taxa de morte celular espontânea, como promove alterações fisiológicas que afetam a susceptibilidade a mudanças induzidas por estímulos (MOORE, JENKINSON and OWEN, 1992).

Ao contrário, a técnica de *Adult Thymus Organ Culture* (ATOC) configura um modelo experimental no qual tais interações são mantidas, mimetizando o ambiente tímico normal onde essas células amadurecem. Portanto, esta técnica possibilita o estudo dos aspectos-chave deste processo de maturação e, sendo *in vitro*, permite sua “manipulação” por compostos bioquímicos, como as citocinas (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 1999b).

Apesar da semelhança à FTOC, o estudo do timo em ATOC oferece algumas vantagens. Enquanto FTOC gera predominantemente células CD8+, ATOC gera células com razão CD4+:CD8+ normal (WHALEN et al., 1999). Além disso, ATOC é tecnicamente mais simples que FTOC, já que gera um maior número de células sem exigir controle do tempo de prenhez nem microdissecção tímica (WHALEN et al., 2003).

A técnica de ATOC permite o desenvolvimento dos linfócitos T isolados de qualquer influência humoral ou celular proveniente de outros tecidos e provê um acesso controlado através do qual a maturação dos timócitos e dos mecanismos reguladores envolvidos podem ser investigados. Além disso, a fácil manipulação destas culturas permite a análise da adição de reagentes, como inibidores farmacológicos, anticorpos neutralizantes e citocinas. Assim, pode-se verificar o papel destas substâncias na maturação dos timócitos. Tais situações dificilmente poderiam ser manipuladas *in vivo* (HARE, JENKINSON and ANDERSON, 1999b).

A técnica de ATOC foi estabelecida por WHALEN e colaboradores (1999) inicialmente para permitir um estudo mais detalhado sobre os mecanismos pelos quais o gene *lyp* afeta o desenvolvimento de linfócitos T no ambiente intratímico. O estudo envolvia as linhagens de camundongos DP-BB (*congenitally lymphopenic diabetes prone – bio breeding*) e DR-BB (*coisogenic diabetes resistant*). Os resultados mostraram que a técnica de ATOC recapitula o desenvolvimento normal (DR-BB) e anormal (DP-BB) de linfócitos T tanto cinética quanto fenotipicamente, mostrando grande fidelidade fisiológica quando comparado ao que ocorre *in vivo*.

Pesquisadores utilizaram ATOC de camundongos DR-BB para testar a hipótese de que células T capazes de promover a transferência adotiva de diabetes poderiam sobreviver neste tipo de cultura e, se cultivadas na presença de antígenos

apropriados, poderiam se tornar não-diabetogênicas. Assim, a co-cultura com células pancreáticas permitiu a prevenção à transferência de diabetes em 90% dos recipientes (WHALEN et al., 2001).

WHALEN e colaboradores (2003) realizaram ATOC de camundongos BBDR para determinar se a exposição dos timócitos a citocinas de padrão Th1 durante o desenvolvimento intratímico poderia alterar a produção de citocinas e o estado de ativação dessas células. A detecção da polarização de células T intratímicas só foi possível pela técnica de ATOC. Um experimento *in vivo* seria prejudicado devido à complexa cinética associada ao influxo contínuo de células oriundas da medula óssea, à morte intratímica da maioria das células imigrantes e à saída constante de linfócitos T maduros. Dessa forma, ATOC permite a análise de células T na ausência da entrada de progenitores de timócitos, na ausência de emigração de linfócitos maduros e com a adição supervisionada de células específicas ou substâncias importantes. Além disso, culturas suspensas não permitem o desenvolvimento normal de timócitos nem a ocorrência de seleção, do mesmo modo que apresenta grande mortalidade celular (WHALEN et al., 2003).

ATOC é, portanto, uma importante ferramenta de estudo na elucidação de mecanismos de maturação de timócitos, bem como na identificação de processos patológicos que levam à disfunção imunológica e à autoimunidade.

1.5) A UTILIZAÇÃO DE CDNA *MICROARRAYS* NA PESQUISA EM IMUNOLOGIA

A combinação da função bioquímica com o padrão de expressão gênica tem oferecido inúmeras idéias para o funcionamento dos mecanismos biológicos em situações normais e em doenças. Com o amplo uso de *Expressed Sequence Tags* (EST) humanas e murinas, o perfil de expressão de mRNA analisado em larga escala por DNA *arrays* combina duas importantes ferramentas de estudo: a informação da seqüência e o nível de expressão gênica (GLYNNE, GHANDOUR and GOODNOW, 2000). A disponibilidade de tanta informação tem chamado a atenção dos cientistas para uma análise abrangente mas com precisão molecular dos fenômenos biológicos (RICIARDI-CASTAGNOLI and GRANUCCI, 2002).

Imunologistas já estão cientes da necessidade do monitoramento de muitos produtos gênicos diferentes simultaneamente. A expressão gênica analisada em *arrays* oferece a possibilidade de ampliação do conhecimento além da superfície celular, estendendo-o à pesquisa de todos os genes transcritos numa célula sob determinada situação (GLYNNE, GHANDOUR and GOODNOW, 2000).

O estudo da expressão gênica diferencial usando a tecnologia dos cDNA *microarrays* é baseado na hibridação de cDNA marcados em seqüências-alvo, cada uma correspondendo a um gene específico, previamente depositadas numa membrana de *nylon* ou lâmina de vidro. Esta tecnologia permite a obtenção de um *fingerprint* molecular da expressão gênica proveniente de uma situação particular (JORDAN, 1998; PASSOS, 2000; SAKAMOTO-HOJO et al., 2003a; SAKAMOTO-HOJO et al., 2003b).

A análise da expressão gênica por cDNA *microarrays* é uma das ferramentas atuais de biotecnologia mais promissoras (KOIZUMI, 2004). Cada experimento em genômica funcional pode oferecer inúmeras observações relevantes simultaneamente. Tais observações podem tornar-se alicerces para novas hipóteses. Dessa forma, essa nova tecnologia pode ser considerada uma ferramenta que catalisa a aquisição de conhecimento. Como interpretar essa enorme quantidade de informação consiste em um desafio, não só para bioinformatas e matemáticos, mas também para imunologistas, que têm tentado por décadas entender como um simples constituinte desse complexo sistema biológico interage (RICIARDI-CASTAGNOLI and GRANUCCI, 2002).

Essa nova tecnologia já foi usada em várias pesquisas em imunologia e mostrou resultados muito importantes. ALIZADEH e colaboradores (1998) detectaram *clusters* de mRNA cuja expressão permitiu completa diferenciação de todas as classes de leucemia conhecidas. No estudo da relação parasita-hospedeiro, MANGER e RELMAN (2000) analisaram a expressão gênica global em resposta a infecções e CHAUSSABEL e colaboradores (2003) compararam a resposta de células dendríticas e macrófagos a parasitas filogeneticamente distintos. Já foi comparado o padrão da expressão gênica entre células ativadas de formas distintas (VERDEIL et al., 2002), bem como o de diferentes subpopulações celulares em resposta a um estímulo (ROGGE, 2002). Dois grupos realizaram pesquisas sobre a expressão gênica de tumores, incluindo aqueles associados a agentes infecciosos (CARTER, CAHIR-MCFARLAND and KIEFF, 2002; OKABE et al., 2001). REA e colaboradores (2003) e PROWS e colaboradores (2003) utilizaram *microarrays* na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade a agentes químicos e CHIN e KONG (2002) estudaram os mecanismos envolvidos na resposta a drogas.

TEAGUE e colaboradores (1999) examinaram o padrão de expressão gênica em células T anérgicas e células T após 8h e 48h de ativação. Este estudo mostrou que, ao contrário do que se pensava, células T anérgicas não estão em um estado quiescente, irresponsivas aos estímulos do meio. Na verdade, estas células são

estimuladas por várias substâncias do seu microambiente para se manter neste estado. O número total de genes expressos em uma célula T quiescente é igual àquele expresso em células T 48h depois da ativação.

A análise da resposta de fibroblasto ao soro demonstrou que esse conjunto de antígenos é um sinal de perigo relevante fisiologicamente e não um simples estímulo mitogênico (IYER et al., 1999). Um trabalho recente demonstrou que a regulação de expressão de genes de citocinas e quimiocinas que são induzidos em células dendríticas em resposta a bactérias ocorre em ondas de expressão coordenadas temporalmente, e que não são reguladas de maneira linear (GRANUCCI et al., 2001).

ROTA e colaboradores (2003) utilizaram *microarrays* para caracterizar o vírus responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SARS). Os pesquisadores criaram um *chip* contendo 12000 seqüências de genes virais diferentes (ViroChip) e somente alguns pontos (genes), todos relacionados ao Corona vírus, mostraram expressão positiva. A rapidez deste método de análise pode trazer avanços significantes na descoberta de tratamento para essa doença (WEERARATNA et al., 2004).

O desenvolvimento de inúmeras doenças envolve a interação coordenada de várias vias bioquímicas que englobam muitas proteínas, o que reflete, portanto, a expressão de grande quantidade de genes de forma controlada temporal e espacialmente. A tecnologia de *microarrays* é ideal para análise da dinâmica dessa expressão global (BRYANT et al., 2004).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudos de genômica funcional aplicada à imunologia, campo que está sendo referido como imunogenômica. A base tecnológica é o emprego de cDNA *microarrays* no estudo de doenças auto-imunes como o lupus eritematoso sistêmico humano (PEREIRA et al, 2004), do desenvolvimento ontogenético *in vivo* do timo de camundongos isogênicos (ESPANHOL et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005) e do desenvolvimento do timo fetal em cultura (CARDOSO et al., 2005).

É esperado que dados dos estudos de *arrays* em imunologia permitam a determinação de como respostas podem ser mimetizadas ou inibidas farmacologicamente com especificidade maior do que aquela alcançada pelas drogas usadas atualmente. Além disso, diferenças nas respostas entre indivíduos podem ajudar a explicar como a variação genética afeta o sistema imune.

2) HIPÓTESE DO TRABALHO

A estrutura tridimensional do timo e a ação da IL-7 são fundamentais para o processo normal de maturação dos linfócitos T. Nesse trabalho, nossa intenção foi utilizar o modelo experimental *in vitro* que melhor mimetiza o timo adulto *in vivo* (ATOC), associado à poderosa ferramenta de estudo de expressão gênica diferencial (cDNA *microarrays*), para avaliar o efeito da IL-7 nos timócitos de camundongos adultos.

- 1- Uma vez que a IL-7 exerce um efeito regulatório negativo sobre o desenvolvimento progressivo de células T intratímicas maduras, este fenômeno deve estar associado à modulação da expressão gênica. Portanto, células tímicas adultas tratadas *in vitro* com IL-7 exógena deverão apresentar um padrão diferenciado de expressão gênica.

3) OBJETIVOS

Objetivo amplo: Avaliar o efeito da interleucina-7 sobre o timo adulto de camundongos em cultura (ATOC) observando a progressão da maturação de linfócitos T por meio da recombinação V(D)J de TRVB8.1 e da modulação do transcriptoma dos timócitos.

Objetivos específicos:

1) Cultivar o timo adulto de camundongos C57BL/6 (ATOC) na presença ou ausência de IL-7 exógena.

2) Avaliar a maturação de linfócitos T por meio da análise da recombinação V(D)J de TRVB8.1.

3) Avaliar os perfis de expressão gênica em larga escala (transcriptoma) das culturas (ATOC) tratadas ou não com IL-7 por meio da tecnologia de cDNA *microarrays*, a qual inclui o uso de programas de bioinformática especializados para evidenciarmos os genes modulados.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) LINHAGEM ISOGÊNICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6

As matrizes da linhagem isogênica de camundongos C57BL/6 foram adquiridas no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-II) e estão sendo mantidas por cruzamentos isogênicos em nosso Laboratório de Imunogenética Molecular, Departamento de Genética, FMRP, USP.

4.2) CULTURA DE TIMO ADULTO (ATOC) E TRATAMENTO COM IL-7

Fêmeas adultas, com idade de 8 semanas, foram anestesiadas por inalação de éter. Os timos foram imediatamente removidos intactos e transferidos para filtros de polícarbonato Millipore 0,45µm colocados sobre um bloco de *grids* de plástico (Upjohn, Kalamazoo, MI), mantidos em placas de cultura (24 poços) contendo 3,0mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) e HAM F-10 (Invitrogen), adicionados de 20% de soro bovino fetal, estreptomicina (100µg/mL), penicilina (250U/mL), gentamicina (10µg/mL) e bicarbonato de sódio (1,2g/L). Os órgãos foram cultivados a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Whalen et al., 1999).

A citocina IL-7, utilizada nos tratamentos, foi proveniente da PreproTech (MEXICO S.A.). As concentrações testadas foram de 0,1; 1,0 e 10ng/mL de meio. Foram realizadas 6 culturas para cada concentração da citocina IL-7, além do controle. O tempo de cultivo foi de 24h.

4.3) EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE TIMÓCITOS

Os timos, após 24h de cultura, foram pinçados e centrifugados em uma coluna de Ficoll Hypaque (Sigma) em um tubo Falcon 15mL para separação de timócitos. Em seguida, o anel de células foi retirado com auxílio de uma pipetadora, colocado em um outro tubo Falcon 15mL e as células foram lavadas em solução salina fisiológica estéril.

Ao *pellet* formado após a centrifugação, foram adicionados 200µL de salina-DEPC (feita com água tratada com DEPC (Diethyl Pirocarbonato) 0,1%) e 1mL de Trizol® (Invitrogen, EUA) para extração de RNA total. Após a homogeneização, transferiu-se as amostras para um tubo Eppendorf de 1,5mL e adicionou-se

clorofórmio (0,2mL/1mL de Trizol). As amostras foram agitadas por cerca de 15 segundos e deixadas por três minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 15 minutos a 2-8°C (12000xg). Após a centrifugação, cada amostra estava dividida em três fases.

Para extração do RNA, transferiu-se a fase aquosa para outro tubo Eppendorf (a fase orgânica foi armazenada a -20°C para posterior extração de DNA) e precipitou-se o RNA com álcool isopropílico. As preparações de RNA ficaram estocadas em isopropanol a -20°C. Próximo à utilização do RNA para hibridação, os tubos foram centrifugados por 10 min a 2-8°C (12000xg) e removeu-se o sobrenadante. O *pellet* de RNA formado foi lavado em etanol-DEPC 75% a frio. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2-8°C (7500xg). A lavagem foi repetida mais uma vez. Após secagem natural do *pellet*, redissolveu-se o RNA em água tratada com DEPC 0,1%. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até o uso.

4.4) QUANTIFICAÇÃO E ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE RNA TOTAL

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro sendo que $1U_{A_{260}} = 40\mu\text{g RNA/ml}$. Após a quantificação, foi preparado um gel de agarose 1,5% desnaturante para avaliação da integridade do RNA e só foram utilizadas preparações livres de proteína ($A_{260}/A_{280} \cong 1,8$) e livres de fenol ($A_{220}/A_{260} \cong 0,7$). Um total de 87 ml de agarose (Sigma médium EEO) fundida em água milli-Q autoclavada foi misturada com 30 ml de formaldeído 37% (Merck) e 33 ml de tampão de migração MOPS 5x (20,6 g de MOPS (3-(N-Morpholino) Propanesulfonic Acid) dissolvidos em 800 ml de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0, ajustado com NaOH 2 N e adicionado de 10 ml de EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 0,5 M pH 8,0; quantidade suficiente para (qsp) 1000mL). Aproximadamente $1\mu\text{g RNA}$ foi denaturado adicionando-se 2,0 μl de tampão MOPS 5x; 3,5 μl de formaldeído 37%, 10 μl de formamida deionizada (Invitrogen) e 1,0 μl de brometo de etídeo diluído 3:1 (solução estoque 10 mg/ml). Esta mistura foi incubada a 65°C por 15 minutos, sendo imediatamente esfriada em gelo picado.

Adicionou-se a essa solução 2,0 μl de *dye loading solution* (1/10 do volume). Após eletroforese a 80V durante 60 minutos, as bandas de RNA 28 S, 18S, 5S+ RNA transportador (tRNA) , foram visualizadas em transiluminador UV e fotografadas em Polaroid.

4.5) EXTRAÇÃO DE DNA DE TIMÓCITOS

Para precipitação de DNA, que se encontrava na fase orgânica obtida após a centrifugação das amostras com Trizol e clorofórmio, adicionou-se 300µL de etanol absoluto para cada 1mL de Trizol anteriormente adicionado. Misturou-se lentamente com posterior incubação à temperatura ambiente por 2–3 minutos. Após a centrifugação a 2-8°C por 5 minutos (2000xg), desprezou-se a fase aquosa e adicionou-se 1mL de citrato de sódio 0,1M dissolvido em solução de etanol 10% para lavar o *pellet* de DNA. Incubou-se por 30min em temperatura ambiente com agitação periódica e centrifugou-se a 2-8°C por 5 minutos (2000xg). O sobrenadante foi desprezado, ressuspensão em 1500µL de etanol 75% gelado e incubado por 15min à temperatura ambiente com agitação periódica. Passado esse período, centrifugou-se por 5min a 2-8°C. Esse processo de lavagem foi realizado duas vezes. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco à temperatura ambiente. Então, o *pellet* foi ressuspensão em 100µL de TE pH8,0. A concentração de DNA foi dosado no espectrofotômetro (260nm).

4.6) ENSAIO DE RECOMBINAÇÃO V(D)J DE TRVB8.1-DJB2.1

A recombinação V(D)J de TRVB8.1-DJB2.1 foi investigada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) seguida de hibridação *Southern Blot* com as amostras de DNA obtidas de ATOC tratadas ou não com IL-7. Como padrão de DNA na configuração germinativa dos genes que codificam TCR utilizou-se DNA de fibroblastos da linhagem A31 cultivados *in vitro*. O DNA dessa linhagem celular foi extraído com o *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Os primers utilizados neste ensaio estão descritos na tabela 1. Os *primers* de VB8.1 foram usados para obter uma sonda VB8.1 específica e estes juntamente com o *primer* DJB2.1, para a detecção do rearranjo entre os segmentos VB8.1 e DJB2.1 por *Southern Blotting*.

TABELA 1: *Primers* usados na amplificação por PCR de VB8.1 e DJB2.1.

Primer	Seqüência	Temperatura de Anelamento
VB8.1	3'GAG GCT GCA GTC ACC CAA AGT CCA A 5'	54°C
VB8.1	3'ACA GAA ATA TAC AGC TGT CTG AGA A 5'	54°C
DJB2.1	3'TGA GTC GTG TTC CTG GTC CGA AGA A 5'	54°C

A reação de PCR era composta de 35mM TRIS (pH8,3), 50mM KCl, 2,5mM de $MgCl_2$, soro albumina bovina (100 μ g/mL), dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) (2 μ M cada), 0,5 μ M de cada primer, 1U de Taq polimerase (Amersham Biosciences) e 300ng de DNA de cada situação experimental. O programa foi composto por 30 ciclos de 1min a 94°C, 2,5min a 54°C e 1,5min a 70°C e 10min a 70°C para extensão. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,2% com brometo de etídio, visualizados em um transluminador UV e fotografados em Polaroid.

Para realização do *Southern Blotting*, os produtos de PCR foram transferidos para membranas de *nylon* Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) usando um aparelho de *vaccum blot* (Pharmacia Biotech). O DNA transferido para membrana foi fixado por iluminação UV seguido de incubação a 80°C durante 40 minutos.

As membranas foram incubadas a 42°C em solução de pré-hibridação composta por 6mL de 12x SSC (105,2g de NaCl e 53,9g de citrato de sódio qsp 1000mL), e 10x Denhardt (0,2% de polivinil pirrolidona (Merck); 0,2% de Ficoll 400 (Pharmacia Biotech); 0,2% fração V de albumina de soro bovino), mais 6mL de Dextran sulfato 10% dissolvido em formamida acrescidos de 0,125mL de fosfato de sódio 2M e 200 μ g/mL de DNA de esperma de salmão denaturado. O tempo de pré-hibridação foi de 24h.

O segmento VB8.1 rearranjado tem aproximadamente 330pb e a sonda marcada com ³²P tem 100pb e foi obtida a partir do primer VB8.1. Para marcação da sonda, um tubo contendo 25ng de DNA (sonda) dissolvidos em 20 μ L de água foi incubado em água fervente por 5min e, imediatamente, colocado em gelo. Ao tubo foi acrescentado 3 μ L de α^{32} P dCTP (3000Ci/nmol), 2 μ L de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP), 1 μ L de Klenow, 15 μ L de *random primer buffer mix*, com um volume final de 50 μ L. Após, 3h de incubação a temperatura ambiente, a solução é passada em coluna de Sephadex G50 para eliminação do ³²P não incorporado na sonda. Em seguida, a solução é novamente incubada por 5min em água fervente e, imediatamente, colocada em gelo.

A taxa de incorporação do ³²P (cpm/mL) foi avaliada pela leitura de 1 μ L da sonda em 5mL de líquido cintilador (Ultimagold, Packard, EUA) em aparelho de cintilação líquida (Tri-Carb 2100TR, Packard, EUA). As sondas foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram de 30 a 50 x 10⁶ cpm em 100 μ L. Em seguida, a sonda é colocada na solução de pré-hibridação e permanece incubada com a membrana por 24h.

As lavagens foram feitas em condições de alta estringência: dois banhos de 20min à temperatura ambiente em 2x SSC e 0,1% SDS; um banho de 30min a 65°C em 0,1x SSC e 0,5% SDS; dois banhos de 30min a 65°C em 0,1x SSC e 0,1% SDS. As membranas foram então expostas em placas de sensibilidade à radioatividade e, após algumas horas, visualizadas no aparelho leitor de fósforo radioativo (Cyclone, Packard Inst., EUA).

4.7) *NORTHERN BLOTTING*

Para realização de *northern blotting*, 10µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose 1,5% desnaturante (condições idênticas às aquelas descritas no item 4.4). Em seguida, o gel foi fotografado e as amostras foram transferidas para uma membrana de nylon Hybond N⁺®. A transferência foi realizada num aparelho de *vacuum blot* (Pharmacia Biotech). O RNA transferido para membrana foi fixado por iluminação UV seguido de incubação a 80°C durante 40 minutos. A membrana foi conservada à temperatura ambiente, protegida da luz e poeira.

A sonda foi obtida por miniprep a partir do clone da biblioteca contendo o plasmídeo para Stat1 pelo *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. A marcação da sonda, hibridação e lavagens foram realizadas como descrito no item 4.6.

4.8) PREPARAÇÃO DE CDNA *MICROARRAYS* EM NYLON

4.8.1) BIBLIOTECA DE CDNA MURINOS

O Laboratório de Imunogenética Molecular mantém uma biblioteca de cDNA murinos com cerca de 9.000 clones de timo de camundongo C57BL/6 adulto provenientes do IMAGE Consortium (<http://image.llnv.gov>). São clones de seqüências EST, com tamanho molecular variando de 500 a 1500 pb. Esta biblioteca, cujos clones estão seqüenciados e catalogados no *GenBank*, está totalmente caracterizada. Existe um arquivo de computador contendo todas as informações de cada um dos clones, tais como *accession number* (acc) no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), Clone ID, o nome do gene (quando este for conhecido e associado à EST) e a posição de cada clone em placas de 384 poços. Esta biblioteca é conservada em placas de microtitulação (384 poços) a -80°C

(material gentilmente cedido pela Dra. Catherine Nguyen, do Centro de Imunologia-Marseille-Luminy-INSERM, França).

A partir desses 9.000 clones, foi realizada uma seleção dos clones de cDNA mais relacionados ao sistema imune, de maneira a direcionar a análise da expressão gênica diferencial. Além disso, também foram selecionados clones de interesse de uma biblioteca IMAGE humana (desde que a homologia com a seqüência de camundongo fosse igual ou maior a 80%), bem como clones do consórcio RZPD (*Ressourcen Zentrum Für Genomforschung GmbH*, Berlin, Alemanha, www.rzpd.de) adquiridos pelo Prof. Dr. Geraldo Passos e pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva. Novas placas foram organizadas e um novo arquivo foi montado para identificação dessa seleção de clones.

4.8.2) AMPLIFICAÇÃO DE CDNA PARA A CONFECÇÃO DE MICROARRAYS

Os clones de cDNA selecionados da biblioteca foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* consenso para os três vetores utilizados na construção da biblioteca IMAGE: *Lafmid*, *pBluescript SK* e *pT7T3* (Tabela 2), além do *primer* para o vetor *pCMV-SPORT6*, usado na amplificação de 39 clones adquiridos junto ao consórcio RZPD (Alemanha) (Tabela 3).

TABELA 2: *Primers* usados na amplificação por PCR de clones provenientes da biblioteca IMAGE.

Primer	Seqüência	Temperatura de Anelamento
LBP 1S	5'GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC 3'	55°C
LBP 1AS	5'GGG TTG AAT TAG CGG AAC G 3'	55°C

TABELA

3.

Primers usados na amplificação por PCR de clones provenientes do consórcio RZPD.

Primer	Seqüência	Temperatura de Anelamento
M13F	5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	55°C
M13R	5'AGC GGA TAA CAA TTT CAC AÇA GG 3'	55°C

Os clones bacterianos selecionados foram repicados em 2 placas de 384 poços, totalizando 624 clones, e crescidos em 45µL de meio 2x LB com ampicilina

(volume final no poço: 50µL) a 37°C por 16 horas. Posteriormente, 8µL da cultura dos clones foram adicionados a uma outra placa de 384 poços que continha 72µL de água milli-Q autoclavada (placa de lise). Esta placa foi levada a um forno a 95°C por 10 minutos para lise dos clones e liberação do plasmídeo. Em seguida, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000xg para a remoção do *debris* celular e 10µL do sobrenadante foi removido para as reações de PCR. Para esta reação, adicionou-se ao lisado 40µL de um *mix* que continha 5µL de tampão (KCl 50 mM; Tris pH 8,0, 10 mM; MgCl₂ 1,5 M), 2µL de solução de dNTPs (2 mM), 1,5µL de *primers* com seqüências consenso e 1µL de Taq DNA polimerase (5U/µL). A reação de PCR teve volume final de 50µL para cada poço. A placa de lise foi estocada a -80°C.

Os insertos dos clones foram amplificados segundo o programa descrito por MENOSSE e colaboradores (2000): 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; após estes ciclos, ocorre um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Foram realizadas 2 amplificações por clone em placas de 96 poços com fundo em U.

4.8.3) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Após a reação de PCR, o produto de cada clone foi purificado por precipitação com etanol para que houvesse a remoção de nucleotídeos não incorporados e de *primers* da reação de PCR.

Foram adicionados 10µL de acetato de sódio 3M pH4,8 em cada um dos poços de uma placa de 96 poços com fundo em U. Em seguida, os produtos das duas reações de PCR foram agrupados, totalizando 100µL, e transferidos para esta mesma placa. Após a adição de 100µL de etanol absoluto, as placas foram incubadas *overnight* a -20°C. Após esse tempo, as placas foram centrifugadas a 2-8°C por 60 min (4000xg). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensão em 100µL de etanol 70%. As placas foram novamente centrifugadas a 2-8°C por 30 min (4000xg). O sobrenadante foi novamente desprezado e a placa secou à temperatura ambiente *overnight*. Seca a placa, o *pellet* foi ressuspensão em 50µL de água mili-Q autoclavada.

Uma alíquota de 5µL destes produtos foi aplicada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, visualizado em um transluminador UV e fotografado em Polaroid para avaliar a qualidade dos produtos amplificados.

As placas foram secas em forno a 42°C e adicionou-se 27µL de solução DMSO (dimetil sulfóxido) 50% por poço. Em seguida, estas placas foram levadas ao freezer -20°C e os produtos foram congelados e descongelados por 3 vezes para uma melhor dissolução do DNA concentrado. Posteriormente, todos estes produtos foram removidos para placas de 384 poços, as quais foram estocadas a -20°C até a preparação dos *microarrays*.

4.8.4) CONFECÇÃO DOS *MICROARRAYS* EM MEMBRANA DE *NYLON* (HYBOND N⁺)

O sistema de preparação de *microarrays* do Laboratório de Imunogenética Molecular é proveniente da Amersham-Molecular Dynamics (Generation III Array Spotter). Com este robô, padronizou-se a confecção de *microarrays* em *nylon*, utilizados neste trabalho. As sondas de cDNA foram marcadas com isótopo radioativo ³³P e as imagens de hibridação foram obtidas por meio de um aparelho leitor de fósforo (Packard Instruments, Modelo Cyclone, EUA).

O número de clones aplicados nos *microarrays* de *nylon* foi 624, além dos controles (156 pontos de DNA genômico), totalizando 780 seqüências no *microarray*. Em cada *microarray* de *nylon* Hybond N⁺ (2,5 x 7,5cm, dimensão de uma lâmina de microscópio) foram aplicados 1560 pontos (624 seqüências de cDNA e 156 controles em duplicata).

Os cDNA amplificados por PCR e purificados foram depositados, pelo robô, nas membranas de *nylon*, totalizando seis *hits* (número de séries de deposição dos cDNA) para a obtenção da concentração ideal de DNA por ponto. Em seguida, as membranas foram tratadas com solução desnaturante (NaOH 0,5M e NaCl 1,5M) por 20 minutos, solução de neutralização (Tris HCl pH 7,4 2M e NaCl 1,5M) por mais 20 minutos e lavadas em SSC 2X (feita a partir de uma solução estoque SSC 20x). As membranas foram levemente secas à temperatura ambiente e, em seguida, expostas a iluminação UV por 2 minutos. Por fim, elas foram aquecidas a 80° C durante 2 horas para fixação do DNA.

A figura 4 ilustra uma membrana de *microarray* em *nylon* e os parâmetros de espotagem¹ utilizados pelo Laboratório de Imunogenética Molecular. A qualidade dos *microarrays* foi avaliada por hibridação com oligo-vetor marcado com ³³P, cuja imagem permite apontar os *spots* defeituosos. Além disso, na primeira linha da membrana é adicionado, como controles, DNA genômico em diluição seriada e, no centro da linha, poli A. Dessa forma, como garantia do experimento, a hibridação

¹ Espotagem é uma palavra jargão que significa aplicação dos pontos. Originária do inglês *spot* (ponto).

com o oligo-vetor deve marcar somente o ponto contendo poli A (Figura 11) e a hibridação com sonda complexa deve marcar as diluições seriadas de DNA genômico (Figura 12).

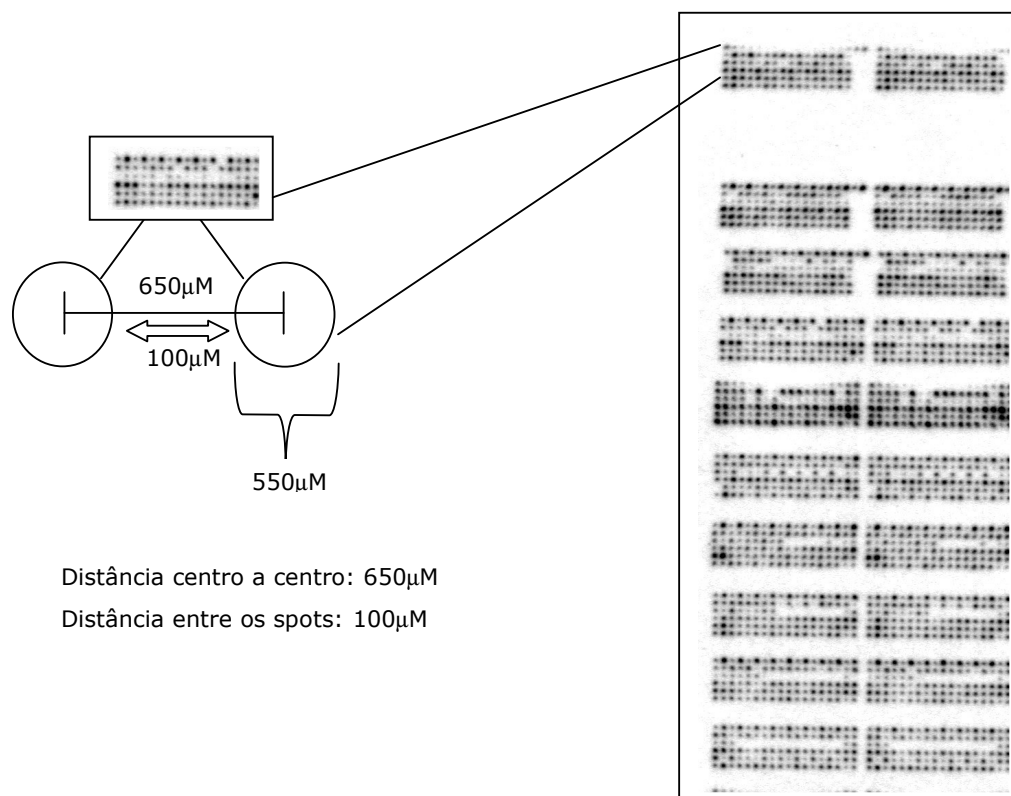


FIGURA 4: Padrão de pontos das membranas de microarrays. O diâmetro dos spots é de 550µM e a distância entre eles 100µM. Total de spots: 1560. OBS.:Figura ilustrativa, não corresponde às imagens reais do trabalho.

4.8.5) AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE PONTOS POR HIBRIDAÇÃO COM OLIGO-VETOR

A hibridação com um oligo-vetor (seqüência complementar a um segmento do vetor da biblioteca que ainda permanece nos produtos de PCR) tem por finalidade estimar a quantidade de DNA retida em cada ponto do microarray. Os resultados dessa hibridação com o oligo-vetor foram utilizados em cada um dos passos de correção dos dados obtidos com as sondas complexas de RNA.

Cerca de 0,75µg do oligo-vetor LBP 1S (5'GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC 3') e 0,38µg do oligo-vetor M13 foram marcados com fósforo radioativo segundo o seguinte protocolo: 3µL [γ -³³P] ATP 5000 Ci/mM (Amersham Biosciences) foram

misturados com 1 μ L de T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen, 10U/ μ l), 4 μ L de tampão 5X *Forward Reaction Buffer* e 10,25 μ L de água milli-Q autoclavada (qsp 20 μ L), sendo a mistura incubada durante 45 minutos a 37 °C. Em seguida, foi acrescentado 80 μ L de água milli-Q autoclavada e, posteriormente, a sonda-vetor foi purificada em uma coluna com Sephadex G50, durante 10 minutos a 65°C, para a eliminação do ³³P não incorporado na sonda-vetor.

A taxa de incorporação do ³³P (cpm/mL) foi avaliada pela leitura de 1 μ l da sonda em 5mL de líquido cintilador (Ultimagold, Packard) em aparelho de cintilação líquida (Tri-Carb 2100TR, Packard, EUA). As sondas foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram de 30 a 50 x 10⁶ cpm em 100 μ L.

Todas as membranas foram submetidas à pré-hibridação *overnight* a 42°C em 12mL de solução de pré-hibridação, que é composta por SSC 5x, Denhart's 5x, SDS 0,5%, com 240 μ g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado; qsp 1000mL. Posteriormente, procedeu-se à hibridação *overnight* a 42°C com o oligo-vetor marcado, seguida de lavagem das membranas com 1000mL de tampão SSC 2x/SDS 0,1%, por 10 minutos, à temperatura ambiente e por mais 5 minutos, com a mesma quantidade de tampão aquecido a 42°C. Então, as membranas foram expostas durante 72 horas a placas sensíveis à radioatividade, as quais foram lidas pelo aparelho leitor de fósforo incorporado (Packard Instruments, Modelo Cyclone, EUA).

Após a aquisição das imagens das membranas hibridizadas com o oligo-vetor, foi realizada a desibridização para posterior uso dos microarrays com as sondas complexas. Para isto, as membranas foram lavadas em 1000mL de solução SSC 0,1X/0,1% SDS, durante 1,5 hora a temperatura de 68°C, havendo troca da solução a cada meia hora. Logo, as membranas foram mergulhadas em tampão SSC 2X e expostas novamente, durante 72 horas, às placas sensíveis à radioatividade, as quais foram lidas pelo aparelho leitor de fósforo (Packard Instruments, Modelo Cyclone, EUA).

4.9) PREPARAÇÃO DE SONDAS COMPLEXAS DE CDNA A PARTIR DE RNA TOTAL

As sondas complexas de cDNA foram preparadas a partir do RNA total extraído dos timócitos tratados ou não com IL-7.

Cinco microgramas do RNA total de cada amostra e mais 8 μ g de oligo (dT25) foram aquecidos a 70°C para a remoção de estruturas secundárias de RNA e

resfriados progressivamente em uma máquina de PCR até 42°C. Esse processo foi feito para garantir o anelamento do oligo (dT25) com as caudas poli-A dos mRNA.

Posteriormente, as sondas complexas foram preparadas pela reação de transcrição reversa e marcação de DNA fita simples. Esta reação ocorre por 2 horas a 42°C na presença de 3µL de 10uCi/µL ($\alpha^{33}\text{P}$) dCTP (Amersham Biosciences) (> 3000 Ci/mM), 0,6µL da mistura dos dNTPs (20mM de dATP, dTTP e dGTP), 0,6µL de dCTP 120µM, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de Rnasin (inibidor de ribonuclease) (Promega, EUA), 6µL de tampão da transcriptase reversa 5x, 1µL de transcriptase reversa (SuperScript RNase H free RT, 200u/µL) (Invitrogen, EUA) e 2,8µL de água-DEPC estéril (qsp 30µL). Passada a primeira hora da reação, acrescentou-se mais 1µL de transcriptase reversa.

A eliminação dos mRNA moldes e dos RNA ribossômico (rRNA) das sondas foi realizada por incubação, durante 30 minutos a 68°C, com 1µL de SDS 10%, 1µL de EDTA 0,5M e 3µL de NaOH e deixados à temperatura ambiente por mais 15 minutos. A posterior neutralização foi realizada por adição de 10µL de Tris-HCl 1M, 3µL de HCl 2N e 51µL de água-DEPC estéril (qsp 100µL). Os nucleotídeos não incorporados foram removidos por meio da passagem em coluna de Sephadex G50.

A radioatividade total foi avaliada pela leitura de 1µL da sonda em 5mL de líquido cintilador (UltimaGold, Packard) em aparelho de cintilação líquida (Tri-Carb 2100TR, Packard, EUA). As sondas foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram aproximadamente 30 a 50 x 10⁶ cpm em 100µL. Após acrescentar às sondas 2µg de poli-A80 e desnaturá-las por 5 minutos a 100°C, estas foram incubadas em 1mL de tampão de hibridação pré-aquecido, durante 2,5 horas a 65°C, com a finalidade de proporcionar a hibridação do oligo A80 com as caudas poli-T remanescentes da reação de transcrição reversa. Após este procedimento, as sondas estavam prontas para hibridar com *microarrays*.

4.10) HIBRIDAÇÃO DE *MICROARRAYS* COM SONDAS COMPLEXAS

As membranas foram mergulhadas em tampão SSC 2x e, posteriormente, submetidas à pré-hibridação durante 18 horas, em 4mL de solução de pré-hibridação de constituição igual à utilizada para a hibridação com oligo-vetor (item 4.8.5).

A hibridação com a sonda complexa foi realizada a 68°C durante 48 horas. Após a hibridação, as membranas foram lavadas durante 3 horas em 200mL de solução de SSC 0,1x, 0,1% SDS a 68°C, havendo troca da solução a cada hora.

Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas em tampão SSC 2x. Em seguida, foram expostas em placas de sensibilidade do aparelho leitor de fósforo radioativo (Packard Instruments, Modelo Cyclone, EUA) durante 72 horas.

4.11) DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS SINAIS DE HIBRIDAÇÃO

Decorrido o tempo de exposição, as imagens foram adquiridas em aparelho leitor de fósforo (Packard Instruments, Modelo Cyclone, EUA), para a captação dos sinais de hibridação, e digitalizadas em imagens pelo programa OptiQuant® (Packard Instruments, EUA).

Para a quantificação dos sinais de hibridação utilizou-se o programa BZScan, que foi criado pelo grupo do Dr. Remi Houlgatte (Grupo TAGC, *Technologies Avancées pour le Génome et la Clinique*, INSERM ERM 206, Marseille, França) e está disponível no site <http://tagc.univ-mrs.fr/bioinformatics/bzscan.html>. (LOPEZ et al., 2004)

Durante a utilização do programa BZScan realizou-se o cálculo de intensidade dos pontos de deposição com reconhecimento da área limite do ponto (borda do ponto), foram gerados os cálculos para correção da interferência de um ponto sobre os valores de quantificação dos demais e calculou-se a correção de pontos saturados com base na curva de distribuição dos *pixels* do ponto. Por fim, utilizou-se o modo de visualização tridimensional do ponto para avaliação do alinhamento das grades de quantificação e dos cálculos realizados para o controle de interferência e saturação.

4.12) SUBTRAÇÃO DO *BACKGROUND* E FILTRAGEM DE DADOS QUESTIONÁVEIS

Embora o programa BZScan não apresente uma ferramenta automática para a subtração de *background*, este é capaz de moldar a grade de quantificação ao ponto e quantificar valores de intensidade apenas nesta área, minimizando assim o efeito de interferência da intensidade do *background*. Desta forma, a alternativa ao cálculo do valor do *background* ponto a ponto criada neste programa é a diminuição da importância deste valor de quantificação. Mesmo assim, calculou-se o valor de *background* global adotando-se este como sendo igual à mediana dos valores de leitura adquiridos para os pontos de controle negativo. Desta forma, subtraiu-se do valor de hibridação de cada ponto o valor mediano calculado como interferência de fundo.

Utilizou-se uma filtragem para eliminação de dados questionáveis ou de baixa qualidade. O filtro controle de qualidade usado para remover os pontos de deposição com características questionáveis considera basicamente se o ponto apresenta forma extremamente diferente de um círculo (forma esperada) e se a relação entre o sinal do ponto e interferência é muito baixa. Desta forma, foram excluídos da análise os pontos que apresentam sinal muito fraco, sinal muito forte, sinal com área muito pequena, *background* excessivo ou variância muito grande entre os pixels.

Para decidir o limite de intensidade mínima capaz de distinguir com confiabilidade um ponto de deposição e o *background* foi decidido que o sinal somente seria utilizado se ele fosse maior que o valor do background global acrescido de duas vezes o valor do desvio padrão entre as áreas de controle negativo.

Uma vez identificados os pontos com características consideradas adequadas, procedeu-se a normalização dos dados para comparação entre as diferentes situações experimentais.

4.13) NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

Os dados foram normalizados para ajustar as diferenças relativas à qualidade e à quantidade do mRNA utilizado na confecção das sondas complexas, assim como as diferenças de marcação das sondas, a hibridação destas com o substrato e aquisição das imagens.

Para corrigir as diferenças relativas à intensidade global da imagem de hibridação (referente à diferença entre eficiência de marcação da sonda, lavagem das membranas e aquisição de imagens) dividiu-se todos os valores de hibridação pelo ponto mediano da respectiva membrana.

O primeiro passo para avaliação da homogeneidade dos níveis de intensidade das membranas foi a avaliação dos valores obtidos para o ponto de menor intensidade, primeiro quartil, mediana, terceiro quartil, e o ponto máximo da membrana (BRAZMA and VILO, 2001).

Uma forma adicional de avaliação da eficiência da normalização adotada foi a correlação entre a distribuição dos dados dos experimentos com os dados de um experimento mediano hipotético (que consiste no valor mediano de intensidade de expressão de um gene entre todas as situações experimentais). Os experimentos

que apresentaram uma correlação acima de 0,85 foram considerados como bem normalizados, enquanto que os experimentos com baixa correlação foram submetidos a análises complementares.

Adicionalmente, para a detecção de padrões de distúrbios locais de normalização os dados mal normalizados foram organizados em gráficos de dispersão contra os valores do experimento mediano. No caso em que ocorreram estas falhas foram utilizados outros recursos para verificar o motivo da alteração na distribuição.

A normalização dos dados de *microarrays* é necessária devido às variações mínimas, porém importantes, durante a realização dos experimentos assim como devido à eficiência da incorporação de material radioativo, à concentração dos DNAs fixados nas membranas, à quantidade de mRNA, à eficiência da reação de transcrição reversa no preparo das sondas, aos processos de lavagem dos *microarrays*, dentre outras variações possíveis.

4.14) ORGANIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS DADOS

A listagem contendo a identificação das seqüências de cDNA de cada clone foi disposta de forma linear em uma planilha do programa *Excel*[®] (Microsoft). Entretanto, a forma em que foi realizado o arranjo dos clones sobre a membrana de *microarray* não permite associação direta dos valores numéricos com a posição de um determinado clone quando usamos o programa *BZScan*. Para associarmos cada ponto do *microarray* com seu valor numérico, utilizamos o programa *Array Organizer* desenvolvido em *visual basic* pelo doutorando S.S. Mello e pelo técnico J.P. Mercantil (programa de utilização restrita ainda não publicado).

4.15) ANÁLISE ESTATÍSTICA E AGRUPAMENTO DOS DADOS

Diferentes programas estão disponíveis para o processamento do agrupamento hierárquico, porém, o mais importante na elaboração deste agrupamento é a decisão sobre qual medida de similaridade a ser adotada, a necessidade de se transformar a escala dos valores de expressão (normalmente transformada em escala logarítmica) e a dependência dos genes entre si. O agrupamento hierárquico foi realizado utilizando-se o programa *Cluster* e a visualização da matriz de expressão no programa *TreeView* (EINSEN et al., 1998).

Ambos os programas podem ser encontrados no site (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). A média de similaridade adotada foi a correlação de Pearson, considerando-se *linkage* médio.

Para análise de agrupamento, foram retirados da planilha os valores referentes aos controles positivos e negativos. Os dados foram filtrados de modo que somente foram agrupados os genes que apresentaram valores em mais de 80% dos experimentos. Adicionalmente, os valores foram transformados em escala logarítmica, sendo posteriormente centralizados para que a mediana dos valores de hibridação de cada gene fosse igual a zero.

Essa análise foi realizada utilizando um método de agrupamento hierarquizado pela distância euclidiana, conforme descrito por EISEN e colaboradores (1998). Por meio desses programas gerou-se um *heat map* (mapa de cores relacionado com o nível de expressão dos genes) para os valores. O *heat map* é composto por um código de cores a fim de facilitar a associação visual dos níveis de expressão gênica. Em paralelo, criou-se um dendrograma demonstrando as relações de proximidade entre os genes baseando-se nos perfis de expressão.

Desta forma, uma vez detectados os agrupamentos funcionais, cabe ao pesquisador a elaboração de hipóteses para explicar um efeito biológico e a comprovação destas com o auxílio de outras técnicas e/ou experimentos pertinentes.

Também foi utilizado o algoritmo *Significance Analysis of Microarrays* (SAM - <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) (TUSHER, TIBSHIRANI and CHU, 2001) para a detecção de genes diferencialmente expressos. Esse *software* classifica um gene baseado em uma série de testes T específicos para detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. Para avaliar se a indicação de um gene como diferencialmente expresso ocorre em função de desvios da média de um grupo experimental por contaminação de uma amostra discrepante em relação a este próprio grupo, o SAM utiliza testes de permutações balanceadas entre uma amostra de cada grupo experimental.

A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o programa SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações biológicas e o desvio padrão de cada gene, calculado a partir de repetição experimental.

Para determinação de genes com mudanças significativas na expressão, utilizou-se um gráfico de dispersão $d(i)$, em relação à diferença relativa esperada $d_E(i)$. Para uma grande maioria de genes, $d(i) \approx d_E(i)$, mas alguns genes são

representados por pontos distantes da linha $d(i) \approx d_E(i)$. As alterações das expressão dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar (Δ) são consideradas significantes.

O limiar (Δ) determina dois cortes horizontais, ou seja, indica a partir de qual distância da linha $d_E(i)$ um gene é considerado diferencialmente expresso (induzido ou reprimido).

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada Freqüência de Descobertas Falsas (FDR), calculada por um método inicialmente idealizado por BENJAMINI e HOCHBERG (1995) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas. O cálculo do FDR e o número de genes com mudanças significativas estão intimamente relacionados com o limiar (Δ). À medida que o valor do limiar diminui, o número de genes significativamente alterados aumenta às custas de um aumento de FDR. Essa determinação do nível de significância pelo limiar providencia cortes assimétricos para genes induzidos e genes reprimidos (Figura 5).

O programa SAM estabelece automaticamente uma ligação entre o número de acesso das seqüências de cDNA com as páginas de informações sobre o clone em questão, situados no banco de dados SOURCE (*STANFORD ONLINE UNIVERSAL RESOURCE FOR CLONES AND ESTS*, <http://genome-www.Stanford.edu>). O SOURCE compila informações de vários bancos de dados públicos² e as disponibilizam de maneira a facilitar a caracterização dos genes diferencialmente expressos.

² UNIGENE - www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene,
dbEST - www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST,
SWISS-PROT - www.ebi.ac.uk/swissprot,
GENEMAP99 - ncbi.nih.gov/genemap,
GENECARDS - nciarray.nci.nih.gov/cards,
LOCUSLINK - www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/LocusLink

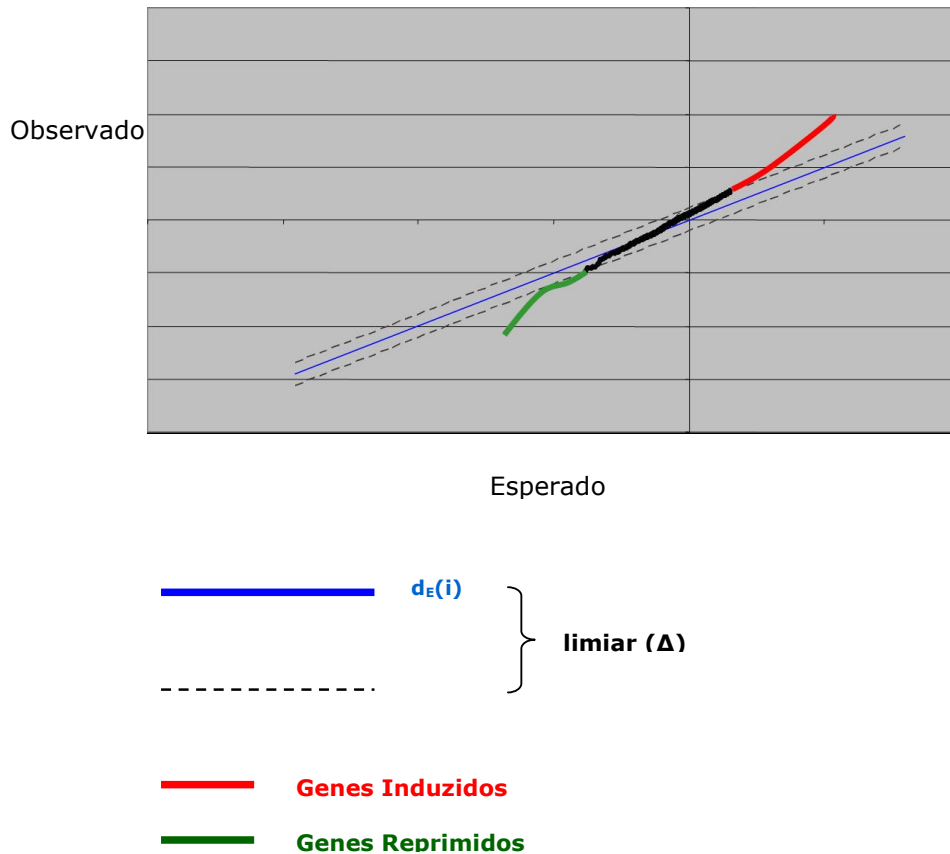


FIGURA 5: Gráfico de dispersão mostrado pelo Programa SAM. Visualização do gráfico de dispersão caracterizando a $d_E(i)$, o limiar (Δ) e os valores de genes considerados diferencialmente expressos. OBS.: Figura ilustrativa. Não corresponde às imagens reais do trabalho.

4.16) NOMENCLATURA DOS GENES

Em função da dificuldade de traduzir corretamente para o português o nome de todos os genes citados neste trabalho, optou-se por utilizar o nome dos genes em inglês, com a mesma grafia utilizada no arquivo do banco de dados da biblioteca IMAGE.

5) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1) PREPARAÇÃO DOS *MICROARRAYS*

Biblioteca de cDNA de timo de camundongo - 9000 clones

Seleção dos 624 clones de interesse

Montagem das placas com os clones de interesse

Realização de 2 PCR por clone

Purificação das amostras

Controle de qualidade em gel de agarose

Secagem dos produtos de PCR e ressuspensão em DMSO (50%)

Organização das placas 384 poços do robô

Spotting: preparação dos microarrays

Tratamento das membranas

Pré-hibridação das membranas

Marcação com oligo-vetor

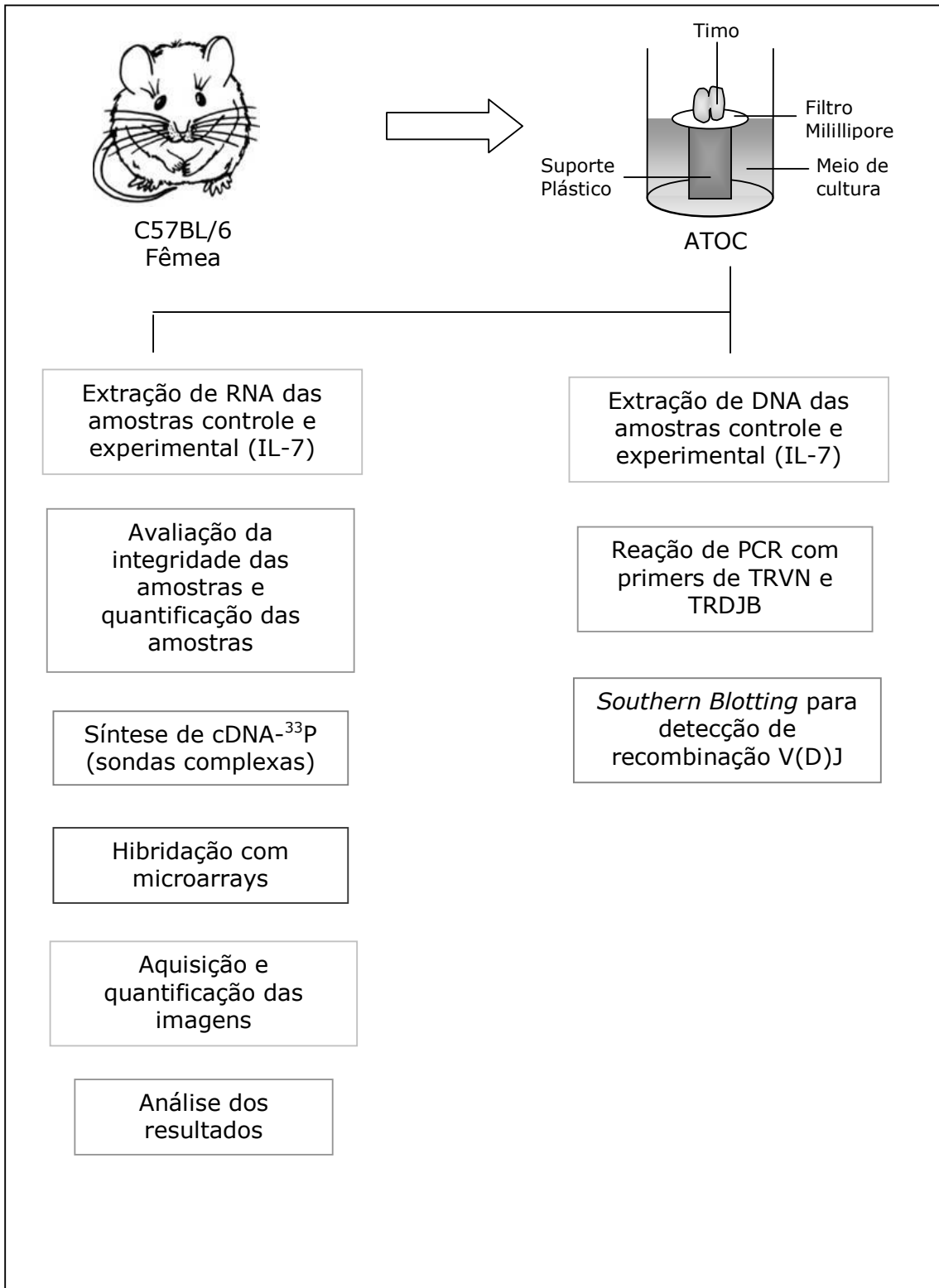
Lavagem e exposição das membranas (72h)

Revelação das imagens

Lavagem das membranas para retirada do oligo-vetor

Membranas prontas para receberem as sondas complexas

5.2) CULTURA E EXTRAÇÃO DE DNA E RNA



6) RESULTADOS

6.1) AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA

As amostras de RNA total obtidas de ATOC controle e tratadas com diferentes concentrações de IL-7 foram analisadas em relação à sua integridade por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% (Figura 6). É possível observar os rRNA 28S e 18S na proporção próxima de 2:1, comprovando assim, a integridade e a qualidade da preparação. Este é um controle de qualidade obrigatório e adotado para avaliar todas as preparações utilizadas neste trabalho.

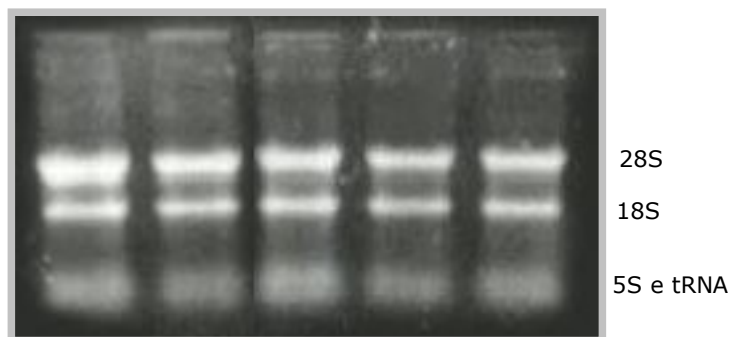


FIGURA 6: Integridade das amostras de RNA. Eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% das amostras de RNA total (2 μ g) provenientes de ATOC.

6.2) ENSAIO DE RECOMBINAÇÃO V(D)J DE TRVB8.1

Para avaliar se IL-7 poderia modular a taxa de recombinação V(D)J, foi realizado um ensaio de recombinação V(D)J de TRVB8.1 (Figura 7). As intensidades de emissão de radioatividade de cada uma das bandas correspondentes ao TRVB8.1 recombinado foram mensuradas pelo programa Opti Quant[®] (Packard Instruments, EUA). A média dos valores quantitativos das amostras de ATOC controle (sem IL-7) foi considerada igual a 1,0 e calculou-se as diferenças relativas para as culturas experimentais na presença de IL-7. A figura 6 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose (7A) e da hibridação *Southern-blot* (7B) para detecção da recombinação V(D)J de TRVB8.1. A figura 8 mostra que o tratamento com IL-7 não modulou de maneira significativa, mesmo nas diferentes concentrações, a recombinação V(D)J de TRVB8.1.

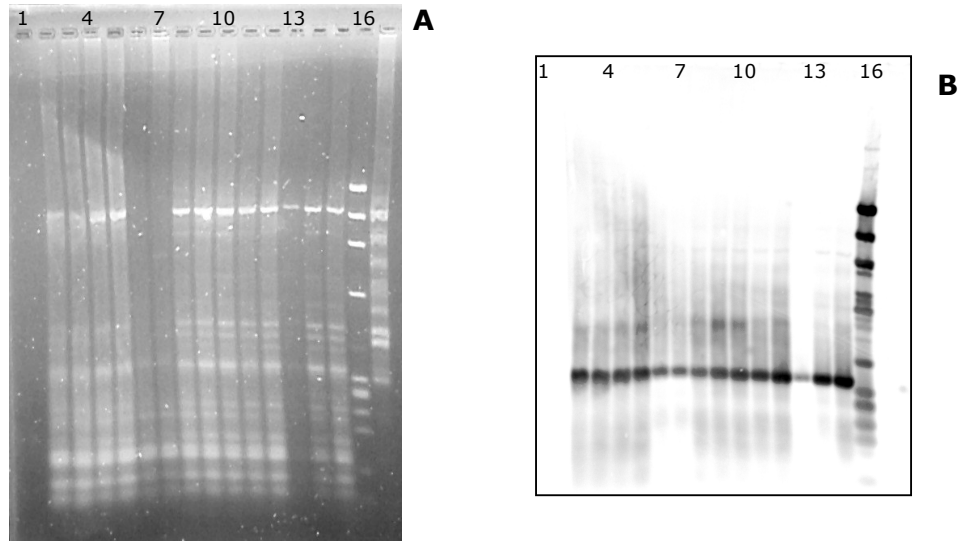


FIGURA 7: Southern Blotting mostrando a recombinação V(D)J. **A)** Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2,2%. **B)** Imagem obtida pelo leitor de fósforo após hibridação com a sonda radioativa. Para as figuras A e B: 1) Branco; 2-4) ATOC controle; 5-7) ATOC 0,1ng de IL-7/mL de meio; 8-10) ATOC 1,0ng de IL-7/mL de meio; 11-15) ATOC 10ng de IL-7/mL de meio; 17) Fibroblasto A31.

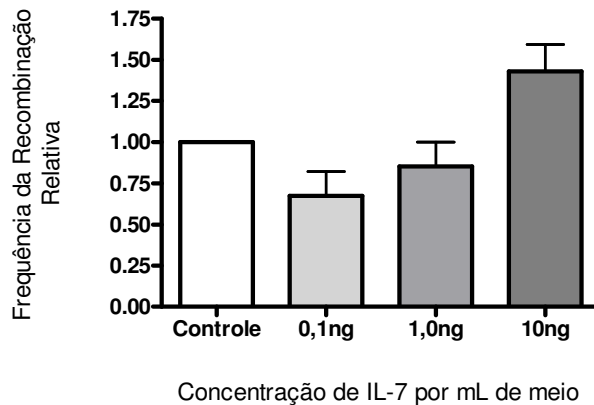


FIGURA 8: Frequência relativa de recombinação V(D)J de TRVB8.1 em culturas ATOC tratadas com IL-7.

6.3) SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES DA BIBLIOTECA IMAGE MURINA

Por meio da consulta dos arquivos de computador referentes aos clones da biblioteca de cDNA do nosso laboratório (MTB IMAGE Murina e IMAGE Humana), foi realizada uma seleção de 624 clones de cDNA cujas seqüências são relativas a

genes de interesse para este trabalho. Os clones humanos selecionados apresentaram identidade maior ou igual a 80% com seqüências dos mesmos genes de camunodongo. Além disso, clones do consórcio RZPD foram adquiridos pelo Prof. Dr. Geraldo Passos e Prof. Dr. Célio Lopes Silva e incluídos nesta seleção.

Os genes foram selecionados de acordo com sua função biológica conhecida (SOURCE), procurando cobrir o maior número possível de genes relacionados ao sistema imune. Além de EST, também estão presentes alguns genes relacionados à recombinação V(D)J e à metilação do DNA, eventos biológicos nos quais a IL-7 pode influenciar. No anexo A, está presente uma lista com nome, clone ID e função de todos os 624 clones utilizados nesse trabalho.

A primeira etapa para a construção dos *microarrays* consistiu na amplificação dos insertos de cDNA (biblioteca IMAGE) por PCR diretamente dos clones bacterianos em cultura. Na amplificação dos 624 clones selecionados, 83% apresentaram amplificação adequada, 11% apresentaram amplificação inespecífica e 6% não amplificaram (Figura 9). Na figura 10, pode ser visualizada a qualidade da amplificação e purificação de alguns clones de cDNA da biblioteca IMAGE.

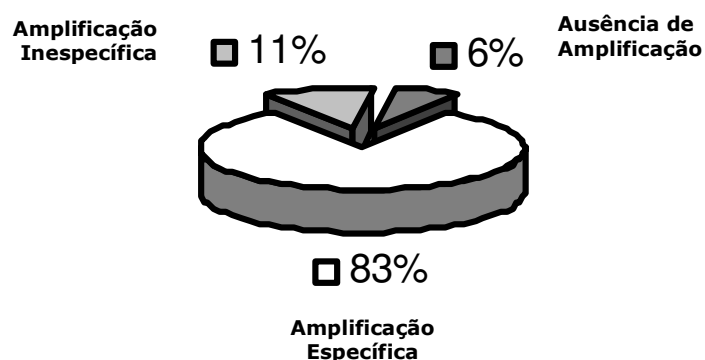


FIGURA 9: Eficiência da amplificação dos clones de cDNA. Representação gráfica da eficiência das amplificações por PCR dos clones de cDNA utilizados para confecção da membrana de *microarray*.

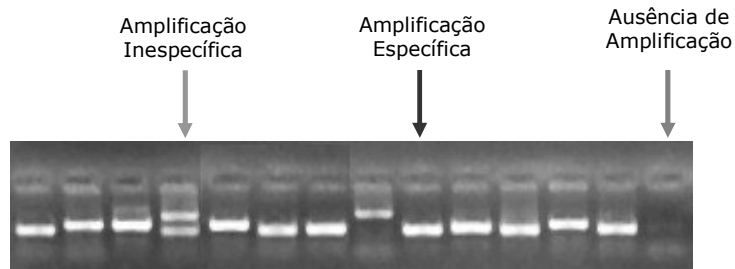


FIGURA 10: Avaliação da amplificação dos clones de cDNA. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de clones da seleção de cDNA da biblioteca IMAGE. Em destaque, clones cuja amplificação foi inespecífica, específica ou ausente.

6.4) IMAGENS DAS HIBRIDAÇÕES COM OLIGO-VETOR

Após a hibridação dos *microarrays* com oligonucleotídeos marcados com ^{33}P , imagens de 15 membranas foram geradas. Os clones foram depositados em duplicata de forma que, como visualizado na figura 11, a coluna à esquerda é a cópia exata da coluna à direita. Devido à falha de deposição por uma das agulhas da cabeça de impressão do robô (área branca), os clones que seriam depositados por essa agulha foram transferidos para uma nova placa e foram depositados na sexta linha presente nas quatro primeiras fileiras (como pode ser observado, as demais fileiras – 5 a 12 – só apresentam 5 linhas). Como controle para a marcação com oligo-vetor, pode ser observado na primeira linha que somente o ponto central, contendo clones com inserto de poli A, foi marcado.

6.5) IMAGENS DAS HIBRIDAÇÕES COM SONDA COMPLEXA

Após a hibridação dos *microarrays* com as sondas complexas de cDNA marcadas com ^{33}P , gerou-se 15 imagens, sendo 4 imagens de 4 experimentos ($4 \times 2 = 8$, pois cada ponto está em duplicata) independentes para um mesmo tratamento, exceto para o tratamento com 0,1ng de IL-7, para o qual 3 experimentos ($3 \times 2 = 6$, pois cada ponto está em duplicata) foram aproveitados (Figura 12). Como controle para marcação com a sonda complexa, pode ser observado na primeira linha de cada bloco a marcação da diluição seriada de DNA genômico.

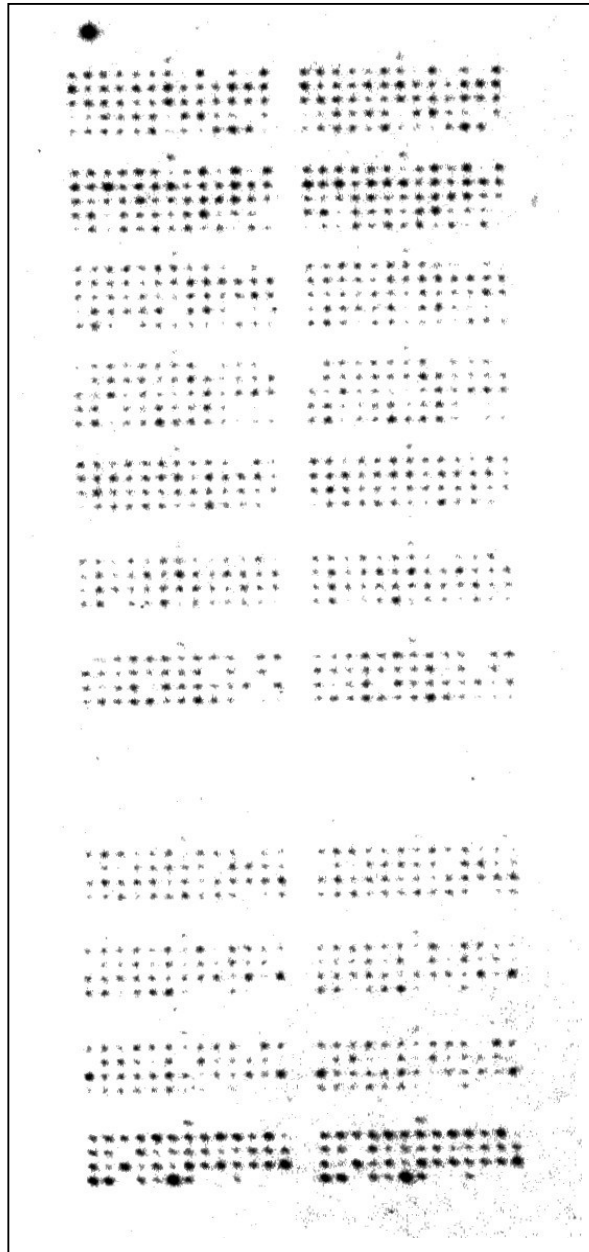


FIGURA 11: Hibridação do *microarray* com oligo-vetor. Imagem ilustrativa de um *microarray* em *nylon* hibridado com oligo-vetor (1AS) radioativo.

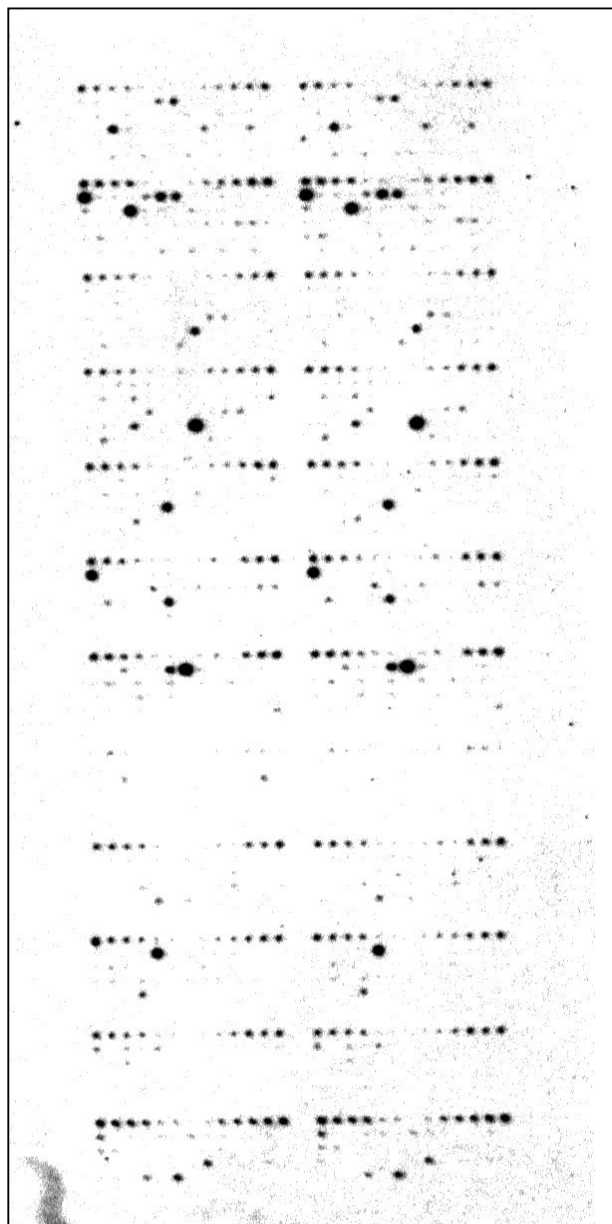


FIGURA 12: Híbridação do *microarray* com sonda complexa. Imagem ilustrativa de *microarray* em *nylon* hibridado com sonda complexa de cDNA radioativas preparadas de a partir de RNA total de c elulas de ATOC .

6.6) ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO

Os 624 valores numéricos quantitativos já normalizados de cada uma das variáveis estudadas foram analisados pelo programa de agrupamento hierárquico *Cluster and TreeView*. Como este programa só analisa os valores que apareceram em, pelo menos, 80% dos experimentos, ocorre uma redução no número de seqüências analisadas. Assim, para o tratamento com 0,1ng de IL-7 foram obtidos dados de expressão gênica de 104 seqüências (Figura 13), para 1,0ng, 65 seqüências (Figura 14) e para 10ng, 43 seqüências (Figura 15).

Como pode ser observado nas ilustrações das figuras 13 a 15, para todos as concentrações de IL-7 utilizadas, houve repressão da expressão dos genes analisados. Além disso, à exceção da amostra 3 do tratamento com 1ng de IL-7 por mL, houve uma separação bem distinta entre o grupo tratado e o controle (não-tratado). As seqüências dentro das chaves foram selecionadas para discussão devido às suas respectivas funções ainda mais associadas ao fenômeno biológico estudado, além de apresentarem correlação de Pearson menor que 0,85 entre elas.

6.7) ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES

Os mesmos 624 valores numéricos foram analisados pelo programa SAM. Este tipo de análise nos permitiu apontar seqüências diferencialmente expressas segundo um valor de exclusão, a partir do qual os genes podem ser considerados como induzidos (I) ou reprimidos (R). Além disso, o programa SAM fornece o FDR, bem como o *q value* para cada seqüência, o que nos orienta na escolha de seqüências com valores de expressão com alta significância estatística. Os resultados obtidos pelo SAM também indicaram a repressão de todos os genes analisados após tratamento de ATOC com IL-7 (Tabelas 4 a 6).

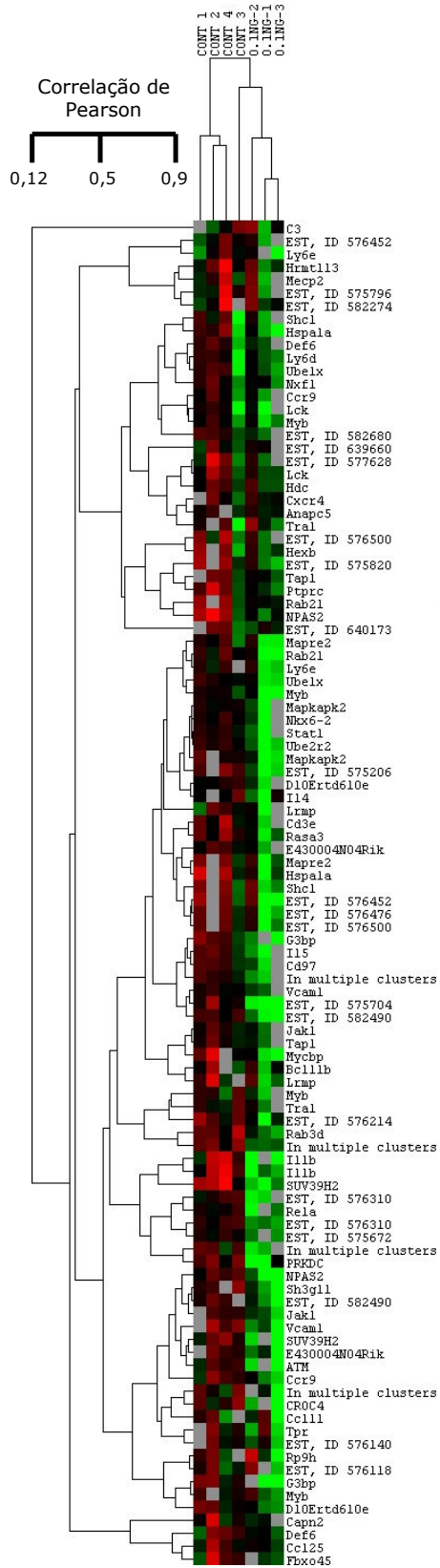


FIGURA 13: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não-tratada e tratada com 0,1ng de IL-7/mL. Matriz de expressão de 104 sequências gênicas de células de ATOC não tratadas (controle) ou tratadas com IL-7 na concentração de 0,1ng/mL de meio durante 24h. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho indica indução da expressão, o verde, repressão e o preto, ausência de modulação. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão. O cinza indica ausência de valores.

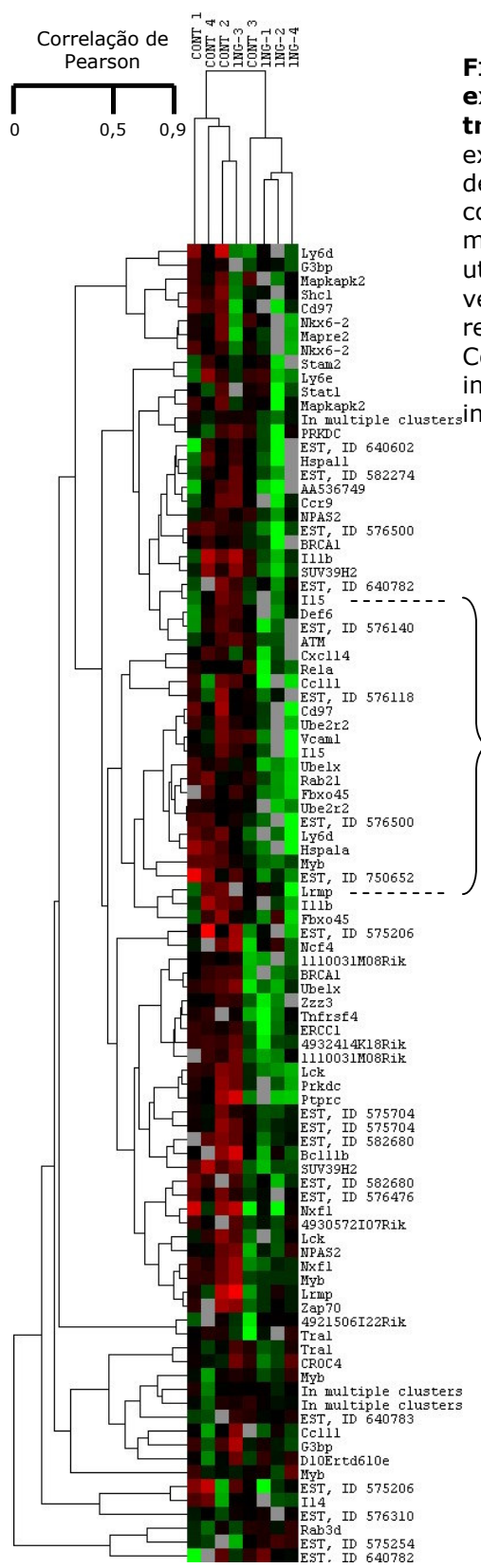


FIGURA 14: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não-tratada e tratada com 1,0ng de IL-7/mL. Matriz de expressão de 65 sequências gênicas de células de ATOC não tratadas (controle) ou tratadas com IL-7 na concentração de 1,0ng/mL de meio durante 24h. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho indica indução da expressão, o verde, repressão e o preto, ausência de modulação. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão. O cinza indica ausência de valores.

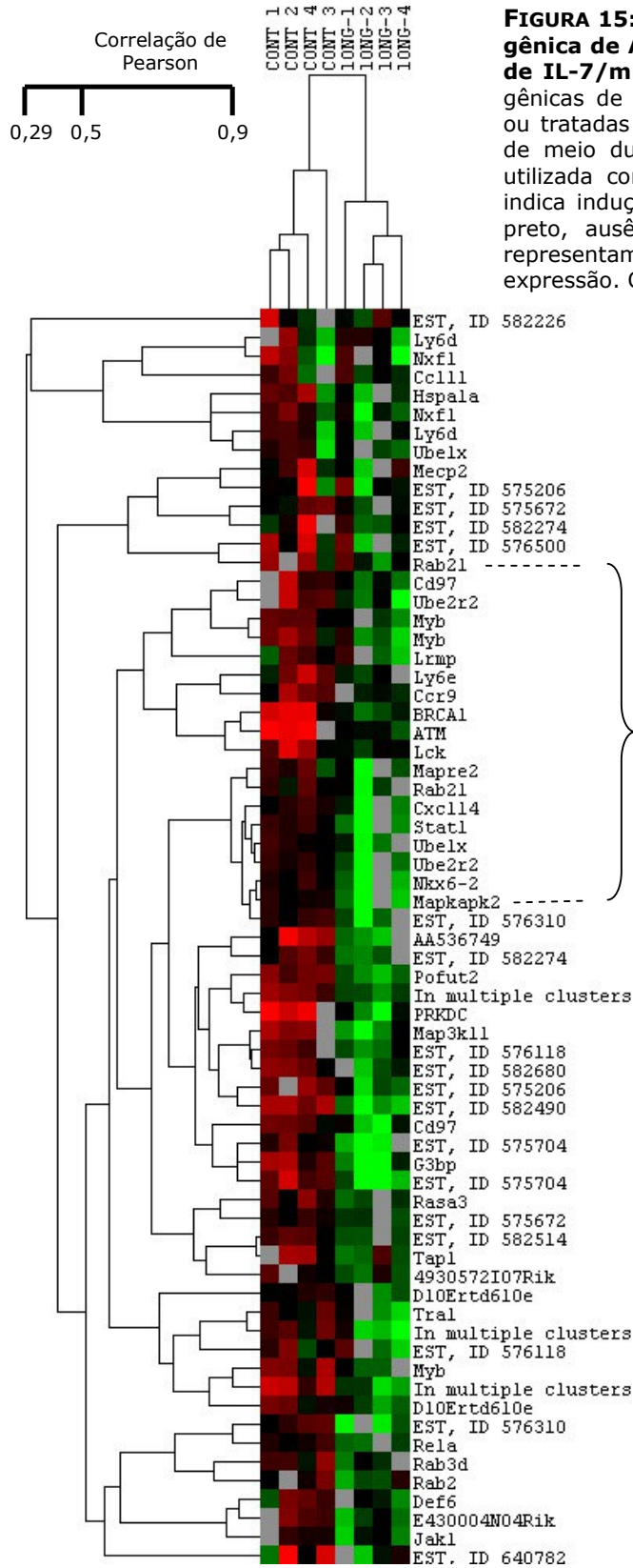


FIGURA 15: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC não-tratada e tratada com 10ng de IL-7/mL. Matriz de expressão de 43 seqüências gênicas de células de ATOC não tratadas (controle) ou tratadas com IL-7 na concentração de 10ng/mL de meio durante 24h. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho indica indução da expressão, o verde, repressão e o preto, ausência de modulação. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão. O cinza indica ausência de valores.

TABELA 4: Genes diferencialmente expressos (44) de acordo com o programa SAM em ATOC tratadas com **0,1ng/mL** de IL-7.

Gene Symbol	Clone ID	Fold Change	q-value (%)
4932414K18Rik	576636	-3,76491849	0,681818182
ATM	1877532	-5,079494082	0,681818182
Cd97	573301	-3,116429818	0,681818182
Cd97	573301	-3,002642325	0,681818182
CROC4	43771	-5,125313925	0,681818182
Cxcl14	583442	-2,484286885	0,681818182
D10Ert610e	576334	-2,502439879	0,681818182
ERCC1	1585120	-4,498830304	0,681818182
Hspa1a	582093	-3,373250126	0,681818182
Hspa1a	582093	-2,779553604	0,681818182
Igbp1	576264	-4,620645042	0,681818182
Il1b	3989461	-9,139932365	0,681818182
Il1b	3989461	-7,05716302	0,681818182
Il5	972705	-5,315190815	0,681818182
Il5	972705	-3,186540055	0,681818182
In multiple cluster	575728	-4,029983074	0,681818182
In multiple cluster	575368	-3,942906711	0,681818182
In multiple cluster	575368	-4,832785618	0,681818182
In multiple cluster	575728	-3,251292389	0,681818182
Lck	577700	-2,160060482	0,681818182
Mapkapk2	572979	-3,491010648	0,681818182
Mapkapk2	572979	-3,106168851	0,681818182
MRE11A	2298639	-2,408361832	0,681818182
Myb	576095	-2,354270647	0,681818182
NPAS2	161998	-6,788866259	0,681818182
NPAS2	161998	-3,619516433	0,681818182
Pofut2	575950	-6,841349114	0,681818182
Rasa3	582174	-2,740702168	0,681818182
Stat1	583302	-3,8837968	0,681818182
Stat1	583302	-2,686799753	0,681818182
SUV39H2	1743667	-8,510638298	0,681818182
SUV39H2	1743667	-10,16260163	0,681818182
Tnfrsf4	573690	-2,829494652	0,681818182
Transcribed locus	575206	-4,454342984	0,681818182
Ube1x	575553	-2,243158367	0,681818182
Ube2r2	582562	-3,973457305	0,681818182
	582490	-4,706768333	0,681818182
	575704	-12,96344309	0,681818182
	576310	-5,303070478	0,681818182
	575704	-4,854368932	0,681818182
	576310	-3,184814803	0,681818182
	576500	-2,074172405	0,681818182

False Discovery Rate (FDR): 0,68182%

TABELA 5: Genes diferencialmente expressos (43) de acordo com o programa SAM em ATOC tratadas com **10ng/mL** de IL-7.

Gene Symbol	Clone ID	Fold Change	q-value (%)
2310006J04Rik	576620	-4,96845034	0,184911243
Al449533	577432	-5,206435154	0,184911243
ATM	1877532	-5,743825388	0,184911243
Ccr9	573572	-3,649368659	0,184911243
Cd24a	576831	-4,067189978	0,184911243
Csnk1d	573689	-2,370510845	0,184911243
Csnk1d	573689	-5,244663555	0,184911243
Cxcl14	583442	-2,736352442	0,184911243
D10Ert610e	576334	-2,148089275	0,184911243
E430004N04Rik	576548	-2,943687263	0,184911243
E430004N04Rik	576548	-3,003453972	0,184911243
ERCC1	1585120	-8,121497604	0,184911243
Faim	582435	-3,799680827	0,184911243
Hdc	576094	-6,346385733	0,184911243
Igfbp1	576264	-3,490279571	0,184911243
Ii5	972705	-6,231694398	0,184911243
In multiple clusters	575368	-3,982318506	0,184911243
Jak1	639840	-3,283101875	0,184911243
Lck	577700	-3,488088179	0,184911243
Map3k11	575211	-5,45464463	0,184911243
Mapkapk2	572979	-4,392901072	0,184911243
Myb	575702	-4,534324839	0,184911243
Myb	576095	-2,927657581	0,184911243
Nkx6-2	576409	-3,765627354	0,184911243
PRKDC	1613637	-7,041757623	0,184911243
Prkdc	1345935	-3,824384274	0,184911243
Rasa3	582174	-2,821590813	0,184911243
Rela	574694	-2,229704118	0,184911243
Stat1	583302	-4,144218815	0,184911243
Tagap	577858	-2,881512218	0,184911243
Tap1	576775	-3,417518198	0,184911243
Transcribed locus	575206	-3,241280954	0,184911243
Transcribed locus	575254	-1,948444167	0,184911243
Ube1x	575553	-2,848840522	0,184911243
Ube2r2	582562	-3,41052488	0,184911243
	576310	-5,295768681	0,184911243
	576310	-3,434065934	0,184911243
	575704	-5,958410296	0,184911243
	576118	-2,911377664	0,184911243
	582274	-2,976279056	0,184911243
	750652	-6,706458319	0,184911243
	575804	-2,382994948	0,184911243
	581675	-4,104079455	0,184911243

False Discovery Rate (FDR): 0,22361%

TABELA 6: Genes diferencialmente expressos (50) de acordo com o programa SAM de ATOC tratadas com **1,0ng/mL** de IL-7.

Gene Symbol	Clone ID	Fold Change	q-value (%)
1110031M08Rik	576590	-1,534542553	8,799675588
4932414K18Rik	576636	-1,471129092	10,2853351
Btg1	574654	-2,12165574	4,310045186
Cd3e	576441	-1,948520099	7,758081335
Cd97	573301	-3,062974761	4,310045186
Cd97	573301	-2,767936227	4,310045186
Cxcl10	581882	-1,820465675	7,758081335
Cxcl14	583442	-2,232990197	7,758081335
E430004N04Rik	576548	-1,721525961	10,2853351
ERCC1	1585120	-1,4910685	11,31386861
Faim	582435	-2,061728141	7,758081335
Fbxo45	576020	-2,065006402	7,758081335
Hspa1a	582093	-3,617028972	4,310045186
Hspa1a	582093	-2,517559981	4,310045186
Il5	972705	-1,952095575	4,310045186
In multiple clusters	574242	-3,030945958	10,2853351
In multiple clusters	575368	-1,377676136	11,31386861
Jak1	639840	-1,689160656	10,2853351
Lck	577700	-1,818148761	7,758081335
Ly6d	581909	-2,385382377	7,758081335
Ly6d	581909	-2,525698987	10,2853351
Map3k11	575211	-1,711947683	12,67153285
Mapkapk2	572979	-2,053050834	4,310045186
Mapre2	572898	-3,156964263	4,310045186
Mapre2	572898	-1,969783521	7,758081335
MRE11A	2298639	-2,66730682	7,758081335
Myb	576095	-2,296422174	4,310045186
Nkx6-2	576409	-2,809462269	4,310045186
Nkx6-2	576409	-2,714956696	4,310045186
NPAS2	161998	-1,603694913	4,310045186
Rab21	577450	-2,596458431	7,758081335
Rasa3	582174	-1,746358842	7,758081335
Rela	574694	-2,102342009	11,31386861
Rela	574694	-1,704448611	12,67153285
Shc1	574066	-2,165580267	4,310045186
Stat1	583302	-1,524227598	11,31386861
SUV39H2	1743667	-1,815573994	10,2853351
Tap1	576775	-1,904979617	7,758081335
Transcribed locus	575206	-2,076627557	9,784967449
Ube1x	575553	-2,879520848	4,310045186
Ube2r2	582562	-2,07288255	4,310045186
Ube2r2	582562	-1,942539676	4,310045186
Vcam1	576563	-2,2427056	4,310045186
	576500	-2,306432641	4,310045186
	576500	-2,425241918	4,310045186
	750652	-2,316316131	4,310045186
	575804	-1,885725061	10,2853351

False Discovery Rate (FDR): 12,67153%

Os dados obtidos a partir das análises de *microarrays*, que sugerem repressão dos genes estudados em ATOC tratadas com IL-7, foram confirmados por *Northern Blotting*. O gene escolhido foi Stat1. A figura 16 mostra que a repressão gênica também foi verificada nesse ensaio.

Análise da Expressão de mRNA de STAT1 em ATOC

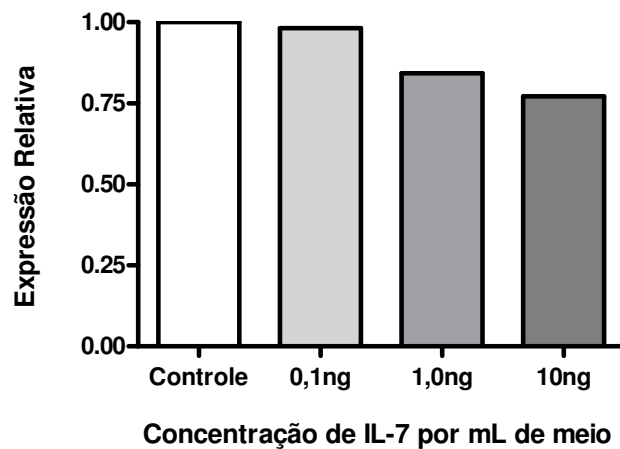


FIGURA 16: Análise da expressão do mRNA do gene Stat1 por *Northern Blotting*. Representação gráfica dos valores relativos obtidos na hibridação.

7) DISCUSSÃO

Os experimentos realizados em escala genômica objetivam avaliar os processos biológicos como um todo, mas com precisão molecular. Usando a tecnologia dos cDNA *microarrays*, a expressão dos mRNA de milhares de genes pode ser mensurada simultaneamente. O uso da bioinformática na análise da expressão gênica revela uma profunda lógica molecular e biológica no entendimento da ativação e diferenciação celular. Genes que codificam componentes de um mesmo complexo multi-proteico estão sob regulação coordenada. Esta regulação coordenada é também observada entre genes que apresentam seus produtos funcionais participando de um mesmo processo biológico (STAUDT and BROWN, 2000).

Estudos recentes que realizaram a análise do perfil da expressão gênica no sistema imune mostraram que a diferenciação, bem como a ativação de linfócitos, são acompanhadas por mudanças paralelas de centenas de genes. A tecnologia dos cDNA *microarrays* também pode ser muito útil no estudo das vias de transdução de sinais induzidas por citocinas, que necessitam ser finamente reguladas para evitar conseqüências deletérias. Partindo desses conceitos, neste trabalho foi aplicada a tecnologia dos cDNA *microarrays* para avaliar o perfil da expressão gênica de culturas de timos adultos (ATOC) tratados com IL-7.

A fina coordenação dos níveis do receptor de IL-7 com o estágio de maturação de timócitos sugere fortemente que a sinalização promovida pela ligação dessa citocina é necessária para o desenvolvimento normal dessas células (MUNITIC et al., 2004). A IL-7 é produzida principalmente por células estromais tímicas e concentrações efetivas são alcançadas apenas localmente, talvez pela retenção desta citocina por glicosaminoglicanas da matriz extracelular (FRY and MACKALL, 2002). Portanto, no timo normal, a exposição de timócitos à IL-7 deve ser controlada não só em relação à quantidade de citocina produzida, mas também na localização "geográfica" de produção da mesma (EL KASSAR et al., 2004).

No sistema-modelo utilizado neste trabalho, fez-se tratamento de timos adultos, em culturas ATOC, com IL-7 exógena. Este tipo de tratameto foi realizado com o intuito de avaliar se esta citocina exógena poderia atuar na diferenciação de linfócitos T de timo adulto. Por este motivo, foi avaliada a recombinação V(D)J de TRVB8.1 como indicativo da maturação destas células.

Foi observado que a IL-7 exógena não promoveu de maneira significativa a recombinação V(D)J de TRVB8.1 (Figura 7). O fato de a IL-7 favorecer principalmente a recombinação V(D)J dos loci γ e δ (MOORE et al., 1996) pode explicar a ausência de um aumento estatisticamente significativo na taxa de recombinação de TCRV β 8.1 nas culturas que sofreram tratamentos com diferentes concentrações de IL-7 (0,1; 1,0 e 10ng/mL).

Considerando resultados recentes, que mostraram que a IL-7 mantém o desenvolvimento de células T fetais imaturas, mas inibe o desenvolvimento de células T maduras (DELUCA and CLARK, 2002), pode-se explicar esses achados. Por outro lado, a IL-7 exógena pode ter alterado o equilíbrio intratímico provavelmente aumentando sua ação sinérgica com outras citocinas. Essa situação teria resultado na diminuição de clones de células T (TRVB8.1 positivas) (por apoptose?) ou na inibição do mecanismo molecular de recombinação V(D)J de TRV8.1 (?). Essas duas hipóteses podem ser levantadas com base em nossos resultados, os quais precisam ser testados em futuros trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Com relação à expressão gênica das células tímicas tratadas com IL-7 em ATOC, os resultados das análises dos dados obtidos com *microarrays* também mostraram que a IL-7 exógena exerceu um efeito regulatório negativo sobre a expressão gênica, ou seja, reprimiu os genes analisados. Tanto os resultados obtidos pelo programa SAM (Tabelas 4, 5 e 6), quanto aqueles obtidos pelo *Cluster and TreeView* (Figuras 13, 14 e 15) mostraram inibição da expressão gênica. É interessante observar a confirmação dos dados por meio de dois programas de análise que utilizam bases de cálculo diferentes e que, mesmo assim, mostraram concordância dos resultados.

No programa *Cluster*, para as 3 concentrações de IL-7, as amostras tratadas foram agrupadas separadamente das amostras controle (Figuras 13, 14 e 15). Isso indica um perfil de expressão gênica distinto após tratamento com a IL-7. A única exceção foi a amostra número 3 do tratamento com 1ng de IL-7 (Figura 14). Quando todas as situações experimentais são analisadas conjuntamente pelo programa *Cluster and TreeView* (Figura 17), observa-se novamente que há um agrupamento distinto entre as amostras tratadas e as controle (exceção para a mesma amostra mencionada anteriormente), embora não haja agrupamento diferencial para as diferentes concentrações de IL-7 utilizadas.

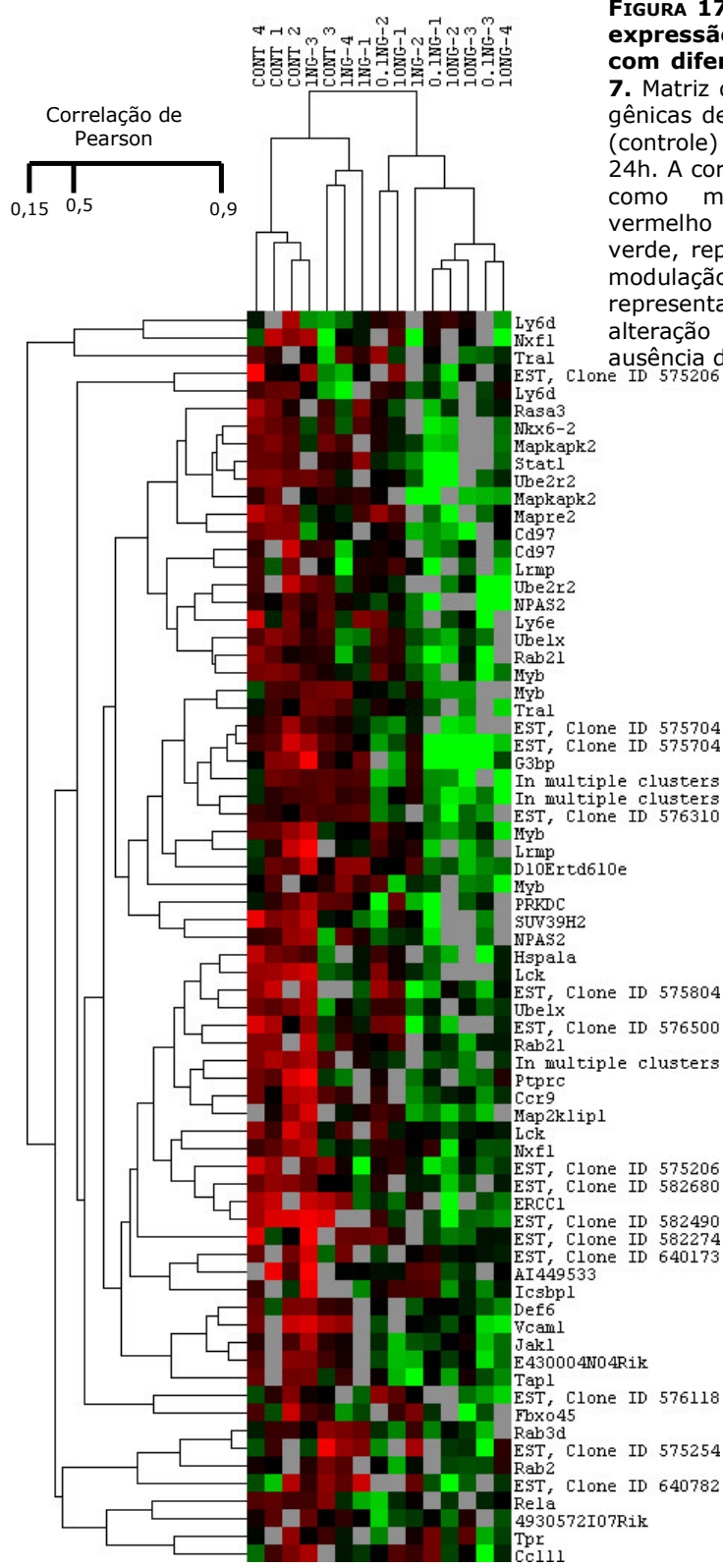


FIGURA 17: Comparação dos perfis de expressão gênica de ATOC tratadas com diferentes concentrações de IL-7. Matriz de expressão de 43 sequências gênicas de células não tratadas (controle) ou tratadas com IL-7 durante 24h. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho indica indução da expressão, o verde, repressão e o preto, ausência de modulação. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão. O cinza indica ausência de valores.

Isso sugere que o tratamento com a IL-7 promove a repressão dos genes analisados após 24h de cultura independente da concentração da citocina (0,1; 1,0 ou 10ng/mL). A maioria dos genes é comum nos resultados dos dois tipos de análises de dados. Adicionalmente, os FDR obtido pelo programa SAM foram baixos, o que mostra boa confiabilidade estatística dos dados (Tabelas 4 a 6).

Para compor a discussão deste trabalho, foram selecionados genes cuja expressão reprimida foi apontada por, pelo menos, um dos programas em todas as situações experimentais. Considerou-se, então, que estes genes foram diretamente modulados pela IL-7 exógena (Figura 18).

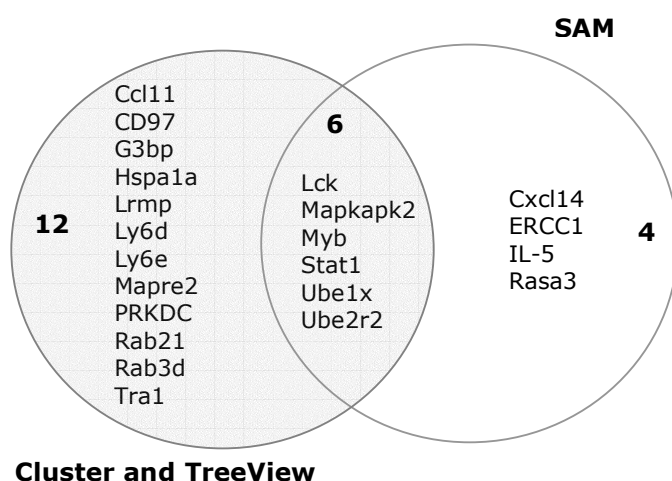


FIGURA 18: Diagrama de Venn: Genes escolhidos para compor a discussão desse trabalho. Genes diferencialmente expressos nas três situações experimentais segundo os programas SAM e *Cluster and TreeView* e a respectiva intersecção.

É interessante notar que a maioria dos genes que foram apontados como reprimidos tanto pelo SAM quanto pelo *Cluster and TreeView* nas 3 situações experimentais estão agrupados bem próximos nos *heat map* (Chaves das Figuras 13, 14 e 15). Isso indica que, além de estarem reprimidos, esses genes apresentam um perfil de expressão bem semelhante, o que sugere participação em uma mesma via e/ou função comum.

Quando analisados pela classificação de acordo com a ontologia genética (FatiGO - <http://fatigo.bioinfo.cnio.es/>), os genes presentes na figura 18 foram relacionados de acordo com o processo biológico em que participam, ou seja, metabolismo, resposta a estímulos, processo fisiológico celular, comunicação celular, processo de regulação celular e morte. No anexo 2, está presente uma análise mais detalhada sobre a atuação desses genes em processos biológicos.

O *small chemokine (C-C motif) ligand 11 (Ccl11*, acc NM_011330) codifica uma quimiocina secretada para o meio extracelular e que apresenta atividade de eotaxina na periferia. Em resposta à presença de alérgenos, a secreção de Ccl11 promove o acúmulo de eosinófilos, mas não de linfócitos, macrófagos ou neutrófilos. Nesses sítios inflamatórios, essa quimiocina é induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e interferon γ (IFN- γ). Essa quimiocina é expressa constitutivamente no timo e tem expressão induzida no pulmão, intestino, coração, baço e fígado.

O gene *chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (Cxcl14*, acc NM_019568) codifica uma molécula de mesmo nome, também conhecida como BRAK, que tem sido muito estudada em tumores. Sabe-se que essa quimiocina é um potente inibidor de angiogênese altamente expresso em células estromais adjacentes a tumores (SHELLENBERGER et al., 2004), em células infiltrantes (FREDERICK et al., 2000) e nas próprias células tumorais (SCHWARZE et al., 2005). Cxcl14 é altamente expressa na ausência de inflamação nos mais diversos tecidos, como coração, placenta e pâncreas. Além disso, Cxcl14 é um quimioatraente altamente seletivo para monócitos e parece ter uma função mais homeostática do que inflamatória. Como macrófagos colocalizam com fibroblastos produtores de BRAK, acredita-se que essa quimiocina esteja envolvida na geração de macrófagos teciduais (KURTH et al., 2001).

CD97 (acc NM_011925) codifica um dos heterodímeros pertencentes à família de proteínas denominadas fator de crescimento epidermal transmembrana 7 (EGF-TM7) (LEEMANS et al., 2004), que são moléculas de adesão cuja família também é classificada como receptores acoplados à proteína G (WANG et al., 2005). A expressão dessa proteína de membrana ocorre predominantemente em células do sistema imune (HAMANN, 2004). CD97 tem em torno de 75-90kDa (MUSTAFA et al., 2004) e é derivada do processamento de um único polipeptídeo (KWAKKENBOS et al., 2004). Essa proteína possui uma grande região extracelular contendo motivos de adesão acoplados de forma não-covalente a um domínio transmembrana 7 (WANG et al., 2005). A função de CD97 ainda é desconhecida (MUSTAFA et al., 2004) e seus ligantes principais são CD55 e integrina $\alpha 5\beta 1$ (WANG et al., 2005).

A repressão de genes que codificam as quimiocinas Ccl11 e Cxcl14 e a molécula de adesão CD97 em células do timo pode refletir um padrão de migração diferenciado no interior do órgão promovido pelo estímulo com IL-7. Embora não se conheça a função exata dessas moléculas no ambiente intratímico, pode ser que

elas participem da migração de células para diferentes subregiões do órgão. Isso é importante para garantir que células em estágios distintos de desenvolvimento estejam localizadas no microambiente apropriado para continuidade da sua diferenciação e maturação. Como a IL-7 inibe esses dois processos nas células T maduras (DELUCA and CLARK, 2002), nossos achados sugerem que essa inibição se dá por repressão gênica.

A sequência **IL-5** (acc NM_010558) codifica um homodímero de mesmo nome que atua na diferenciação terminal de células B na periferia, levando à produção de anticorpos.

Proteínas da família *member RAS oncogene family* (Rab) são pequenas GTPases que medeiam várias funções de tráfego celular através da sua interação com membranas de diversas organelas. Elas atuam no controle da formação de vesículas e na "entrega" de moléculas internalizadas em diferentes locais dentro da célula. A sequência **Rab21** (acc NM_024454) codifica uma proteína que se encontra associada ao complexo de Golgi e provavelmente está envolvida em estágios iniciais de vias endocíticas (SIMPSON and JONES, 2005). Já a sequência **Rab3d** (acc NM_031874) codifica uma proteína que atua nas vias exocíticas (KNOP et al., 2004; VAN WEEREN et al., 2004; SCHLUTER et al., 2002), regulando um passo tardio de fusão vesicular de vários tipos celulares (NGUYEN et al., 2003), incluindo mastócitos (RIEDEL et al., 2002). Ao contrário das outras isoformas de Rab3, Rab3d tem ampla distribuição em tecidos não-neuronais (MILLAR et al., 2002).

A repressão de moléculas envolvidas no tráfego celular e na regulação de vias exocíticas, como Rab3d, pode indicar que IL-7 interfere na liberação de fatores solúveis. Dentre esses fatores, pode-se citar quimiocinas e citocinas, como IL-5, que também teve a expressão de seu gene reprimida após tratamento com IL-7. A inibição de proteínas de vias endocíticas, como Rab21, poderia refletir também uma alteração na apresentação antigênica via MHC de classe II, que será melhor discutida posteriormente.

O gene *excision repair cross-complementation group 1* (**ERCC-1**, acc NM_007948) codifica uma enzima chave no processo de reparo de excisão de nucleotídeos (ZHOU et al., 2004) e de reparo de ligação entre fitas (PRASHER et al., 2005). Essa proteína, ao formar um heterodímero com a proteína XPF, torna-se uma endonuclease estrutura-específica que possui grande habilidade de reconhecer danos na molécula de DNA (ALTAHA et al., 2004). ERCC-1 está localizada no núcleo da célula.

A sequência *Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide* (**PRKDC**, DNA-PKcs, acc NM_011159) codifica a subunidade catalítica da DNA-PK, enzima responsável pelo reparo eficiente de quebras na dupla-fita de DNA e para sucesso do processo de recombinação V(D)J (MARTENSSON et al., 2003). PRKDC apresenta atividade serina/treonina quinase e deve interagir com nucleotídeos terminais na quebra da dupla-fita de DNA para exercer sua atividade catalítica. A ligação desse complexo enzimático aos nucleotídeos terminais da quebra é imprescindível para o passo de *non-homologous end-joining* (FAIOLA et al., 2003).

A sequência *Heat shock protein 1A* (**Hspa1a**, acc NM_010479), também conhecida como hsp70-3, codifica uma chaperona que está envolvida no reparo de DNA e na resposta a proteínas desnaturadas. Juntamente com outras chaperonas, Hspa1a é capaz de reconhecer proteínas em conformação inativa e promover a estabilização das mesmas evitando a agregação e o levando ao correto enovelamento de polipeptídeos recém-traduzidos. Entretanto, hsp70 também está envolvida em processos de diferenciação e progressão do ciclo celular. Células T transgênicas para hsp70 tem sua diferenciação bloqueada em estágios iniciais do desenvolvimento (LEE et al., 1998). Essa proteína é induzida em timócitos após morte induzida por glicocorticóides (VANMUYLDER and DOUROV, 2000) e após hipertemia, porém, neste último caso, a expressão de hsp70 não levou à indução de apoptose nessas células (BELAY and BROWN, 2003). A repressão deste gene poderá ter consequências inibitórias sobre a progressão da maturação dos linfócitos T.

O gene *MAP kinase-activated protein kinase-2* (**Mapkapk2**, acc NM_008551) codifica uma proteína com atividade serina/treonina e tirosina quinase e parece ser diretamente responsável pela fosforilação de Cdc25B/C, proteína relacionada com respostas a danos no DNA. Dessa forma, Mapkapk2 pode ser considerada um novo membro da família de quinases responsável pelo *checkpoint* de danos no DNA que, juntamente com outras enzimas, integra sinalização em resposta ao dano com a inibição da continuidade do ciclo celular em células de mamíferos (MANKE et al., 2005).

O gene que codifica a molécula *microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2* (**Mapre2**, acc NM_153058) parece ter um importante papel na regulação dinâmica do microtúbulo, na citocinese, em etapas da mitose e na segregação epissomal (SU and QI, 2001).

A repressão de genes que codificam proteínas direta ou indiretamente relacionadas ao ciclo celular, como ERCC-1, PRKDC, Hspa1a, Mapkapk2 e Mapre2, sugere que IL-7 exógena pode atuar em ATOC inibindo o ciclo celular.

A sequência *tumor rejection antigen gp96* (**Tra1**, gp96, acc NM_011631) codifica uma glicoproteína dimérica pertencente à família de chaperonas hsp90 e residente no retículo endoplasmático (THORNE and MCQUADE, 2004). Como esperado, Tra1 facilita a apresentação cruzada de peptídeos antigênicos restritos a MHC de classe I (DOODY et al., 2004). Essa molécula apresenta uma alta expressão no timo (QURASHI and BROWN, 1995; PATCHEV et al., 1994;).

O gene *lymphoid-restricted membrane protein* (**Lrmp**, Jaw-1, acc NM_008511) codifica uma proteína, como o próprio nome diz, restrita a linfócitos e ancorada à membrana do retículo endoplasmático com orientação para o citoplasma (BEHRENS et al., 1996). Foi demonstrado que essa proteína pode eficientemente entregar peptídeos antigênicos (C terminal) a moléculas de classe I em células deficientes de TAP ou com TAP inativado (SNYDER, 1997). A expressão de Jaw-1 é altamente regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento de linfócitos, sendo hiperexpressa em timócitos e apresentando baixa expressão em células T maduras (BEHRENS et al., 1994).

Os genes *ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X* (**Ube1x**, acc NM_009457) e *Ubiquitinating conjugating enzyme E2R2* (**Ube2r2**, acc NM_026275) codificam proteínas que participam do ciclo da ubiquitina, que consiste na adição (ubiquitinação) ou remoção de ubiquitina em uma proteína. Ube1x catalisa a ativação do grupo C terminal da ubiquitina pela adição de ATP e participa da via de catabolismo dependente de ubiquitina, que consiste na destruição de uma proteína ou peptídeo por hidrólise de suas pontes dissulfeto pelo proteassoma, o que é iniciado pela ligação covalente de ubiquitina na proteína-alvo. Já a Ube2r2 é responsável pela ligação da ubiquitina a resíduos de lisina da proteína-alvo. A via de degradação protéica envolvendo ubiquitina está intimamente relacionada ao processamento antigênico para apresentação via MHC de classe I.

A expressão reprimida de genes envolvidos na degradação de proteínas e, conseqüentemente, na apresentação de antígenos é exemplo de outra via modificada pelo tratamento com IL-7. Levando-se em conta o fato de que, em cultura, células progenitoras provenientes da medula óssea não mais adentram o timo para iniciar seu processo de maturação; talvez essa inibição da expressão de genes de processamento reflita uma mudança no microambiente que poderia indicar a ausência de células em estágios iniciais de maturação. Como conseqüência

a exigência de apresentação de antígenos via MHC de classe I e de classe II (repressão de Rab21, envolvido em vias endocíticas) por células dendríticas e macrófagos tímicos seria menor.

As moléculas pertencentes a uma família denominada Ly6 são glicoproteínas ricas em cisteína com peso molecular de aproximadamente 15kDa e ancoradas à membrana celular por um domínio de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Elas apresentam expressão diferencial em várias linhagens de células hematopoiéticas e acredita-se que estejam envolvidas em interações celulares e na transdução de sinais (APOSTOLOPOULOS, MCKENZIE and SANDRIN, 2000; BRAKENHOFF et al., 1997; MAO et al., 1996). O gene *lymphocyte antigen 6 complex, locus D* (**Ly6d**, acc NM_010742) codifica uma proteína que é expressa exclusivamente em timócitos e células B do baço e parece estar envolvida na ativação celular. Seu único ligante conhecido é uma proteína não glicosilada de 9kDa e de ampla distribuição tecidual denominada Ly6d-L (APOSTOLOPOULOS, MCKENZIE and SANDRIN, 2000). Já a expressão do gene que codifica a proteína *lymphocyte antigen 6 complex, locus E* (**Ly6e**, RIG-E, TSA-1, acc NM_008529) foi detectada em células-tronco e progenitoras e parece ser modulada por fatores de crescimento (GONDA et al., 1993).

A repressão de moléculas de superfície possivelmente envolvidas na transdução de sinais, como Ly6d e Ly6e, pode indicar uma mudança na responsividade celular a fatores solúveis ou a ligantes expressos na superfície de outras células.

O gene *lymphocyte protein tyrosine kinase* (**Lck**, p56, acc NM_010693) codifica uma proteína associada ao domínio citoplasmático das moléculas CD4 e CD8 que possui atividade tirosina quinase. Desde sua descoberta em 1982, Lck é considerada a enzima chave tanto para a maturação de timócitos quanto para ativação e proliferação de linfócitos T periféricos (ROUER, 2004). No timo, parece estar associada ao comprometimento de progenitores com a linhagem T (SHIMIZU et al., 2001) e sua expressão é regulada ao nível pós-transcricional no estágio de desenvolvimento em que ocorre a expressão do pré-TCR (BUCKLAND et al., 2000). Estudos demonstram que Lck regula a sinalização via TCR. A expressão da forma dominante negativa de Lck em timócitos DP inibe a seleção positiva e a expressão constitutivamente ativada dessa proteína acelera a passagem de timócitos de estágio DP para SP mesmo na ausência de sinalização via TCR (SOHN et al., 2001).

Signal transducer and activator of transcription 1 (**Stat1**, acc NM_009283) codifica o fator descrito como participante de uma via importante na transdução de

sinal mediado por citocinas, bem como no crescimento, diferenciação e morte de células. No timo humano, Stat1 é altamente expresso nos corpúsculos de Hassall e parece estar envolvido na maturação do epitélio tímico medular (NISHIO et al., 2000). Após estímulo, como a ligação de uma citocina ao seu receptor, Stat1 torna-se fosforilado em seus domínios de tirosina e migra para o núcleo, onde se liga em sítios específicos do DNA para induzir a transcrição de genes. É claramente relacionada à resposta ao IFN- γ .

O *myeloblastosis oncogene* (**c-Myb**, acc NM_010848) codifica um ativador transcricional presente no núcleo e capaz de ligar a seqüências específicas da molécula de DNA. Estudos demonstraram que essa molécula é essencial para o desenvolvimento de timócitos no estágio DN3, para sobrevivência e proliferação de timócitos DP, para a diferenciação de timócitos SP, para a resposta proliferativa de células T maduras (LIEU et al., 2004; BENDER et al., 2004) e para o controle da sobrevivência na hematopoiese (TAYLOR, BADIANI and WESTON, 1996). Além disso, parece que c-Myb é um fator crítico para função do *enhancer* do loci TRG, denominado Edelta, que atua no remodelamento da cromatina para conferir acessibilidade à maquinaria da recombinação V(D)J (HERNANDEZ-MUNAIN and KRANGEL, 2002). Foi relatado que a perda da expressão dessa molécula está relacionada ao início da diferenciação terminal em células hematopoiéticas (ESS et al., 1999).

O gene *ras-GTPase-Activating protein SH3-Domain-Binding Protein* (**G3bp**, acc NM_013716) codifica uma proteína relacionada com transdução de sinal e metabolismo do RNA (KENNEDY et al., 2001). Na verdade, G3bp é uma proteína *scaffolding* que interliga transdução de sinal ao metabolismo do RNA. Foi formulada a hipótese que, em coordenação com várias outras proteínas, G3bp está envolvida na regulação pós-transcricional de algumas subpopulações de mRNA (IRVINE et al., 2004). Essa molécula é uma endoribonuclease dependente de fosforilação que interage com RasGAP em células em divisão, nas quais sua localização é citoplasmática (podendo estar ligada à membrana), mas não em células quiescentes (TOURRIERE et al., 2003). G3bp cliva moléculas de RNA exclusivamente entre citosina e guanina após interagir de maneira seqüência-específica com as mesmas (TOURRIERE et al., 2001), principalmente com aquelas que codificam proteínas envolvidas em processos de transcrição, como c-myc (IRVINE et al., 2004). A ação dessa proteína parece estar associada à reunião de grânulos de estresse citoplasmáticos (CANDE et al., 2004; TOURRIERE et al., 2003).

O gene *RAS p21 protein activator 3* (**Rasa3**, GAPIII activator, acc NM_009025) codifica uma molécula que tem peso molecular de aproximadamente 96KDa e é um regulador negativo de Ras, que controla a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares (BABA et al., 1995).

A expressão reprimida de genes que direta (Stat-1, Lck, c-Myb) ou indiretamente (Rasa3, G3bp) alteram vias de sinalização intracelular após tratamento com IL-7 também pode significar um outro nível de controle na alteração da responsividade celular a moléculas presentes no microambiente tímico.

Todas estas explicações são plausíveis mediante o efeito inibitório da IL-7 sobre a expressão gênica global no timo adulto e nossos dados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos genético-moleculares da regulação exercida pela IL-7 em células tímicas. Além disso, este trabalho abre perspectivas para o estudo do efeito dessa citocina em FTOC, pois em células fetais a IL-7 poderá exercer um efeito de ativação da expressão gênica e da diferenciação celular.

8) CONCLUSÕES

- 1) A IL-7 exógena não modificou significativamente a taxa de recombinação V(D)J de TRVB8.1 em ATOC.
- 2) Observou-se alteração no padrão de expressão gênica de timos de camundongos adultos tratados *in vitro* com IL-7 após 24 h de cultura. Todos os genes diferencialmente expressos apresentaram-se reprimidos em relação ao controle.
- 3) Dentre os genes modulados pela IL-7, encontramos os relacionados com ciclo celular, vias de sinalização, processamento de antígenos, reparo de DNA, quimioatraentes e tráfego celular.

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; LITCHMAN, A. and POBER, J. (2000) *Imunologia Celular e Molecular*. W. B. Saunders Company, 4ª edição, capítulo 7.
- AKASHI, K., KONDO, M. and WEISSMAN, I.L. (1998) Two distinct pathways of positive selection for thymocytes. **PNAS** 95:2486–2491.
- ALIZADEH, A.; EISEN, M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. and STAUDT, L.M. (1998) Probing Lymphocyte Biology by Genomic-Scale Gene Expression Analysis. **J Clin Immunol** 18:373-379.
- ALTAHA, R.; LIANG, X.; YU, J.J. and REED, E. (2004) Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. **Int J Mol Med** 14(6):959-70.
- ANDERSON, G. and JENKINSON, E. J. (2001) Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Nat Rev Immunol** 1:31-40.
- ANDERSON, G.; HARE, K.J.; PLATT, N. and JENKINSON, E.J. (1997) Discrimination between maintenance- and differentiation-induced signals during initial and intermediate stages of positive selection. **Eur J Immunol** 27:1838-1842
- APOSTOLOPOULOS, J.; MCKENZIE, I.F. and SANDRIN, M.S. (2000) Ly6d-L, a cell surface ligand for mouse Ly6d. **Immunity** 12(2):223-232.
- APPASAMY, P.M. (1992) IL 7-induced T cell receptor- γ gene expression by pre-T cells in murine fetal liver cultures. **J Immunol** 149:1649–1656.
- APPASAMY, PM, KENNISTON TW JR, WENG Y, HOLT EC, KOST J, CHAMBERS WH. (1993) Interleukin 7-induced expression of specific T cell receptor γ variable region genes in murine fetal liver cultures. **J Exp Med** 178:2201–2206.
- BABA, H.; FUSS, B.; URANO, J.; POULLET, P.; WATSON, J.B.; TAMANOI, F. and MACKLIN, W.B. (1995) GapIII, a new brain-enriched member of the GTPase-activating protein family. **Neurosci Res** 41(6):846-858.
- BANWELL, C.M. (2000) Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development. **Eur J Immunol** 8:2125-2129.
- BEHRENS, T.W.; JAGADEESH, J.; SCHERLE, P.; KEARNS, G.; YEWDELL, J. and STAUDT, L.M. (1994) Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. **J Immunol** 153(2):682-690.
- BEHRENS, T.W.; KEARNS, G.M.; RIVARD, J.J.; BERNSTEIN, H.D.; YEWDELL, J.W. and STAUDT, L.M. (1996) Carboxyl-terminal targeting and novel post-translational processing of JAW1, a lymphoid protein of the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 271(38):23528-23534.
- BELAY, H.T. and BROWN, R. (2003) Spatial analysis of cell death and Hsp70 induction in brain, thymus, and bone marrow of the hyperthermic rat. **Cell Stress Chaperones** 8(4):395-404.
- BENDER, T.P.; KREMER, C.S.; KRAUS, M., BUCH, T. and RAJEWSKY, K. (2004) Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. **Nat Immunol** 5(7):721-9.

- BENJAMINI, Y. and HOCHBERG, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc B** 57:289-300.
- BLACKBURN, C.C. and MANLEY, N.R. (2004) Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nat Rev Immunol** 4:278-289.
- BRAKENHOFF, R.H.; VAN DIJK, M.; ROOD-KNIPPES, E.M. and SNOW, G.B. (1997) A gain of novel tissue specificity in the human Ly-6 gene E48. **J Immunol** 159(10):4879-4886.
- BRAZMA, A. and VILO, J. (2001) Gene expression data analysis. **Microbes and Infection** 10:823-829.
- BRYANT, P.A.; VENTER, D.; ROBINS-BROWNE, R. and CURTIS, N. (2004) Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. **Lancet Infect Dis** 4(2):100-111.
- BUCKLAND, J.; PENNINGTON, D.J.; BRUNO, L. and OWEN, M.J. (2000) Co-ordination of the expression of the protein tyrosine kinase p56(lck) with the pre-T cell receptor during thymocyte development. **Eur J Immunol** 30(1):8-18.
- CANDE, C.; VAHSEN, N.; METIVIER, D.; TOURRIERE, H., CHEBLI, K., GARRIDO, C., TAZI, J. and KROEMER, G. (2004) Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. **J Cell Sci** 117(Pt 19):4461-4468.
- CANDEIAS, S.; MUEGGE, K. and DURUM, S.K. (1996) Junctional diversity in signal joints from T cell receptor beta and delta loci via terminal deoxynucleotidyl transferase and exonucleolytic activity. **J Exp Med** 184(5):1919-1926.
- CANDEIAS, S.; MUEGGE, K. and DURUM, S.K. (1997) IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic actions. **Immunity** 6:501-508.
- CARDOSO, R.S.; JUNTA, C.M.; MACEDO, C.; MAGALHÃES, D.A.R.; SILVEIRA, E.L.V.; PAULA, M.O.; MARQUES, M.M.C.; MELLO, S.S.; ZÁRATE-BLADÉS, C.R.; NGUYEN, C.; HOULGATTE, R.; DONADI, E.A.; SAKAMOTO-HOJO, E.T. and PASSOS, G.A.S. (2005) Hybridization signatures of gamma-irradiated murine fetal thymus organ culture (FTOC) reveal modulation of genes associated with T-cell receptor V(D)J recombination and DNA repair. **Mol Immunol** (in press).
- CARTER, K.L., CAHIR-MCFARLAND, E. A. and KIEFF, E. (2002) Epstein-Barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. **J Virol** 76:10427-10436.
- CHAUSSABEL, D., SEMNANI, R.T., MCDOWELL, M.A., SACKS, D., SHER, A. and NUTMAN, T.B. (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. **Blood** 102:672-681.
- CHIN, K.V. and KONG, A.N. (2002) Application of DNA microarrays in pharmacogenomics and toxicogenomics. **Pharm Res** 19:1773-1778.
- CROMPTON, T.; OUTRAM, S.V.; BUCKLAND, J. and OWEN, M.J. (1997) A transgenic T cell receptor restores thymocyte differentiation in interleukin-7 receptor alpha chain-deficient mice. **Eur J Immunol** 27:100-104.
- DELUCA, D. and CLARK, D.R. (2002) Interleukin-7 negatively regulates the development of mature cells in fetal thymus organ cultures. **Develop Comp Immunol** 26(4):365-384.
- DERBINSKI, J., SCHULTE, A., KYEWSKI, B. and KLEIN, L. (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nat Immunol** 2:1032-1039.
- DOODY, A.D.; KOVALCHIN, J.T.; MIHALYO, M.A.; HAGYMASI, A.T.; DRAKE, C.G. and ADLER, A.J. (2004) Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted

epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. **J Immunol** 172(10):6087-6092.

DURUM, S.K.; CANDEIAS, S.; NAKAJIMA, H.; LEONARD, W.J.; BAIRD, A.M.; BERG, L.J. and MUEGGE, K. (1998) Interleukin 7 receptor control of T cell receptor γ gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility. **J Exp Med** 188:2233-2241.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O. and BOTSTEIN, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **PNAS** 95:14863-14868.

EL KASSAR, N.; LUCAS, P.J.; KLUG, D.B.; ZAMISCH, M., MERCHANT, M., BARE, C.V.; CHOUDHURY, B., SHARROW, S.O.; RICHIE, E.; MACKALL, C.L. and GRESS, R.E. (2004) A dose effect of IL-7 on thymocyte development. **Blood** 104:1419-1427.

ESPANHOL, A.R.; CARDOSO, R.S.; JUNTA, C.M.; VICTORERO, G.; LORIOD, B.; NGUYEN, C. and PASSOS, G.A.S. (2004) Large scale gene expression analysis of CBA/J mouse strain fetal thymus using cDNA-array hybridizations. **Mol and Cellular Bioch** 260 (1-2):65-68.

ESPANHOL, A.R.; MACEDO, C.; JUNTA, C.M.; CARDOSO, R.S.; VICTORERO, G.; LORIOD, B.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. and PASSOS, G.A.S. (2003) Gene expression profiling during thymus ontogeny and its association with TCR β 8.1-Dbeta2.1 rearrangements of inbred mouse strains. **Mol Cell Biochem** 252:223-228.

ESS, K.C.; WITTE, D.P.; BASCOMB, C.P. and ARONOW, B.J. (1999) Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation. **Oncogene** 18(4):1103-1111.

FAIOLA, B.; BAUER, A.K.; FULLER, E.S.; WONG, V.A.; PLUTA, L.J.; ABERNETHY, D.J.; MANGUM, J.B.; EVERITT, J.I. and RECIO, L. (2003) Variations in Prkdc and susceptibility to benzene-induced toxicity in mice. **Toxicol Sci** 75(2):321-332.

FARR, A.G.; DOOLEY, J.L. and ERICKSON, M. (2002) Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. **Immunol Rev** 189:20-27.

FREDERICK, M.J.; HENDERSON, Y.; XU, X.; DEEVERS, M.T.; SAHIN, A.A.; WU, H.; LEWIS, D.E.; EL-NAGGAR, A.K. and CLAYMAN, G.L. (2000) In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. **Am J Pathol** 156(6):1937-1950.

FRY, T.J. and MACKALL, C.L. (2002) Interleukin-7: from bench to clinic. **Blood** 99:3892-3904.

GLYNNE, R.J.; GHANDOUR, G. and GOODNOW, C.C. (2000) Genomic-scale gene expression analysis of lymphocyte growth, tolerance and malignancy. **Curr Opinion in Immunol** 12:210-214.

GONDA, T.J.; MACMILLAN, E.M.; TOWNSEND, P.V. and HAPPEL, A.J. (1993) Differentiation state and responses to hematopoietic growth factors of murine myeloid cells transformed by myb. **Blood** 82(9):2813-2822.

GOTTER, J.; BRORS, B.; HERGENHAHN, M. and KYEWSKI, B. (2004) Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. **J Exp Med** 199:155-166.

GRABSTEIN, K.H.; WALDSCHMIDT, T.J.; FINKELMAN, F.D.; HESS, B.W.; ALPERT, A.R.; BOIANI, N.E.; NAMEN, A.E. and MORRISSEY, P.J. (1993) Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. **J Exp Med** 178:257-264.

- GRANUCCI, F.; VIZZARDELLI, C.; PAVELKA, N.; FEAU, S.; PERSICO, M.; VIRZI, E.; RESCIGNO, M.; MORO, G. and RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. (2001) Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene-expression analysis. **Nat Immunol** 2:882-888.
- HAMANN, J. (2004) The EGF-TM7 family of the rat. **Immunogenetics** 56(9):679-81.
- HARE, K.J.; WILKINSON, R.W.; JENKINSON, E.J. and ANDERSON, G. (1998) Identification of a developmentally regulated phase of postselection expansion driven by thymic epithelium. **J Immunol** 160, 3666-3672.
- HARE, K.J.; JENKINSON, E.J. and ANDERSON, G. (1999a) CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection. **J Immunol** 162:3978-3983.
- HARE, K.J.; JENKINSON, E.J. and ANDERSON, G. (1999b) In vitro models of T cell development. **Seminars in Immunology** 11:3-12.
- HARE, K.J.; JENKINSON, E.J. and ANDERSON, G. (2000) An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire. **J Immunol** 165:2410-2414.
- HERNANDEZ-MUNAIN, C. and KRANGEL, M.S. (2002) Distinct roles for c-Myb and core binding factor/polyoma enhancer-binding protein 2 in the assembly and function of a multiprotein complex on the TCR delta enhancer in vivo. **J Immunol** 169(8):4362-4369.
- HOFMEISTER, R.; KHALED, A.R.; BENBERNOU, N.; RAJNAVOLGYI, E.; MUEGGE, K. and DURUM, S.K. (1999) Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 10:41-60.
- HOGQUIST, K.A. (2001) Signal strength in thymic selection and lineage commitment. **Curr Opinion Immunol** 13:225-231.
- HUANG, J.; DURUM, S.K. and MUEGGE, K. (2001) Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. **J Immunol** 167(11):6073-6077.
- IRVINE, K.; STIRLING, R.; HUME, D. and KENNEDY, D. (2004) Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. **Int J Dev Biol** 48(10):1065-1077.
- IYER, V.R.; EISEN, M.B.; ROSS, D.T.; SCHULER, G.; MOORE, T.; LEE, J.C.; TRENT, J.M.; STAUDT, L.M.; HUDSON, J.Jr.; BOGUSKI, M.S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D. and BROWN, P.O. (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science** 283:83-87
- JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. and SHLOMCHIK, M. (2002) Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. Editora Artmed, 5ed – Cap7.
- JENKINSON, E.J.; ANDERSON, G.; MOORE, N.C.; SMITH, C.A. and OWEN, J.J. (1994) Positive selection by purified MHC class II⁺ thymic epithelial cells in vitro: costimulatory signals mediated by B7 are not involved. **Dev Immunol** 3:265-271.
- JORDAN, B.R. (1998) Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". **J Biochem** 124:251-258.
- JUNTA, C.M. and PASSOS, G.A.S. (1998) Emergence of TCR alpha/beta V(D)J recombination and transcription during ontogeny of inbred mouse strains. **Mol Cell Biochem** 187:67-72.
- KANG, J. and DER, S.D. (2004) Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. **Curr Opinion Immunol** 16(2):180-90.

- KENNEDY, D.; FRENCH, J.; GUITARD, E.; RU, K.; TOCQUE, B. and MATTICK, J. (2001) Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. **J Cell Biochem** 84(1):173-87.
- KLEIN, L.; KLUGMANN, M.; NAVE, K.A.; TUOHY, V.K. and KYEWSKI, B. (2000) Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. **Nat Med** 6:56-61.
- KNOP, M.; AARESKJOLD, E.; BODE, G. and GERKE, V. (2004) Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. **EMBO J** 23(15):2982-92.
- KNUDSON, C.M.; TUNG, K.S.; TOURTELLOTTE, W.G.; BROWN, G.A. and KORSMEYER, S.J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. **Science** 270:96-99
- KOIZUMI, S. (2004) Application of DNA microarrays in occupational health research. **J Occup Health** 46(1):20-25.
- KROEMER, R. T. (1998) Comparison of the 3D models of four different human IL-7 isoforms with human and murine IL-7. **Protein Eng** 11:31-40.
- KURTH, I.; WILLIMANN, K.; SCHAERLI, P.; HUNZIKER, T.; CLARK-LEWIS, I. and MOSER, B. (2001) Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. **J Exp Med** 194(6):855-861.
- KWAKKENBOS, M.J.; KOP, E.N.; STACEY, M.; MATMATI, M.; GORDON, S.; LIN, H.H. and HAMANN, J. (2004) The EGF-TM7 family: a postgenomic view. **Immunogenetics** 55(10):655-66.
- KYEWSKI, B. and DERBINSKI, J. (2004) Self-representation in the thymus: an extended view. **Nat Rev Immunol** 4:688-698.
- LAOUAR, Y.; CRISPE, I.N. and FLAVELL, R.A. (2004) Overexpression of IL-7R alpha provides a competitive advantage during early T-cell development. **Blood** 103(6):1985-1994.
- LEE, W.H.; PARK, Y.M.; KIM, J.I.; PARK, W.Y.; KIM, S.H., JANG JJ, SEO JS. (1998) Expression of heat shock protein 70 blocks thymic differentiation of T cells in transgenic mice. **Immunology** 95(4):559-65.
- LEEMANS, J.C.; VELDE, A.A.; FLORQUIN, S.; BENNINK, R.J.; DE BRUIN, K.; VAN LIER, R.A.; VAN DER POLL, T. and HAMANN, J. (2004) The epidermal growth factor-seven transmembrane (EGF-TM7) receptor CD97 is required for neutrophil migration and host defense. **J Immunol** 172(2):1125-1131.
- LEFRANC, M-P and LEFRANC, G (2001) The T cell receptor Facts Book. Academic Press, London, 1ed.
- LEWIS, S.M. (1994) The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. **Adv Immunol** 56:27-150
- LIEU, Y.K.; KUMAR, A.; PAJEROWSKI, A.G.; ROGERS, T.J. and REDDY, E.P. (2004) Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function. **PNAS** 101(41):14853-14858.
- LOPEZ, F.; ROUGEMONT, J.; LORIOD, B.; BOURGEOIS, A.; LOI, L.; BERTUCCI, F.; HINGAMP, P.; HOULGATTE, R. and GRANIEAUD, S. (2004) Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. **BMC Genomics** 5(1):38.

MACEDO, C., JUNTA, C.M. and PASSOS, G.A.S. (1999) Onset of T-cell receptor Vbeta8.1 and Dbeta2.1 V(D)J recombination during thymus development of inbred mouse strains. **Immunol Lett** 6:371-373.

MAGALHÃES, D.A.; MACEDO, C.; JUNTA, C.M.; MELLO, S.S.; MARQUES, M.M.; CARDOSO, R.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; DONADI, E.A. AND PASSOS, G.A. (2005) Hybridization signatures during thymus ontogeny reveals modulation of genes coding for T-cell signaling proteins. **Mol Immunol** 42(9):1043-1048.

MANGER, I.D. and RELMAN, D.A. (2000) How the host "sees" pathogens: global gene expression responses to infection. **Curr Opin Immunol** 12:215-218.

MANKE, I.A.; NGUYEN, A.; LIM, D.; STEWART, M.Q.; ELIA, A.E. and YAFFE, M.B. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. **Mol Cell** 17(1):37-48.

MAO, M.; YU, M.; TONG, J.H.; YE, J.; ZHU, J.; HUANG, Q.H.; FU, G.; YU, L.; ZHAO, S.Y.; WAXMAN, S.; LANOTTE, M.; WANG, Z.Y.; TAN, J.Z.; CHAN, S.J. and CHEN, Z. (1996) RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. **PNAS** 93(12):5910-5914.

MARTENSSON, S.; NYGREN, J.; OSHEROFF, N. and HAMMARSTEN, O. (2003) Activation of the DNA-dependent protein kinase by drug-induced and radiation-induced DNA strand breaks. **Radiat Res** 160(3):291-301.

MATSUZAKI, Y.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, K.; TOMITA, T.; ISODA, M.; LOH, D.Y. and NAKAUCHI, H. (1997) Role of bcl-2 in the development of lymphoid cells from the hematopoietic stem cell. **Blood** 89:853-862.

MCGARGILL, M.A., DERBINSKI, J.M. and HOGQUIST, K.A. (2000) Receptor editing in developing T cells. **Nat Immunol** 1:336-341.

MENOSSI, M.; CREMONESE, N.Jr.; MARON, L.G. and ARRUDA, P. (2000) Making colony PCR easier by adding gel-loading buffer to the amplification reaction. **Biotechniques** 28:424-426.

MILLAR, A.L.; PAVIOS, N.J.; XU, J. and ZHENG, M.H. (2002) Rab3D: a regulator of exocytosis in non-neuronal cells. **Histol Histopathol** 17(3):929-36.

MOORE, N.C.; JENKINSON, E.J. and OWEN, J.J. (1992) Effects of the thymic microenvironment on the response of thymocytes to stimulation. **Eur J Immunol** 22(10):2533-7.

MOORE, T.A. and ZLOTNIK, A. (1995) T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. **Blood** 86:1850-1860.

MOORE, T.A.; VON FREEDEN-JEFFREY, U.; MURRAY, R. and ZLOTNIK, A. (1996) Inhibition of gamma delta T-cell development and early thymocyte maturation in IL-7-/- mice. **J Immunol** 157:2366-2373.

MUEGGE, K.; VILA, M.P. and DURUM, S.K. (1993) IL-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. **Science** 261:93-95.

MUNITIC, I.; WILLIAMS, J.A.; YANG, Y.; DONG, B.; LUCAS, P.J.; EL KASSAR, N.; GRESS, R.E. and ASHWELL, J.D. (2004) Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. **Blood** 104: 4165-4172.

MUSTAFA, T.; KLONISCH, T.; HOMBACH-KLONISCH, S.; KEHLEN, A.; SCHMUTZLER, C.; KOEHRLE, J.; GIMM, O.; DRALLE, H. and HOANG-VU, C. (2004) Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas. **Int J Oncol** 24(2):285-94.

NAMEN, A.E.; LUPTON, S.; HJERRILD, K.; WIGNALL, J.; MOCHIZUKI, D.Y.; SCHMIERER, A.; MOSLEY, B.; MARCH, C.J.; URDAL, D. and GILLIS, S. (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. **Nature** 333:571-573.

NGUYEN, D.; JONES, A.; OJAKIAN, G.K. and RAFFANIELLO, R.D. (2003) Rab3D redistribution and function in rat parotid acini. **J Cell Physiol** 197(3):400-408.

NISHIO H, MATSUI K, TSUJI H, TAMURA A, SUZUKI K. (2000) Expression of the janus kinases-signal transducers and activators of transcription pathway in Hassall's corpuscles of the human thymus. **Histochem Cell Biol** 113(6):427-431.

RUSSELL, S.M.; KEEGAN, A.D.; HARADA, N.; NAKAMURA, Y.; NOGUCHI, M.; LELAND, P.; FRIEDMANN, M.C.; MIYAJIMA, A.; PURI, R.K. and PAUL, W.E. (1993) Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. **Science** 262:1877-1880.

OKABE, H.; SATOH, S.; KATO, T.; KITAHARA, O.; YANAGAWA, R.; YAMAOKA, Y.; TSUNODA, T.; FURUKAWA, Y. and NAKAMURA, Y. (2001) Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. **Cancer Res** 61:2129-2137.

OOSTERWEGEL, M.A.; HAKS, M.C.; JEFFRY, U.; MURRAY, R. and KRUISBEEK, A.M. (1997) Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. **Immunity** 6(3):351-60.

PASSOS, G.A.S. (2000) Projeto Transcriptoma - Análise da Expressão Gênica em larga escala usando DNA-Arrays. **Biotecnologia - Ciência e Desenvolvimento** II, 34-37.

PATCHEV, V.K.; BRADY, L.S.; KARL, M. and CHROUSOS, G.P. (1994) Regulation of HSP90 and corticosteroid receptor mRNA by corticosterone levels in vivo. **Mol Cell Endocrinol** 103(1-2):57-64.

PENIT, C.; LUCAS, B.; VASSEUR, F.; RIEKER, T. and BOYD, R.L. (1996) Thymic medulla epithelial cells acquire specific markers by post-mitotic maturation. **Dev. Immunol** 5:25-36.

PEREIRA, E.; TAMIA-FERREIRA, M.C.; CARDOSO, R.S.; MELLO, S.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; PASSOS, G.A. and DONADI, E.A. (2004) Immunosuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. **Immunology** 113 (1): 99-105.

PETRIE, H.T. (2003) Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. **Nat Rev Immunol** 3:859-866.

PRASHER, J.M.; LALAI, A.S.; HEIJMANS-ANTONISSEN, C.; PLOEMACHER, R.E.; HOEIJMAKERS, J.H.; TOUW, I.P. and NIEDERNHOFER, L.J. (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1(-/-) mice. **EMBO J** 24(4):861-71.

PROCKOP, S.E.; PALENCIA, S.; RYAN, C.M.; GORDON, K.; GRAY, D. and PETRIE, H.T. (2002) Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. **J Immunol** 169(8):4354-61.

PROWS, D.R.; MCDOWELL, S.A.; ARONOW, B.J. and LEIKAUF, G.D. (2003) Genetic susceptibility to nickel-induced acute lung injury. **Chemosphere** 51:1139-1148.

QURAIISHI, H. and BROWN, I.R. (1995) Expression of heat shock protein 90 (hsp90) in neural and nonneural tissues of the control and hyperthermic rabbit. **Exp Cell Res** 219(2):358-363.

RATHMELL, J.C.; VANDER HEIDEN, M.G.; HARRIS, M.H.; FRAUWIRTH, K.A. and THOMPSON, C.B. (2000) In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. **Mol Cell** 6:683-692

RATHMELL, J.C.; FARKASH, E.A.; GAO, W. and THOMPSON, C.B. (2001) IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. **J Immunol** 167:6869-6876.

REA, M.A.; GREGG, J.P.; QIN, Q.; PHILLIPS, M.A. and RICE, R.H. (2003) Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. **Carcinogenesis** 24:747-756.

RICIARDI-CASTAGNOLI, C. and GRANUCCI, F. (2002) Interpretation of the complexity of innate immune responses by functional genomics. **Nat Rev Immunol** 2:881-889.

RIEDEL, D.; ANTONIN, W.; FERNANDEZ-CHACON, R.; ALVAREZ DE TOLEDO, G.; JO, T.; GEPPERT, M.; VALENTIJN, J.A.; VALENTIJN, K.; JAMIESON, J.D.; SUDHOF, T.C. and JAHN, R. (2002) Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. **Mol Cell Biol** 22(18):6487-6497.

ROGGE, L. (2002) A genomic view of helper T cell subsets. **Ann N Y Acad Sci** 975:57-67.

ROSSE, T.; OLIVIER, R.; MONNEY, L.; RAGER, M.; CONUS, S.; FELLAY, I.; JANSEN, B. and BORNER, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. **Nature** 391:496-499

ROTA, P.A.; OBERSTE, M.S.; MONROE, S.S.; NIX, W.A.; CAMPAGNOLI, R.; ICENOGLU, J.P.; PENARANDA, S.; BANKAMP, B.; MAHER, K.; CHEN, M.H.; TONG, S.; TAMIN, A.; LOWE, L.; FRACE, M.; DERISI, J.L.; CHEN, Q.; WANG, D.; ERDMAN, D.D.; PERET, T.C.; BURNS, C.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; SANCHEZ, A.; LIFFICK, S.; HOLLOWAY, B.; LIMOR, J.; MCCAUSTLAND, K.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; FOUCHIER, R.; GUNTHER, S.; OSTERHAUS, A.D.; DROSTEN, C.; PALLANSCH, M.A.; ANDERSON, L.J. and BELLINI, W.J. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science** 300:1394-1399

ROUER, E. (2004) Expression of the p56lck by colon tumors: a marker of their invasive capacity? **Cancer** 91(12):928-940.

SAKAMOTO-HOJO, E.T.; MELLO, S.S.; CARDOSO, R.S. and PASSOS, G.A.S. (2003a) Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese (cap. 12), In: **Mutagênese Ambiental**, Editora Ultra.

SAKAMOTO-HOJO, E.T.; MELLO, S.S.; PEREIRA, E.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; JUNTA, C.M.; SANDRIN-GARCIA, P.; DONADI, E.A. and PASSOS, G.A. (2003b) Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. **Mutation Research** 544:403-413.

SCHLISSEL, M.S., DURUM, S.D. and MUEGGE, K. (2000) The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. **J Exp Med** 191(6):1045-1050.

SCHLUTER, O.M.; KHVOTCHEV, M.; JAHN, R. and SUDHOF, T.C. (2002) Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. **J Biol Chem** 277(43):40919-40929.

SCHWARZE, S.R.; LUO, J.; ISAACS, W.B. and JARRARD, D.F. (2005) Modulation of CXCL14 (BRAK) expression in prostate cancer. **Prostate** 13 janeiro.

SHELLENBERGER, T.D.; WANG, M.; GUJRATI, M.; JAYAKUMAR, A.; STRIETER, R.M.; BURDICK, M.D.; IOANNIDES, C.G.; EFFERSON, C.L.; EL-NAGGAR, A.K.; ROBERTS, D.; CLAYMAN, G.L. and FREDERICK, M.J. (2004) BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. **Cancer Res** 64(22):8262-8270.

SHIMIZU, C.; KAWAMOTO, H.; YAMASHITA, M.; KIMURA, M.; KONDOU, E.; KANEKO, Y.; OKADA, S.; TOKUHISA, T.; YOKOYAMA, M.; TANIGUCHI, M.; KATSURA, Y. and NAKAYAMA, T. (2001) Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of Ick proximal promoter activity. **Int Immunol** 13(1):105-117.

SHORES, E.W.; VAN EWIJK, W. and SINGER, A. (1991) Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. **Eur J Immunol** 21:1657-1661.

SIMPSON, J.C. and JONES, A.T. (2005) Lipids, Rafts and Traffic: Chapter 10 - Early endocytic Rafts: functional prediction to functional characterization. **Biochem Soc Symp** 72:99-108.

SNYDER, H.L. (1997) Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. **J Exp Med** 186(7):1087-1098.

SOHN, S.J.; FORBUSH, K.A.; PAN, X.C. and PERLMUTTER, R.M. (2001) Activated p56lck directs maturation of both CD4 and CD8 single-positive thymocytes. **J Immunol** 166(4):2209-17.

SOLOFF, R.S.; WANG, T.G.; DEMPSEY, D.; JENNINGS, S.R.; WOLCOTT, R.M. and CHERVENAK, R. (1997) Interleukin 7 induces TCR gene rearrangement in adult marrow-resident murine precursor T cells. **Mol Immunol** 34:453-462.

STAUDT, L.M. and BROWN, P.O. (2000) Genomic views of the immune system. **Annu Rev Immunol** 18:829-59.

SU, L.K. and QI, Y. (2001) Characterization of human MAPRE genes and their proteins. **Genomics** 71(2):142-149.

SURH, C.D.; ERNST, B. and SPRENT, J. (1992) Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. **J Exp Med** 176:611-616.

TAYLOR, D.; BADIANI, P. and WESTON, K. (1996) A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. **Genes Dev** 10(21):2732-2744.

TEAGUE, T.K.; HILDEMAN, D.; KEDL, R.M.; MITCHELL, T.; REES, W.; SCHAEFER, B.C.; BENDER, J.; KAPPLER, J. and MARRACK, P. (1999) Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. **PNAS** 96:12691-12696.

THOMSON, A. (1998) The Cytokine Handbook. Academic Press, 3ed - Chapter 9.

THORNE, M.E. and MCQUADE, K.L. (2004) Heat-induced oligomerization of gp96 occurs via a site distinct from substrate binding and is regulated by ATP. **Biochem Biophys Res Commun** 323(4):1163-71.

TOKI, J.; ADACHI, Y.; JIN, T.; FAN, T.; TAKASE, K.; LIAN, Z.; HAYASHI, H. GERSHWIN, M.E. and IKEHARA, S. (2003) Enhancement of IL-7 following irradiation of fetal thymus. **Immunobiol** 207(4):247-258.

TOURRIERE, H.; GALLOUZI, I.E.; CHEBLI, K.; CAPONY, J.P.; MOUAIKEL, J.; VAN DER GEER, P. and TAZI, J. (2001) RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. **Mol Cell Biol** 21(22):7747-60.

TOURRIERE, H.; CHEBLI, K.; ZEKRI, L.; COURSELAUD, B.; BLANCHARD, J.M.; BERTRAND, E. and TAZI, J. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. **J Cell Biol** 160(6):823-31.

- TUSHER, V.G.; TIBSHIRANI, R. and CHU, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **PNAS** 98:5116-5121.
- VAN EWIJK, W.; KAWAMOTO, H.; GERMERAAD, W.T. and KATSURA, Y. (2000) Developing thymocytes organize thymic microenvironments. **Curr Top Microbiol Immunol** 251:125-132
- VAN GENT, D.C.; RAMSDEN, D.A. and GELLERT, M. (1996) The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. **Cell** 85(1):107-13
- VAN WEEREN, L.; DE GRAAFF, A.M.; JAMIESON, J.D.; BATENBURG, J.J. and VALENTIJN, J.A. (2004) Rab3D and actin reveal distinct lamellar body subpopulations in alveolar epithelial type II cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 30(3):288-95.
- VANMUYLDER, N. and DOUROV, N. (2000) Immunocytochemical investigations of heat shock proteins expression during thymic apoptosis induced by glucocorticoids. **Pathol Res Pract** 196(2):119-24.
- VARAS, A.; VICENTE, A.; SACEDON, R. and ZAPATA, A.G. (1998) Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. **Blood** 92:93-100.
- VERDEIL, G.; PUTHIER, D.; NGUYEN, C.; SCHMITT-VERHULST, A.M. and AUPHAN-ANEZIN, N. (2002) Gene profiling approach to establish the molecular bases for partial versus full activation of naive CD8 T lymphocytes. **Ann N Y Acad Sci** 975:68-76.
- VON FREEDEN-JEFFRY, U. et al (1998) IL-7 knockout mice and the generation of lymphocytes. In: S.K. Durum and K. Muegge Editors, **Cytokine knockouts** Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp. 21-36.
- WANG, T.; WARD, Y.; TIAN, L.; LAKE, R.; GUEDEZ, L.; STETLER-STEVENSON, W.G and KELLY, K. (2005) CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counter receptors on endothelial cells. **Blood** 105(7):2836-2844.
- WEERARATNA, A.T.; NAGEL, J.E.; DE MELLO-COELHO, V. and TAUB, D.D. (2004) Gene expression profiling: from microarrays to medicine. **J Clin Immunol** 24(3):213-24.
- WHALEN, B.J.; MAROUNEK, J.; WEISER, P.; APPEL, M.C.; GREINER, D.L.; MORDES, J.P. and ROSSINI, A.A. (2001) BB rat thymocytes cultured in the presence of islets lose their ability to transfer autoimmune diabetes. **Diabetes** 50:972-979.
- WHALEN, B.J.; WEISER, P.; MAROUNEK, J.; ROSSINI, A.A.; MORDES, J.P. and GREINER, D.L. (1999) Recapitulation of normal and abnormal biobreeding rat T cell development in adult thymus organ culture. **J Immunology** 162:4003-4012.
- WHALEN, B.J.; MAROUNEK, J.; MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. and GREINER, D.L. (2003) Type 1 cytokines polarize thymocytes during T cell development in adult thymus organ culture. **J AutoImmunity** 20:27-42.
- WILLIAMS, O.; NORTON, T.; HALLIGHEY, M.; KIOUSSIS, D. and BRADY, H.J. (1998) The action of Bax and bcl-2 on T cell selection. **J Exp Med** 188:1125-1133
- YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, I.; PENG, T-I; JONES, D.P. and WANG, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science** 275:1129-1132.
- YARILIN, A.A. and BELYAKOV, I.M. (2004) Cytokines in the thymus: production and biological effects. **Curr Med Chem** 11(4):447-64.

YU, Q.; ERMAN, B.; BHANDoola, A.; SHARROW, S.O. and SINGER, A. (2003) In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. **J Exp Med** 197(4):475-487.

ZAMISCH, M.; MOORE-SCOTT, B.; SU, D.M.; LUCAS, P.J.; MANLEY, N. and RICHIE, E.R. (2005) Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. **J Immunol** 174(1):60-67.

ZHOU, W.; GURUBHAGAVATULA, S.; LIU, G.; PARK, S.; NEUBERG, D.S.; WAIN, J.C.; LYNCH, T.J.; SU, L. and CHRISTIANI, D.C. (2004) Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. **Clin Cancer Res** 10(15):4939-43.

ANEXO 1: Tabela contendo clone ID, nome e símbolo de todos os 624 clones utilizados na membrana de microarray desse projeto.

CloneID	Símbolo	Nome
576643		13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library.
582054	Adam8	A disintegrin and metalloprotease domain 8
182661	ACVRL1	Activin A receptor type II-like 1
575462	Ap1b1	Adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit
577558	Anapc11	Anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
582154	Anapc5	Anaphase-promoting complex subunit 5
575492	Ankrd27	Ankyrin repeat domain 27 (VPS9 domain)
576596	Anxa5	Annexin A5
5254594	Alox12	Arachidonate 12-lipoxygenase
5010215	Alox15	Arachidonate 15-lipoxygenase
3376228	Alox5ap	Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein
582931	Arntl	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
50519	ARNTL	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
6177912	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
1877532	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
582610	Atp5j	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F
576922	Bcl7a	B-cell CLL/Lymphoma 7A
574489	Bcl7b	B-cell CLL/Lymphoma 7B
640892	Bcl9	B-cell CLL/Lymphoma 9
5376614	Bcl9l	B-cell CLL/Lymphoma 9-like
573863	Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10
576116	Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B
5291198	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
577642	Bcl2a1a	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d
573624	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6
574060	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31
583763	Bcap37	B-cell receptor-associated protein 37
574654	Btg1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
574837	Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative
640945	Bnip2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP2
577004	Bag2	Bcl2-associated athanogene 2
641008	Bclaf1	BCL2-associated transcription factor 1
582454	Bad	Bcl-associated death promoter
576493	B2m	Beta-2 microglobulin
576472	B2m	Beta-2 microglobulin
1333778	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
4971952	Cai	Calcium binding protein, intestinal
575158	Capn2	Calpain 2
641129	Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1
573689	Csnk1d	Casein kinase 1, delta
582609	Csnk2a1	Casein kinase II, alpha 1 polypeptide
575323	Csnk2a2	Casein kinase II, alpha 2, polypeptide
5039636	Casp1	Caspase 1
573760	Casp2	Caspase 2
5344118	Casp2	Caspase 2
581767	Casp3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease

640896	Casp7	Caspase 7
5099113	Casp8	Caspase 8
CloneID	Símbolo	Nome
641074	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
576406	Cnot10	CCR4-NOT transcription complex, subunit 10
572999	Cnot2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2
5120996	Cd14	CD14 antigen
640054	Cd164	CD164 antigen
576858	Cd1d1	CD1d1 antigen
3413503	Cd209a	CD209a antigen
576831	Cd24a	CD24a antigen
576501	Cd28	CD28 antigen
576441	Cd3e	CD3 antigen, epsilon polypeptide
573426	Cd34	CD34 antigen
640080	Cd37	CD37 antigen
640273	Cd4	CD4 antigen
4912297	Cd4	CD4 antigen
5373491	Cd44	CD44 antigen
577283	Cd47	CD47 antigen
582638	Cd5	CD5 antigen
576862	Cd53	CD53 antigen
582449	Cd69	CD69 antigen
573570	Cd72	CD72 antigen
1247019	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain
1065642	Cd80	CD80 antigen
574651	Cd83	CD83 antigen
619124	Cd86	CD86 antigen
573301	Cd97	CD97 antigen
575684		CDNA, clone:Y1G0147L15
576454	Cdca8	Cell division cycle associated 8
576815	Xcl1	Chemokine (C motif) ligand 1
573898	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
576394	Ccl21a	Chemokine (C-C motif) ligand 21a (leucine)
576610	Ccl21a	Chemokine (C-C motif) ligand 21a (leucine)
577486	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
575567	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
576828	Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6
573572	Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
5321155	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
581882	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
5327290	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
577574	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
583442	Cxcl14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
573339	Cxcl4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4
576788	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
144924	C6orf4	Chromosome 6 open reading frame 4
583913	Mycbp	C-myc binding protein
577996	C1qa	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
583277	C1qb	Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
576427	C1s	Complement component 1, s subcomponent
583642	C2	Complement component 2 (within H-2S)
582886	C3	Complement component 3
575077	Cr2	Complement receptor 2
582729	Crry	Complement receptor related protein
574821	Clec2	C-type lectin-like receptor 2
576166	Ccnb1	Cyclin B1, related sequence 1

CloneID	Símbolo	Nome
575230	Ccnd3	Cyclin D3
576765	Cyln2	Cytoplasmic linker 2
575713	Ctla4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
4823153	DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
1471825	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
576729	Dedd	Death effector domain-containing
581640	Dedd	Death effector domain-containing
577534	Dleu2	Deleted in lymphocytic leukemia, 2
573651	Def6	Differentially expressed in FDCP 6
575615	Ddr1	Discoidin domain receptor family, member 1
3329086	Dclre1b	DNA cross-link repair 1B, PSO2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
573934	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A
583260	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A
576334	D10Erttd610e	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 610, expressed
574394	D17Wsu104e	DNA segment, Chr 17, Wayne State University 104, expressed
576358	D4Wsu53e	DNA segment, Chr 4, Wayne State University 53, expressed
576598	Ddost	Dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase
576070	Egr1	Early growth response 1
576356	Egr1	Early growth response 1
574894	Entpd5	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
576524	Eefsec	Eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific
576542	Eif5	Eukaryotic translation initiation factor 5
1585120	ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
1655018	ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3
5266573	ERCC4	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4
1308118	ERCC5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
4822982	PGBD3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
577430	AA536749	Expressed sequence AA536749
577432	AI449533	Expressed sequence AI449533
577748	AI790298	Expressed sequence AI790298
577510	AI848100	Expressed sequence AI848100
577726	D14Erttd449e	Expressed sequence AI987986
5006587	AW046014	Expressed sequence AW046014
1637797	FANCC	Fanconi anemia, complementation group C
1705194	FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
582435	Faim	Fas apoptotic inhibitory molecule
37367	FAIM2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
575599	Fastk	Fas-activated serine/threonine kinase
574610	Faf1	Fas-associated factor 1
5376627	Fos	FBJ osteosarcoma related oncogene
575998	Fbxl5	F-box and leucine-rich repeat protein 5
576020	Fbxo45	F-box protein 45
573972	Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter
575540	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
574862	Foxo1	Forkhead box O1
4011815	Foxp3	Forkhead box P3
575852	Hexb	G elongation factor, mitochondrial 2
582706	Ggcx	Gamma-glutamyl carboxylase
5250966	Gata3	GATA binding protein 3
572830	Gzma	Granzyme A
4036879	Gzmb	Granzyme B
1130993	H2AFX	H2A histone family, member X
133099	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
CloneID	Símbolo	Nome
574381	Hspa14	Heat shock 70kDa protein 14

155287	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A
581923	Hspd1	Heat shock protein 1 (chaperonin)
582878	Hsp105	Heat shock protein 105
582093	Hspa1a	Heat shock protein 1A
582777	Hspa1l	Heat shock protein 1-like
574849	Hspa4	Heat shock protein 4
575712	Hspa8	Heat shock protein 8
577654	Hectd1	HECT domain containing 1
640698	Hcst	Hematopoietic cell signal transducer
573398	Hrmt113	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein methyltransferase-like 3 (S. cerevisiae)
576094	Hdc	Histidine decarboxylase
574155	H2-Eb1	Histocompatibility 2, class II antigen E beta
583545	H2-Bf	Histocompatibility 2, complement component factor B
576900	H2-Oa	Histocompatibility 2, O region alpha locus
582419	Bat8	HLA-B associated transcript 8
577630	Hsd17b12	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12
574568	Hsd17b4	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
575387	Grb2	Hypothetical D930050J11
576085	Itk	IL2-inducible T-cell kinase
574793	Ier5	Immediate early response 5
576264	Igbp1	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1
582766	Igsf7	Immunoglobulin superfamily, member 7
573897		In multiple clusters
574025		In multiple clusters
574076		In multiple clusters
574242		In multiple clusters
574260		In multiple clusters
577208		In multiple clusters
641058		In multiple clusters
36215		In multiple clusters
153355		In multiple clusters
160946		In multiple clusters
160946		In multiple clusters
575368		In multiple clusters
575728		In multiple clusters
576646		In multiple clusters
582130		In multiple clusters
576409	Nkx6-2	Inositol polyphosphate-5-phosphatase A
574949	Ide	Insulin degrading enzyme
574241	Ide	Insulin degrading enzyme
575182	InsI5	Insulin-like 5
577454	Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor
3586130	Itga4	Integrin alpha 4
3966116	Itgam	Integrin alpha M
5039085	Itgax	Integrin alpha X
583119	Itgb2	Integrin beta 2
135671	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
44814	ITGA6	Integrin, alpha 6
50503	ITGB2	Integrin, beta 2, lymphocyte function-associated antigen 1; macrophage antigen 1 (mac-1)
574542	Icam2	Intercellular adhesion molecule 2
582096	Ifi203	Interferon activated gene 203
577563	Icsbp1	Interferon consensus sequence binding protein 1
CloneID	Símbolo	Nome
640774	Icsbp1	Interferon consensus sequence binding protein 1
572842	Isgf3g	Interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma
581943	Igtp	Interferon gamma induced GTPase

576679	Ifngr2	Interferon gamma receptor 2
582504	Ifi1	Interferon inducible protein 1
5356131	Irf2	Interferon regulatory factor 2
576736	Irf3	Interferon regulatory factor 3
260035	IRF5	Interferon regulatory factor 5
575371	Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
574088	Ifit2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
576149	Ifrd2	Interferon-related developmental regulator 2
3599550	Il1a	Interleukin 1 alpha
3989461	Il1b	Interleukin 1 beta
1002777	Il10	Interleukin 10
582118	Il12rb1	Interleukin 12 receptor, beta 1
1379220	Il12a	Interleukin 12a
1140097	Il13	Interleukin 13
573050	Il16	Interleukin 16
583729	Il17rb	Interleukin 17 receptor B
640615	Il18rap	Interleukin 18 receptor accessory protein
5251945	Il2rb	Interleukin 2 receptor, beta chain
640300	Il4	Interleukin 4
1380031	Il4	Interleukin 4
639920	Il4ra	Interleukin 4 receptor, alpha
972705	Il5	Interleukin 5
5353421	Il7	Interleukin 7
578171	Il7r	Interleukin 7 receptor
639840	Jak1	Janus kinase 1
5068946	Jak2	Janus kinase 2
576670	Jak3	Janus kinase 3
147647	LTBP1	Latent transforming growth factor beta binding protein 1
1074465	LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent
2326929	LIG3	Ligase III, DNA, ATP-dependent
582840	Lat	Linker for activation of T cells
574422	Ly6a	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A
581749	Ly6a	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A
581909	Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D
640890	Ly6e	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
583305	Ly86	Lymphocyte antigen 86
577717	Ly9	Lymphocyte antigen 9
520548	Ly96	Lymphocyte antigen 96
576989	Lcp2	Lymphocyte cytosolic protein 2
640179	Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase
577700	Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase
640873	Lsp1	Lymphocyte specific 1
583612	Lef1	Lymphoid enhancer binding factor 1
575374	Lef1	Lymphoid enhancer binding factor 1
583128	Lrmp	Lymphoid-restricted membrane protein
751270	Lta	Lymphotoxin A
577871	Ltb	Lymphotoxin B
574707	Lamp1	Lysosomal membrane glycoprotein 1
583828	Maea	Macrophage erythroblast attacher
575996	Maea	Macrophage erythroblast attacher
CloneID	Símbolo	Nome
3324966	Marco	Macrophage receptor with collagenous structure
5036352	Msr1	Macrophage scavenger receptor 1
5326109	Msr2	Macrophage scavenger receptor 2
577177	Mr1	Major histocompatibility complex, class I-related
41204	ME3	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial

4951511	Mtvr2	Mammary tumor virus receptor 2
574316	Mark2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2
582598	Mark4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4
573066	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
46916	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
30850	MMP17	Matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted)
576274	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2
574625	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2
576274	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2
581748	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2
582583	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2
575926	Mbd1	Methyl-CpG binding domain protein 1
575022	Mettl3	Methyltransferase-like 3
575046	Mettl3	Methyltransferase-like 3
572898	Mapre2	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
575652	Mrpl34	Mitochondrial ribosomal protein L34
574250	Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1
641003	Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3
583552	Mapk9	Mitogen activated protein kinase 9
575183	Map2k7	Mitogen activated protein kinase kinase 7
575211	Map3k11	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11
576678	Map3k4	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 4
640938	Map4k2	Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 2
50506	MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6
175123	MAPK7	Mitogen-activated protein kinase 7
576539	Mapk8ip3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
575958	Map2k1ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1
639878	Map3k7ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1
2298639	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
575702	Myb	Myeloblastosis oncogene
576095	Myb	Myeloblastosis oncogene
574902	Myc	Myelocytomatosis oncogene
190887	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
574266	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11
576573	Ndufb8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8
583156	Nktr	Natural killer tumor recognition sequence
577716	Neil1	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
42596	NPAS1	Neuronal PAS domain protein 1
161998	NPAS2	Neuronal PAS domain protein 2
5371913	Ncf1	Neutrophil cytosolic factor 1
576061	Ncf4	Neutrophil cytosolic factor 4
21961	NKRF	NF-kappa B repressing factor
4978648	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage
130313	NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
640608	Nck2	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2
1379566	Ntan1	N-terminal Asn amidase
575541	Nfatc3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
574499	Nxf1	Nuclear RNA export factor 1 homolog (S. cerevisiae)
CloneID	Símbolo	Nome
1479947	Prf1	Perforin 1 (pore forming protein)
582634	Pparbp	Peroxisome proliferator activated receptor binding protein
576212	Pitpn	Phosphatidylinositol transfer protein
577125	Pik3cg	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
582720	Styx	Phosphoserine/threonine/tyrosine interaction protein
577506	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
192694	POU2F1	POU domain, class 2, transcription factor 1

136872	POU2F3	POU domain, class 2, transcription factor 3
5041952	Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
581957	Psmb3	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3
577047	Pias1	Protein inhibitor of activated STAT 1
583229	Prkcq	Protein kinase C, theta
582778	Prkd2	Protein kinase D2
1345935	Prkdc	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
1613637	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
1613637	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
583424	Prkra	Protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator
575950	Pofut2	Protein O-fucosyltransferase 2
576022	Pofut2	Protein O-fucosyltransferase 2
575589	Ptk9	Protein tyrosine kinase 9
640339	Ptk9l	Protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)
36348	PTPN13	Protein tyrosine phosphatase (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)
4937351	Ptprc	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
577544	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
573298	Ptk2b	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta
582445	Rab1	RAB1, member RAS oncogene family
574089	Rab11a	RAB11a, member RAS oncogene family
576278	Rab12	RAB12, member RAS oncogene family
573835	Rab2	RAB2, member RAS oncogene family
577450	Rab21	RAB21, member RAS oncogene family
640294	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family
582935	Rab33b	RAB33B, member of RAS oncogene family
583347	Rab37	RAB37, member of RAS oncogene family
575981	Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family
577111	Rab7	RAB7, member RAS oncogene family
1675900	RAD52	RAD52 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
572818	Rhoa	Ras homolog gene family, member A
574375	Rasa2	RAS p21 protein activator 2
582174	Rasa3	RAS p21 protein activator 3
640974	G3bp	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein
4523186	RAG2	Recombination activating gene 2
575972	Rcor1	REST corepressor 1
577556	Rp9h	Retinitis pigmentosa 9 homolog (human)
576225	Rbl2	Retinoblastoma-like 2
575324	Rai17	Retinoic acid induced 17
582914	Arhgap4	Rho GTPase activating protein 4
641006	Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
576590	1110031M08Rik	RIKEN cDNA 1110031M08 gene
582082	1110054N06Rik	RIKEN cDNA 1110054N06 gene
576574	1200003C23Rik	RIKEN cDNA 1200003C23 gene
575398	1700019B16Rik	RIKEN cDNA 1700019B16 gene
577779	1700021K02Rik	RIKEN cDNA 1700021K02 gene
582991	Sh3gl1	RIKEN cDNA 1810056O20 gene

CloneID	Símbolo	Nome
575420	2010106G01Rik	RIKEN cDNA 2010106G01 gene
576620	2310006J04Rik	RIKEN cDNA 2310006J04 gene
640265	Cflar	RIKEN cDNA 2310024N18 gene
582538	2410004C24Rik	RIKEN cDNA 2410004C24 gene
575876	2600005C20Rik	RIKEN cDNA 2600005C20 gene
574533	Cutl1	RIKEN cDNA 2600010L24 gene
577764	2610014H22Rik	RIKEN cDNA 2610014H22 gene
576046	2610209N15Rik	RIKEN cDNA 2610209N15 gene
577438	2700059D21Rik	RIKEN cDNA 2700059D21 gene

582418	2810422B04Rik	RIKEN cDNA 2810422B04 gene
575510	4921506I22Rik	RIKEN cDNA 4921506I22 gene
575468	4930427A07Rik	RIKEN cDNA 4930427A07 gene
576228	4930548G07Rik	RIKEN cDNA 4930548G07 gene
575396	4930572I07Rik	RIKEN cDNA 4930572I07 gene
576636	4932414K18Rik	RIKEN cDNA 4932414K18 gene
572979	Mapkapk2	RIKEN cDNA 8030443L12 gene
573338	8430423A01Rik	RIKEN cDNA 8430423A01 gene
640129	A130095M15Rik	RIKEN cDNA A130095M15 gene
4187517	Bcl2l1	RIKEN cDNA A630035D09 gene
575392	A630098A13Rik	RIKEN cDNA A630098A13 gene
582466	B930006L02Rik	RIKEN cDNA B930006L02 gene
640958	Rab14	RIKEN cDNA D030017L14 gene
582730	D230016N13Rik	RIKEN cDNA D230016N13 gene
582917	Slc12a6	RIKEN cDNA E330013P08 gene
576548	E430004N04Rik	RIKEN cDNA E430004N04 gene
577678	Eml4	RIKEN cDNA F830004D09 gene
577175	Rnmt	RNA (guanine-7-) methyltransferase
573999	Samhd1	SAM domain and HD domain, 1
141975	SCARB2	Scavenger receptor class B, member 2
621878	Sell	Selectin, lymphocyte
582567	Serpinh1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1
582682	Serpinh1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1
577546	Shmt1	Serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)
577165	Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)
576098	Sit	SHP2 interacting transmembrane adaptor
574268	Spn	Sialophorin
575756	Ssr1	Signal sequence receptor, alpha
583302	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1
5351573	Stat2	Signal transducer and activator of transcription 2
577246	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
575202	Stat4	Signal transducer and activator of transcription 4
5349719	Stat6	Signal transducer and activator of transcription 6
577234	Stam2	Signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
575276		Similar to hypothetical protein BC013035
6474954		Similar to interleukin-1 receptor-associated kinase 2
575348		Similar to p47 protein
573956	MGC65558	Similar to phosphatidylserine decarboxylase
583296		Similar to T-cell receptor alpha
575853	Ssbp2	Single-stranded DNA binding protein 2
577422	Ccl11	Small chemokine (C-C motif) ligand 11
140625	SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
575418	Slc7a11	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11
582202	Sf3a1	Splicing factor 3a, subunit 1
Clone ID	Símbolo	Nome
640508	Sf3b1	Splicing factor 3b, subunit 1
582744	Sfrs1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)
574066	Shc1	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1
583886	Stip1	Stress-induced phosphoprotein 1
576550	Sucdg2	Succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit
640253	Socs1	Suppressor of cytokine signaling 1
131073	SOCS2	Suppressor of cytokine signaling 2
1743667	SUV39H2	Suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
1743667	SUV39H2	Suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
577122	Sdc1	Syndecan 1
577774	Stx17	Syntaxin 17
582871	Takrp	T-cell activation kelch repeat protein

577858	Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein
639758	Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein
582956	Tcra	T-cell receptor alpha chain
574153	Tcrg-V5	T-cell receptor gamma, variable 5
641080	Tscot	Thymic stromal cotransporter
573967	Tox	Thymocyte selection-associated HMG box gene
575486	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1
573365	Tmpo	Thymopoietin
582754	Tmpo	Thymopoietin
582586	Thrap2	Thyroid hormone receptor associated protein 2
155583	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1
46372	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
3991527	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3
148609	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
143480	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1
4951445	Tollip	Toll interacting protein
5326729	Tlr2	Toll-like receptor 2
5325332	Tlr4	Toll-like receptor 4
3966876	Tlr6	Toll-like receptor 6
764549	Tlr9	Toll-like receptor 9
575254		Transcribed locus
575780		Transcribed locus
576502		Transcribed locus
575206		Transcribed locus
582517		Transcribed locus
577462		Transcribed locus
573496		Transcribed sequences
575429		Transcribed sequences
575672		Transcribed sequences
576194		Transcribed sequences
576631		Transcribed sequences
576793		Transcribed sequences
577515		Transcribed sequences
581675		Transcribed sequences
582453		Transcribed sequences
583187		Transcribed sequences
639660		Transcribed sequences
640173		Transcribed sequences
640602		Transcribed sequences
130071		Transcribed sequences
138013		Transcribed sequences

Clone ID	Símbolo	Nome
175161		Transcribed sequences
2645608		Transcribed sequences
5151975		Transcribed sequences
750652		Transcribed sequences
573743		Transcribed sequences
575126		Transcribed sequences
575134		Transcribed sequences
575266		Transcribed sequences
575278		Transcribed sequences
575350		Transcribed sequences
575372		Transcribed sequences
575632		Transcribed sequences
575704		Transcribed sequences
575754		Transcribed sequences
575796		Transcribed sequences

575804	Transcribed sequences
575820	Transcribed sequences
575844	Transcribed sequences
575868	Transcribed sequences
575870	Transcribed sequences
576044	Transcribed sequences
576092	Transcribed sequences
576118	Transcribed sequences
576140	Transcribed sequences
576142	Transcribed sequences
576189	Transcribed sequences
576190	Transcribed sequences
576214	Transcribed sequences
576236	Transcribed sequences
576238	Transcribed sequences
576254	Transcribed sequences
576256	Transcribed sequences
576260	Transcribed sequences
576262	Transcribed sequences
576310	Transcribed sequences
576382	Transcribed sequences
576428	Transcribed sequences
576430	Transcribed sequences
576452	Transcribed sequences
576476	Transcribed sequences
576478	Transcribed sequences
576500	Transcribed sequences
576526	Transcribed sequences
576644	Transcribed sequences
577532	Transcribed sequences
577582	Transcribed sequences
577604	Transcribed sequences
577606	Transcribed sequences
577628	Transcribed sequences
577702	Transcribed sequences
577724	Transcribed sequences
577772	Transcribed sequences
582058	Transcribed sequences

Clone ID	Símbolo	Nome
582106		Transcribed sequences
582178		Transcribed sequences
582226		Transcribed sequences
582248		Transcribed sequences
582250		Transcribed sequences
582268		Transcribed sequences
582274		Transcribed sequences
582298		Transcribed sequences
582312		Transcribed sequences
582316		Transcribed sequences
582322		Transcribed sequences
582336		Transcribed sequences
582338		Transcribed sequences
582346		Transcribed sequences
582360		Transcribed sequences
582362		Transcribed sequences
582369		Transcribed sequences
582370		Transcribed sequences

582394	Transcribed sequences
582442	Transcribed sequences
582488	Transcribed sequences
582490	Transcribed sequences
582514	Transcribed sequences
582626	Transcribed sequences
582632	Transcribed sequences
582652	Transcribed sequences
582680	Transcribed sequences
640776	Transcribed sequences
640777	Transcribed sequences
640778	Transcribed sequences
640779	Transcribed sequences
640780	Transcribed sequences
640781	Transcribed sequences
640782	Transcribed sequences
640783	Transcribed sequences
640784	Transcribed sequences
640785	Transcribed sequences
640786	Transcribed sequences
640787	Transcribed sequences
640788	Transcribed sequences
640789	Transcribed sequences
640790	Transcribed sequences
640791	Transcribed sequences
640792	Transcribed sequences
640793	Transcribed sequences
640794	Transcribed sequences
640795	Transcribed sequences
640796	Transcribed sequences
640797	Transcribed sequences
640798	Transcribed sequences
640799	Transcribed sequences
640800	Transcribed sequences
640801	Transcribed sequences

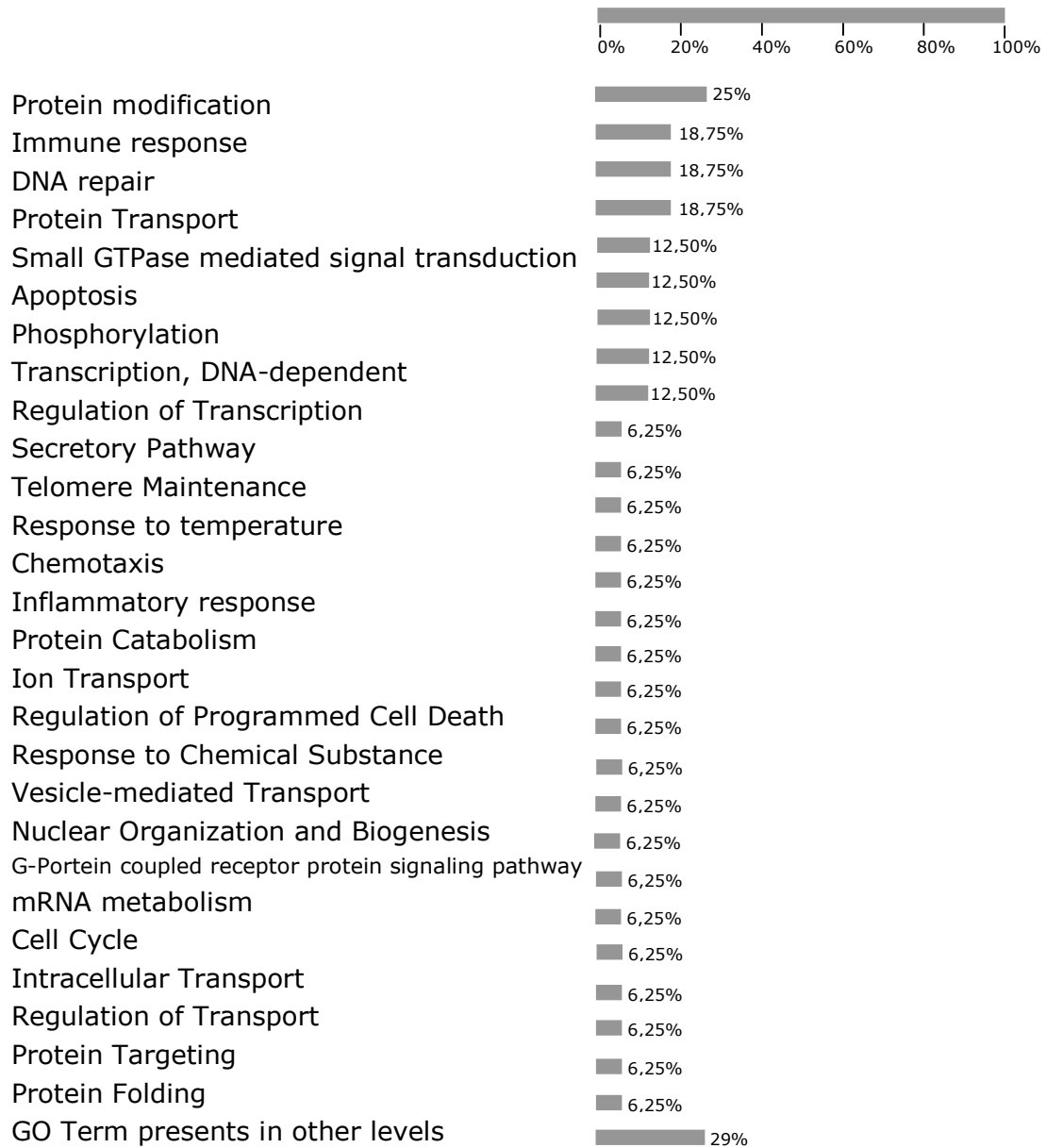
Clone ID	Símbolo	Nome
640802		Transcribed sequences
640803		Transcribed sequences
640804		Transcribed sequences
640805		Transcribed sequences
576200	Tcf7	Transcription factor 7, T-cell specific
43771	CROC4	Transcriptional activator of the c-fos promoter
172421	TGFA	Transforming growth factor, alpha
5353833	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
136821	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
575300	Tpr	Translocated promoter region
576622	Tpr	Translocated promoter region
575732	Tm4sf8	Transmembrane 4 superfamily member 8
576775	Tap1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
576164	Tnpo2	Transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b)
574040	Tnfrsf13b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b
576252	Tnfrsf13b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b
5318426	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
573690	Tnfrsf4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
621020	Tnfrsf6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
575719	Tnfrsf7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
575854	Tra1	Tumor rejection antigen gp96

583533	Txk	TXK tyrosine kinase
575553	Ube1x	Ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X
575033	Nfkb1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
576391	Ube2i	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I
582562	Ube2r2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2
576467	Uble1b	Ubiquitin-like 1 (sentrin) activating enzyme E1B
576642	Uckl1	Uridine-cytidine kinase 1-like 1
577580	2610019N19Rik	Vacuolar protein sorting 4a (yeast)
577311	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
576563	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
34778	VEGF	Vascular endothelial growth factor
181724	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
582976	Vav1	Vav 1 oncogene
574694	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
575296	Waspip	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein
5214347	XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
2243684	XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
2243684	XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
572923	Xlr4	X-linked lymphocyte-regulated 4
2383277	XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
3465421	Xrcc4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
576335	Zap70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase
38347	ZFPM2	Zinc finger protein, multitype 2
577750	Zkscan1	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
576612	Zzz3	Zinc finger, ZZ domain containing 3

ANEXO 2

Anexo 2: Figura fornecida pelo *site* Fatigo (<http://fatigo.bioinfo.cnio.es/>). Classificação dos genes da figura 18 de acordo com seu processo biológico, nível 6.

Biological Process Level: 6



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](#)