



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

BIANCA AMARAL BARBOZA

**O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS É NECESSÁRIO PARA A
MODULAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE
LINFÓCITOS T CD4**

RIO DE JANEIRO

ABRIL

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Bianca Amaral Barboza

O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 DE CÉLULAS DENDRÍTICAS É NECESSÁRIO PARA A MODULAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4.

Tese submetida ao curso de pós-graduação do Programa de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de doutor em Ciências Morfológicas.

Orientador: Dr. João Paulo de Biaso Viola.

Rio de Janeiro
Abril/2010

Barboza, Bianca Amaral

O fator de transcrição NFAT1 de células dendríticas é necessário para a modulação da diferenciação de linfócitos T CD4. Rio de Janeiro, UFRJ, 2010.

XV, 137p, 30f.

Tese: Doutorado em Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Ciências Morfológicas.

1. Células Dendríticas 2. Linfócitos T CD4 3. IFN- γ
4. NFAT

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. II. Título.

BIANCA AMARAL BARBOZA

**O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 DE CÉLULAS DENDRÍTICAS É
NECESSÁRIO PARA A MODULAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE
LINFÓCITOS T CD4**

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do
grau de doutor em Ciências Morfológicas**

Aprovada por:

Dr. João P. B. Viola (Divisão de Biologia Celular/INCA)

Orientador

Prof. Maria Isabel Doria Rossi (Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ)

Presidente da Banca

Prof. Maria Bellio (Instituto de Microbiologia e Imunologia/UFRJ)

Prof. Dario Simões Zamboni (Departamento de Biologia Celular/USP)

Prof. Martin Hernan Bonamino (Divisão de Medicina Experimental/ INCA)



Este trabalho foi realizado na Divisão de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa (CPQ) no Instituto Nacional de Câncer (INCA) sob orientação do Dr. João P. B. Viola, tendo sido financiado pelo Ministério da Saúde, CNPq e FAPERJ.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao meu orientador, Dr. João Viola, que acreditou que eu era capaz de percorrer todo esse trajeto até aqui. Sem dúvida, eu não teria conseguido sem você...Muito Obrigada!

A Bruna Fonseca por ter me ajudado a sensibilizar quase todos os camundongos usados nessa tese e com meus experimentos mirabolantes. E também por todo seu apoio e amizade...Te adoro!

A todos os novos e não tão novos membros do laboratório, André, Amanda, Bruno, Douglas, Flávia, Giu, Paty, Pedro, Renata e Steffi, por terem transformado o laboratório em um lugar muito agradável e divertido de trabalhar. E também pela amizade e apoio de vocês....vou morrer de saudade!

A todos da Medicina Experimental pelo apoio que sempre me deram. Principalmente a Sheila e João Paulo, e a todo grupo da Dr. Adriana Bonomo, que sempre me ajudaram com as questões imunológicas. Em especial ao Dr. Martin Bonamino, por ter feito a revisão desta tese, e sua aluna Carol que me ajudou com as diferenciações de DCs de medula.

A Dr. Anjana Rao por ter me recebido em seu laboratório em Harvard, e ao seu posdoc Dr. Hozefa Bandukwala que me ensinou muito enquanto estive lá. Thank you very much!!

A toda a minha família, por todo apoio que sempre me dão e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Em especial aos meus pais que lutaram com corpo e alma para que eu tivesse oportunidades de chegar onde estou; e ao meu marido, Mauricio, que sempre acreditou em mim e me mostrou os vários lados da ciência, principalmente os bons, e por ter me ajudado com as figuras da tese. Amo muito todos vocês!

RESUMO

O fator de transcrição NFAT1 exerce um papel central na regulação da expressão de uma série de genes envolvidos na resposta imune. Apesar de camundongos deficientes nesse fator de transcrição terem se mostrado imunocompetentes, seus linfócitos T CD4 apresentaram uma tendência para diferenciação Th2, com alta produção de IL-4, IL-5 e IL-13. Entretanto, não parecia claro que papel o NFAT1 exercia na regulação da diferenciação Th1. Com o intuito de entender melhor essa regulação, utilizamos um modelo *in vivo* de sensibilização de camundongos NFAT1^{-/-} com ovalbumina (OVA) e Adjuvante Completo de Freund (CFA). Surpreendentemente, observamos que quando esses animais deficientes foram sensibilizados, seus linfócitos apresentaram uma superprodução tanto de IL-4 quanto de IFN- γ quando foram reestimulados *in vitro* com OVA. A reestimulação *in vitro* desses linfócitos com anti-CD3 mostrou o mesmo perfil Th2 descrito inicialmente, sugerindo que a produção de IFN- γ estaria relacionada com o tipo de estimulação e provavelmente com a participação de células apresentadoras de antígenos (APCs). Observamos que a superprodução de IFN- γ estava correlacionada com a estimulação com a OVA e com a superprodução da citocina IL-12, e que o CFA, apesar de não ter sido fundamental, intensificou essa superprodução de citocinas. Linfócitos T CD4 foram os principais produtores desse IFN- γ , enquanto APCs deficientes em NFAT1 apresentaram a capacidade de induzir uma maior produção de IFN- γ por esses linfócitos. Levando-se em conta que as principais APCs envolvidas nesse processo são as células dendríticas (DCs) e que existe uma escassez de informações sobre o NFAT1 em DCs, avaliamos também neste trabalho esse fator de transcrição neste tipo celular. Demonstramos que a proteína NFAT1 estava presente em DCs e que foi rapidamente ativada após influxo de cálcio. A análise de DCs deficientes em NFAT1 mostrou que este fator de transcrição parece estar envolvido com a geração das DCs, principalmente as do subtipo CD8 α^+ , porém não parece estar envolvido com o processo de maturação destas células. Coculturas de DCs com linfócitos T CD4 de camundongos OT-II demonstraram que DCs deficientes em NFAT1 induzem uma maior diferenciação Th1. Esses resultados demonstram que o fator de transcrição NFAT1 presente em DCs é fundamental para a modulação da diferenciação de linfócitos T CD4, e sugerem que o bloqueio *in vivo* deste fator em DCs aumentaria a diferenciação para Th1, o que possivelmente influenciaria no curso de diversas doenças.

ABSTRACT

The NFAT1 transcription factor plays a central role in the regulation of cytokine gene expression during immune response. Despite the fact that NFAT1-deficient mice are immunocompetent, their lymphocytes presented a bias to Th2 differentiation, with a higher production of IL-4, IL-5 and IL-13. However, the role of NFAT1 in the regulation of Th1 differentiation was not clear. To better understand this regulation, we used an *in vivo* model of sensitization of NFAT1^{-/-} mice with ovalbumina (OVA) and Complete Freund Adjuvant (CFA). For our surprise, we observed a higher production of IL-4 and also IFN- γ when lymphocytes of sensitized mice were re-stimulated *in vitro* with OVA. The re-stimulation of these lymphocytes *in vitro* with anti-CD3 showed the same bias to Th2 as observed initially, suggesting that the IFN- γ production was related to the stimulation model, and probably with the antigen-presenting cells (APCs) participation. We also observed that this higher IFN- γ production was correlated with OVA stimulation and with a higher production of the cytokine IL-12, and though CFA was not essential, it intensified these cytokines production. CD4 T lymphocytes were the main producer of IFN- γ , whereas NFAT1-deficient APCs showed a capacity to induce an increased production of IFN- γ by those lymphocytes. Taking account that the most important APC involved in this process is dendritic cells (DCs) and the lack of information about NFAT1 in DCs, we also evaluated in this work this transcription factor in this cell type. We demonstrated that NFAT1 protein was present in DCs and that it was shortly activated after calcium influx. The NFAT1-deficient DCs analysis showed that this factor is probably involved in DCs generation, especially CD8 α^+ subtype, but probably not in DCs maturation. Co-culture assays of DCs and CD4 T cells from OT-II mice showed that NFAT1-deficient DCs induced an increased Th1 differentiation. All results together demonstrate that NFAT1 transcription factor of DCs is required to modulate CD4 T lymphocyte differentiation, and suggesting that if we could block NFAT1 of DCs *in vivo*, it would increase the bias to Th1, which could act on the course of many diseases.

LISTA DE ABREVIÇÕES

- AP-1** – Proteína de ativação 1.
- APC** – Célula Apresentadora de Antígenos.
- BM-DCs** – Células Dendríticas derivadas *in vitro* a partir da medula óssea.
- CD** – Complexo de Diferenciação.
- cDCs** – Células Dendríticas convencionais.
- CD40L** – Ligante de CD40.
- CLRs** – Receptores semelhantes a lectina-C.
- CFA** – Adjuvante Completo de Freund.
- CRAC** – Canais de cálcio ativados pela liberação de cálcio.
- CsA** – Ciclosporina A.
- CTLA-4** – Antígeno 4 de linfócitos T citotóxico.
- DCs** – Células Dendríticas.
- ELISA** – Ensaio Imunoenzimático.
- FACS** – Separador de células ativado por fluorescência.
- FasL** – Ligante de Fas.
- FLT3** – Receptor semelhante a tirosina quinase 3.
- FLT3L** – Ligante de FLT3.
- GM-CSF** – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos.
- FITC** – Fluoresceína isotiocianato.
- HRP** – Peroxidase de raiz forte.
- IFA** – Adjuvante Incompleto de Freund.
- IFN- γ** – Interferon-gama.
- IFN- γ R** – Receptor do IFN- γ .
- IL-12R** – Receptor de IL-12.
- IL-18R** – Receptor de IL-18.
- IL** – Interleucina.
- LCs** – Células de Langerhans.
- LFA** – Antígeno Funcional de Leucócitos.
- LPS** – Lipopolissacarídeo.
- MACS** – Separação Magnética de células.
- MAP** – Proteína Ativada por Mitógeno.
- MAPK** – MAP quinase.

MHC	– Complexo Principal de Histocompatibilidade.
MLR	– Reação Leucocitária Mista.
MO	– Medula óssea.
NFAT	– Fator Nuclear de células T ativadas.
NFκB	– Fator Nuclear κ B.
NK	– Células Natural Killer.
NLRs	– Receptores semelhantes à NOD.
NLS	– Seqüência de Localização Nuclear.
OVA	– Ovalbumina.
PAMPs	– Padrões de Patógenos.
pDCs	– Células Dendríticas plasmacitóides.
PE	– Ficoeritrina.
PRRs	– Receptores de Reconhecimento de Padrões.
RLRs	– Receptores semelhantes à RIG-I.
RPA	– Ensaio de proteção a RNase.
SFB	– Soro Fetal Bovino.
STAT	– Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição.
T-bet	– T-box expresso em células T.
TCR	– Receptor de Células T.
Th	– Linfócitos T auxiliares.
Treg	– Linfócitos T regulatórios.
TLRs	– Receptores semelhantes à Toll.
TNF	– Fator de Necrose Tumoral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração de DCs <i>in vivo</i>	18
Figura 2: Maturação das DCs.....	22
Figura 3: Diferenciação Th1/Th2.....	28
Figura 4: Diversificação das linhagens de linfócitos T CD4.....	29
Figura 5: Influência da DC na diferenciação Th1.....	31
Figura 6: Membros da família NFAT.....	32
Figura 7: Ativação do NFAT.....	34
Figura 8: Processo de purificação de DCs de baço.....	50
Figura 9: Diferenciação de DCs a partir de células precursoras da medula óssea.....	52
Figura 10: Perfis distintos de produção de IFN- γ frente a diferentes estímulos <i>in vitro</i> com OVA.....	62
Figura 11: Linfócitos T CD4 NFAT1 ^{-/-} diferenciam-se preferencialmente para Th2 quando estimulados com anti-CD3 <i>in vitro</i>	64
Figura 12: Células NFAT1 ^{-/-} expressaram mais IFN- γ após estímulo <i>in vitro</i> com OVA.....	65
Figura 13: Células NFAT1 ^{-/-} apresentaram mais IFN- γ no sobrenadante após estímulo <i>in vitro</i> com OVA.....	66
Figura 14: Células NFAT1 ^{-/-} apresentaram mais IFN- γ no sobrenadante frente a diferentes doses de OVA.....	67
Figura 15: Linfócitos T CD4 foram os principais produtores de IFN- γ após estímulo <i>in vitro</i> com OVA.....	69
Figura 16: Linfócitos T CD4 NFAT1 ^{-/-} expressaram mais de IFN- γ após estímulo <i>in vitro</i> com OVA.....	70
Figura 17: Linfócitos T CD4 foram extremamente importantes para produção de IFN- γ após estímulo <i>in vitro</i> com OVA.....	71
Figura 18: Estímulos microbianos intensificaram a produção de IFN- γ induzida pela OVA.....	73
Figura 19: Células NFAT1 ^{-/-} apresentaram uma maior expressão de IL-12.....	75
Figura 20: Células NFAT1 ^{-/-} apresentaram mais IL-12 no sobrenadante.....	76
Figura 21: IL-12 foi extremamente importante para produção de IFN- γ por linfócitos NFAT1 ^{-/-}	77

Figura 22: APCs NFAT1 ^{-/-} induziram uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T.....	78
Figura 23: DCs NFAT1 ^{-/-} induziram uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4.....	79
Figura 24: DCs NFAT1 ^{-/-} apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1.....	81
Figura 25: DCs de baço apresentaram NFAT1 funcional.....	83
Figura 26: DCs derivadas <i>in vitro</i> da medula óssea também apresentaram NFAT1 funcional.....	85
Figura 27: Camundongos NFAT1 ^{-/-} apresentaram um número maior de DCs no baço.....	87
Figura 28: DCs NFAT1 ^{-/-} apresentaram um maior percentual da subpopulação CD8 α^+	88
Figura 29: DCs NFAT1 ^{-/-} apresentaram o mesmo padrão de maturação que DCs NFAT1 ^{+/+}	90
Figura 30: BM-DCs NFAT1 ^{-/-} também induziram uma maior diferenciação Th1.....	92

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	15
1.1 - Células dendríticas.....	16
1.1.1 - Geração <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	17
1.1.2 - Distribuição <i>in vivo</i>	19
1.1.3 - Subtipos.....	19
1.1.4 - Ativação e Maturação.....	21
1.1.5 - Funções.....	23
1.2 - Linfócitos T CD4.....	24
1.2.1 - Geração.....	24
1.2.2 - Ativação.....	25
1.2.3 - Diferenciação.....	26
1.2.3.1 - Influência das DCs na diferenciação T <i>helper</i>	29
1.3 - Família NFAT.....	32
1.3.1 - NFATs em DCs.....	35
1.3.2 - Camundongos deficientes em NFAT1.....	37
2 - OBJETIVOS.....	40
2.1 - Objetivos Gerais.....	41
2.2 - Objetivos Específicos.....	41
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 - Reagentes e Soluções.....	43
3.1.1 - Anticorpos e reagentes para marcação e estimulação celular.....	43
3.1.2 - Ovalbumina.....	44
3.1.3 - DMEM suplementado.....	44
3.1.4 - Reagentes utilizados para separação celular.....	45
3.1.5 - Reagentes e tampões para western blot.....	45
3.1.6 - Tampão de corrida do RPA.....	46
3.1.7 - Tampões para marcação intracelular de citocinas.....	47
3.2 - Animais.....	47
3.3 - Sensibilização dos animais.....	47
3.4 - Cultura de células.....	48
3.5 - Purificação de células dendríticas do baço.....	48
3.6 - Diferenciação de células dendríticas <i>in vitro</i> a partir da medula óssea.....	51

3.7 - Western blot para NFAT1.....	52
3.8 - Imunofluorescência para NFAT1.....	53
3.9 - Citometria de Fluxo.....	54
3.10 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	54
3.11 - Ensaio de Proteção a RNase (RPA).....	54
3.12 - Marcação intracelular de citocinas.....	55
3.13 - Purificação de linfócitos.....	55
3.14 - Depleção de linfócitos.....	56
3.15 - Diferenciação de linfócitos T CD4 <i>in vitro</i>	57
3.16 - Cocultura de APCs com linfócitos T.....	57
3.17 - Cocultura de DCs com linfócitos T CD4.....	58
3.18 - Análises Estatísticas.....	59
4 - RESULTADOS.....	60
4.1 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior produção de IFN- γ	61
4.2 - Linfócitos T CD4 foram os principais produtores de IFN- γ	68
4.3 - Estímulos microbianos intensificaram a produção de IFN- γ , mas não foram fundamentais para sua produção.....	72
4.4 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior produção de IL-12.....	74
4.5 - APCs deficientes em NFAT1 contribuíram para produção de IFN- γ	78
4.6 - DCs deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1 <i>in vitro</i>	80
4.7 - DCs purificadas de baço ou derivadas de medula óssea apresentaram NFAT1 funcional.....	82
4.8 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram um número maior de DCs.....	86
4.9 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior porcentagem de DCs CD8 α^+	88
4.10 - DCs deficientes em NFAT1 não apresentaram diferença no processo de maturação.....	89
4.11 - BM-DCs deficientes em NFAT1 também apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1 <i>in vitro</i>	91

5 - DISCUSSÃO.....	93
5.1 - Papel do NFAT1 na regulação da produção de IFN-γ.....	94
5.2 - Papel do NFAT1 em DCs.....	101
6 - CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXO.....	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Células Dendríticas

As células dendríticas, também conhecidas como DCs (do inglês, *dendritic cells*), foram descritas e nomeadas pelos pesquisadores Ralph M. Steinman e Zanvil A. Cohn em 1973, como sendo um novo tipo celular, encontrado nos órgãos linfóides periféricos de camundongos, que apresentavam projeções semelhantes a galhos (*dendron*, palavra grega que significa árvore) (STEINMAN & COHN, 1973; STEINMAN, 2007). Entretanto, essa não foi a primeira descrição desse tipo celular. Paul Langerhans em 1868 descreveu um tipo celular com formato estrelado presente na epiderme que ficou conhecido como células de Langerhans (LCs; do inglês, *Langerhans Cells*) (VALLADEAU *et al.*, 2005). Contudo, Paul Langerhans acreditava que as LCs faziam parte do sistema nervoso, e somente em 1976, Silberberg e colaboradores sugeriram que as LCs teriam um importante papel na resposta imunológica (STINGL *et al.*, 1980; SILBERBERG *et al.*, 1976) e em 1985, Schuler e Steinman sugeriram que as LCs seriam DCs (SCHULER & STEINMAN, 1985).

A função das DCs só começou a ficar mais clara entre os anos de 1978 e 1984, quando Steinman e colaboradores mostraram que as DCs eram potentes células estimuladoras da reação leucocitária mista (MLR; do inglês, *Mixed Leukocyte Reaction*) quando comparado a outros tipos celulares (STEINMAN *et al.*, 1978; INABA *et al.*, 1984). Trabalhos subsequentes confirmaram que seu papel principal seria de iniciador e modulador da resposta imune, agindo como Células Apresentadoras de Antígenos profissionais (APCs; do inglês *Antigen-Presenting Cells*) (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

1.1.1 - Geração *in vivo* e *in vitro*

As DCs, assim como todas as células sanguíneas, têm sua origem exclusivamente a partir de células tronco hematopoiéticas na medula óssea (STEINMAN *et al.*, 1974). Inicialmente, acreditava-se que as DCs tinham sua origem a partir de células da linhagem mielóide. As DCs apresentam muitas similaridades com os macrófagos, isto é, podem ser geradas em cultura a partir de monócitos, e estão clonalmente associadas aos granulócitos e macrófagos em culturas de medula óssea que cresceram sobre a influência da citocina “mielóide” GM-CSF (INABA *et al.*, 1993).

Entretanto, a descoberta de que células precursoras da linhagem linfóide, isoladas do timo de camundongos, eram capazes de gerar DCs (ARDAVIN *et al.*, 1993), sugeriu a base da heterogeneidade das DCs, onde precursores linfóides dariam origem a DCs CD8 α^+ , enquanto precursores mielóides dariam origem a DCs CD8 α^- (PULENDRAN *et al.*, 2001). Contudo, uma série de estudos mostrou que tanto progenitores linfóides quanto mielóides podem dar origem aos diversos subtipos DCs (TRAVER *et al.*, 2000; MANZ *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001) (**Figura 1**). A expressão do receptor FLT3 (do inglês, *Fms-Like Tyrosine kinase 3*) pela célula progenitora é o que parece ser fundamental para a geração das DCs (D'AMICO *et al.*, 2003; KARSUNKY *et al.*, 2003) (**Figura 1**).

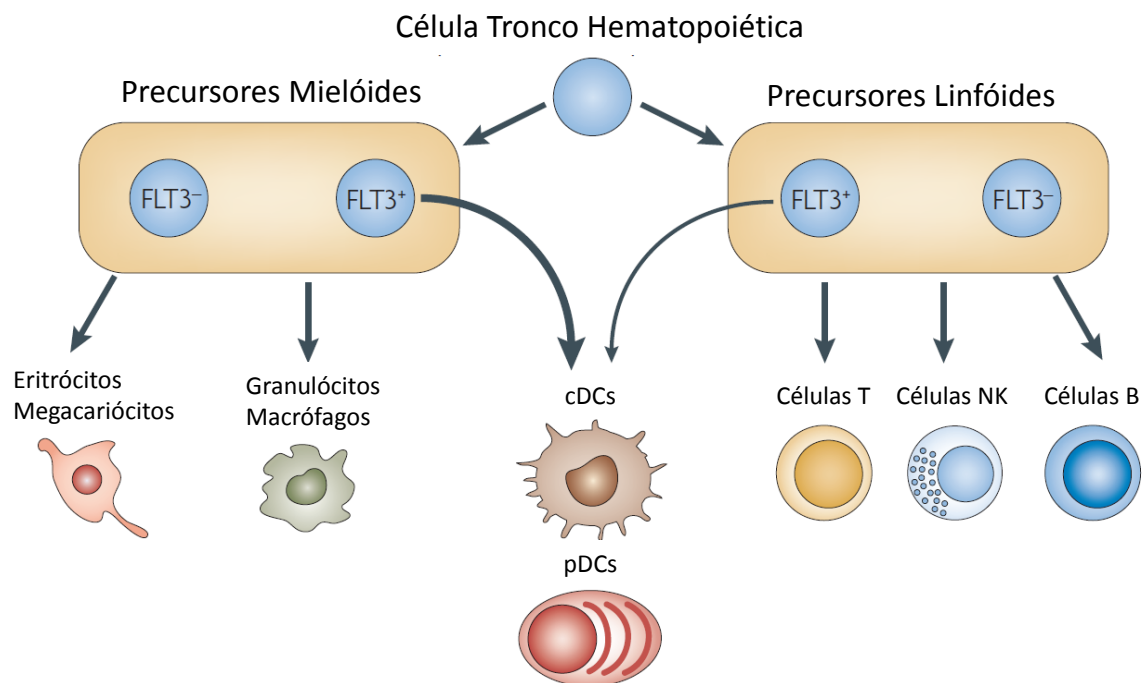


Figura 1: Geração de DCs *in vivo*. O primeiro passo para o desenvolvimento dos tipos individuais de células do sangue é considerado ser a formação de uma série de células precursoras com fortes tendências a linhagem mielóide ou linfóide. Dentre estas, precursosres mielóides e precursosres linfóides que expressam o receptor FLT3 apresentam uma grande capacidade de formar DCs. Tanto cDCs quanto pDCs podem ser geradas a partir de precursosres FLT3⁺. Contudo, precursosres mielóides são a principal fonte de DCs. Adaptado de Shortman *et al.* (2007)

Grande número de DCs pode ser gerado *in vitro* a partir da medula óssea de camundongos, suplementando-se a cultura com a citocina GM-CSF (do inglês, *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (INABA *et al.*, 1992) ou a citocina FLT3L (BRASEL *et al.*, 2000). O mesmo acontece *in vivo*, quando essas citocinas são administradas a camundongos, que após o tratamento apresentam números aumentados de DCs (VREMEC *et al.*, 1997; MARASKOVSKY *et al.*, 1996).

Contudo, somente a citocina FLT3L parece ser crucial para o desenvolvimento de DCs *in vivo*. Camundongos deficientes em GM-CSF ou seu receptor apresentam níveis normais de DCs (VREMEC *et al.*, 1997), enquanto, camundongos deficientes em FLT3L apresentam níveis diminuídos (MCKENNA *et al.*, 2000).

1.1.2 - Distribuição *in vivo*

Depois de serem geradas na medula óssea, as DCs vão se distribuir por quase todos os órgãos do corpo, através da corrente sanguínea. Apenas uma pequena porcentagem de DCs e células precursoras ficam circulantes no sangue periférico, onde constituem aproximadamente 1% das células mononucleares. A grande maioria das DCs reside em órgãos linfóides como baço, linfonodos, medula óssea e timo, onde permanecem por todo seu período de vida e por isso são designadas como “DCs residentes de tecidos linfóides”.

Contudo, praticamente todos os outros órgãos não-linfóides também apresentam DCs, como a pele, pulmão, rim, fígado, coração, cérebro, olhos e trato digestivo (STEINMAN *et al.*, 1991; MILOUD *et al.*, 2010). As DCs de órgãos não-linfóides apresentam a habilidade de capturar antígenos no seu tecido de residência e migrar para órgãos linfóides, principalmente linfonodos drenantes, onde modulam a resposta de linfócitos T. Devido a essa característica, estas DCs são designadas como “DCs migratórias”.

1.1.3 - Subtipos

Desde a descrição inicial dessas células tem se tornado evidente que as DCs são altamente heterogêneas. Conseqüentemente, a definição do que constitui uma DC não é tão clara e direta quanto para outros tipos celulares, como no caso dos linfócitos. As DCs são definidas baseando-se em suas propriedades funcionais (ex. potentes ativadores de linfócitos T) e na combinação de marcadores celulares (na maioria dos casos, as DCs

apresentam em sua superfície a integrina CD11c e uma alta expressão de MHC de classe II) (SATO & FUJITA, 2007).

Devido a essa heterogeneidade, pesquisadores da área vêm tentando classificar as DCs em subtipos, considerando uma série de variáveis como: origem, fenótipo, função e localização (PULENDRAN *et al.*, 2001; SHORTMAN *et al.*, 2002; HOCHREIN *et al.*, 2008; PULENDRAN *et al.*, 2008; HEATH & CARBONE, 2009).

Uma das classificações adotadas pelos pesquisadores divide as DCs em clássicas ou convencionais (cDCs), que seriam DCs que já apresentam características morfológicas de uma DC mesmo em homeostase, e as pré-DCs, que seriam células precursoras que ainda necessitam se desenvolver para adquirir as características marcantes das DCs, como por exemplo, DCs plasmacitóides (pDCs) e monócitos (SHORTMAN *et al.*, 2007).

Existem três subpopulações de cDCs que residem no baço e linfonodos de camundongos e que são classificadas de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD4 e CD8 α (VREMEC *et al.*, 2000; KAMATH *et al.*, 2000). Eles identificaram uma população que expressa somente CD8 α e não expressa CD4 (CD8 α^+ CD4 $^-$), outra que expressa somente CD4 e não expressa CD8 α (CD8 α^- CD4 $^+$) e uma duplo negativa que não expressa nem CD8 e nem CD4 (CD8 α^- CD4 $^-$).

As pDCs se encontram circulantes no sangue, mas também podem ser encontradas tanto em órgãos linfóides quanto em tecidos periféricos. Em homeostase, elas se apresentam na forma arredondada, e somente após ativação, desenvolvem características morfológicas de uma DC (processos dendríticos). Quando ativadas, as pDCs secretam grandes quantidades de interferon (IFN) do tipo I e são importantes nas respostas imunes anti-virais (COLONNA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005).

1.1.4 - Ativação e Maturação

As DCs residem nos órgãos em um estado imaturo. O contato das DCs com patógenos ou com fatores produzidos por células vizinhas em resposta a patógenos, induz sua ativação. Geralmente a ativação das DCs induz um processo conhecido como maturação. Para que a resposta imune se inicie é crucial que ocorra essa maturação (REIS E SOUSA, 2006).

As DCs imaturas possuem uma alta capacidade de captura e processamento de antígenos e uma baixa capacidade de ativar linfócitos T. As DCs podem internalizar eficientemente uma diversidade de tipos de antígenos. Sua alta capacidade de captura é devida a uma alta expressão de receptores que medeiam a endocitose, como receptores de lectina do tipo C, o DEC-205 e receptores Fc (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998) (**Figura 2**). Além disso, essas células possuem uma grande capacidade de fazer macropinocitose, o que permite que elas capturem grandes volumes de fluidos e então concentrem macrossolutos (SALLUSTO *et al.*, 1995).

Durante a maturação, as DCs diminuem a expressão de receptores endocíticos e a endocitose em si, passando a expressar uma série de moléculas usadas na interação com os linfócitos T, como por exemplo, moléculas de MHC (classe I e II), membros da família B7 (CD80, CD86, ICOS-L), membros da família TNF (CD40, OX40L), assim como receptores de quimiocinas (CCR5, CCR7) (TIMMERMAN & LEVY, 1999) (**Figura 2**).

Mediadores inflamatórios, como citocinas e produtos bacterianos, induzem a maturação de DCs e sua migração através do sangue ou de vasos linfáticos aferentes para órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos (TIMMERMAN & LEVY, 1999). Uma vez nesses órgãos, as DCs entram nas áreas ricas em linfócitos T e continuam

sofrendo mudanças em suas propriedades, tornando-se totalmente maduras. As DCs maduras diminuem sua habilidade de capturar antígenos e adquirem uma alta capacidade de atrair e ativar linfócitos T *naive* contra antígenos que foram capturados no tecido periférico (UENO *et al.*, 2007). A interação com os linfócitos T possibilita também a ligação do CD40, presente nas DCs, com o CD40L, presente nos linfócitos. Essa ligação aumenta a viabilidade das DCs, induz sua maturação e aumenta a produção da citocina IL-12 (CELLA *et al.*, 1996).

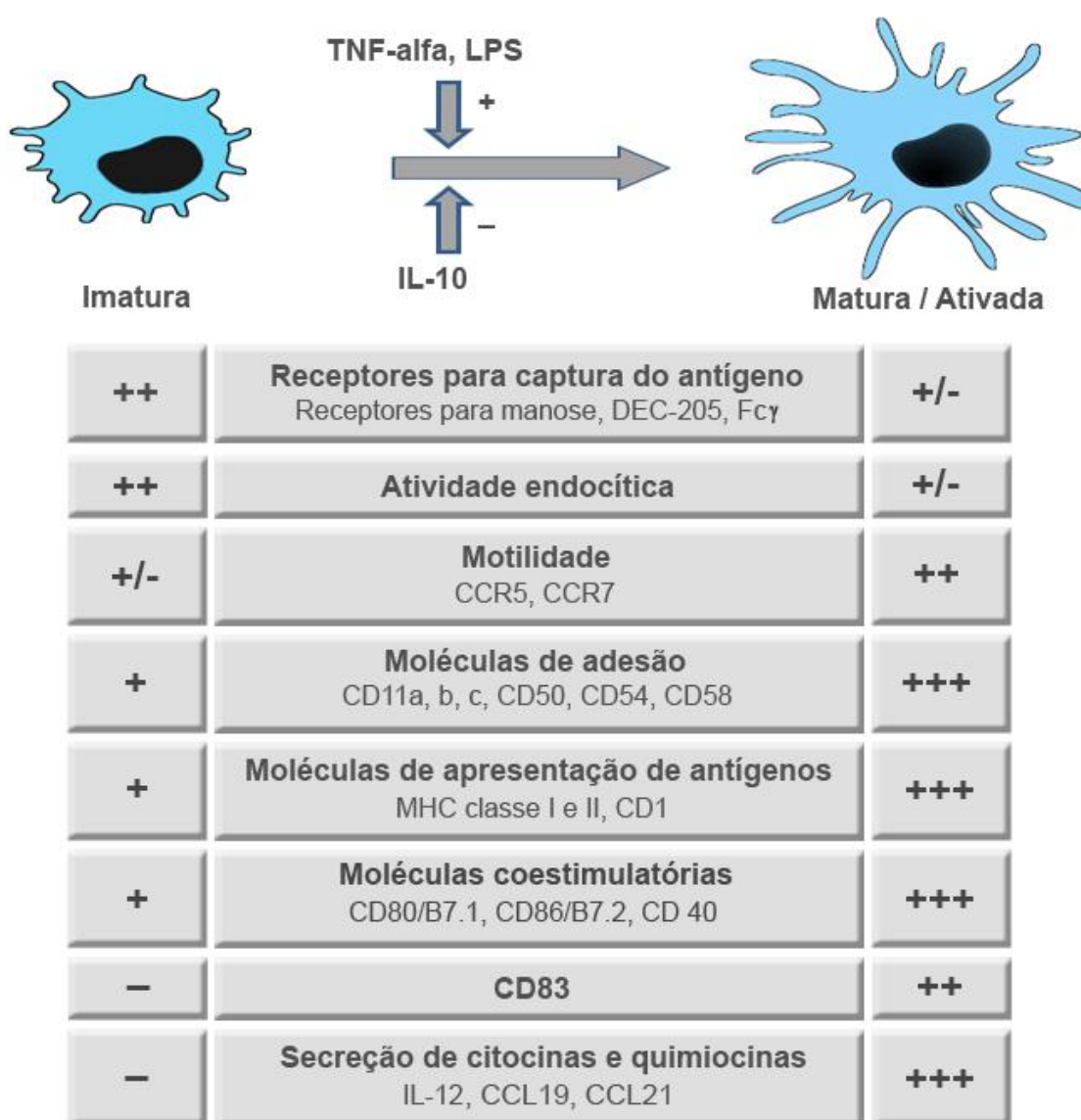


Figura 2: Maturação das DCs. Características das DCs em seu estado imaturo ou maturo (ativado). A maturação das DCs pode ser influenciada por estímulos inflamatórios, citocinas e padrões microbianos (PAMPs). Adaptado de Timmerman & Levy (1999).

1.1.5 - Funções

As DCs servem como sentinelas, reconhecendo a presença de patógenos invasores através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs; do inglês *Pattern-Recognition Receptors*). As DCs expressam uma grande variedade de PRRs, que permitem que elas reconheçam Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs; do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e respondam as infecções (LEE *et al.* 2007).

Os PRRs expressos em DCs podem estar localizados na membrana ou no citoplasma. Os PRRs de membrana, como por exemplo, TLRs (do inglês, *Toll-Like Receptors*) e CLRrs (do inglês, *C-type lectin-Like Receptors*), têm duas funções principais: promover a fagocitose microbiana e iniciar vias de sinalização intracelular (TRINCHIERI *et al.* 2007; BROWN *et al.* 2006). Os PRRs citoplasmáticos, que podem ser dos tipos NLRs (do inglês, *NOD-Like Receptors*) e RLRs (do inglês, *RIG-I-Like Receptors*), reconhecem bactérias intracelulares e vírus, respectivamente, desencadeando vias de sinalização que cooperam com as vias ativadas por PRRs de membrana (CREAGH *et al.* 2006).

Os diversos subtipos de DCs, que estão distribuídas em diferentes microambientes ao longo do corpo, são capazes de detectar diferentes tipos de patógenos e modular classes distintas de respostas imunes (PULENDRAN *et al.*, 2008).

As DCs presentes nos tecidos periféricos migram para os órgãos linfóides durante a inflamação e infecção, onde induzirão uma resposta imune adaptativa, ativando tanto linfócitos T CD4 e CD8, quanto linfócitos B. Contudo, as DCs estão continuamente patrulhando os órgãos periféricos, a linfa e os tecidos linfóides mesmo em homeostase. Essa migração permite que as DCs tenham a oportunidade de capturar antígenos próprios

e proteínas do ambiente continuamente para garantir a tolerância imunológica (STEINMAN *et al.*, 2000).

1.2 - Linfócitos T CD4

1.2.1 - Geração

Assim como as DCs, os linfócitos também são gerados na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas. Contudo, os linfócitos se originam somente de progenitores que se comprometeram com a linhagem linfóide (**Figura 1**). Os linfócitos do tipo B, também conhecidos como células B, deixam a medula óssea para habitarem órgãos linfóides secundários com seu processo de diferenciação praticamente completo, isto é, prontos para reconhecer e responder aos antígenos. Enquanto que os linfócitos T, ou células T, precisam terminar sua formação no timo antes que possam ser funcionais.

Existem dois tipos de células T, um que expressa a molécula de superfície CD4 e o outro que expressa CD8. Os linfócitos T CD8 apresentam atividade citotóxica e são fundamentais na resposta imune contra microorganismos intracelulares e tumores, enquanto os linfócitos T CD4 são extremamente importantes para determinar o curso de uma infecção. Eles direcionam a resposta imune através da secreção de citocinas que agem modulando a função de outras células ou delas próprias (SZABO *et al.*, 2003). Entretanto, para que isso ocorra, os linfócitos T CD4 precisam ser ativados e diferenciados, para assim adquirir suas funções efetoras.

1.2.2 - Ativação

Os linfócitos T CD4 são ativados através da ligação de seu receptor TCR (do inglês, *T Cell Receptor*) à molécula de MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe II complexada a um peptídeo. O TCR dos linfócitos T CD4 precisa ter afinidade tanto com o MHC quanto com o peptídeo que está sendo exposto. Com isso, somente uma pequena porcentagem dos linfócitos terá essa especificidade e será ativada.

Para que os linfócitos *naive* sejam ativados, somente a ativação da via de sinalização do TCR (primeiro sinal) não é suficiente. Para isso, ela deve ser acompanhada pelo “segundo sinal” que é resultado da ligação de moléculas coestimulatórias. As APCs expressam uma série de moléculas coestimulatórias, como o CD80 e CD86, que interagem com moléculas complementares presentes nos linfócitos T, como o CD28 ou o CTLA-4. Somente as APCs, como macrófagos, linfócitos B e DCs, expressam MHCs de classe II e as moléculas coestimulatórias necessárias para a ativação desses linfócitos.

Apesar de todas as APCs serem capazes de ativar os linfócitos T, acredita-se que as DCs sejam as APCs iniciais, pois estão presentes nos locais de entrada do antígeno e são mais eficientes em capturar, processar e apresentar os antígenos (JENKINS *et al.*, 2001). Também são mais eficientes em migrar para as áreas ricas em células T dos órgãos linfóides secundários (ITANO *et al.*, 2003).

1.2.3 - Diferenciação

Os linfócitos T CD4, também chamados T *helper* (Th), quando são ativados, proliferam, diferenciam-se e adquirem suas funções efetoras. Inicialmente, foram descritos somente dois subtipos de linfócitos T *helper*, Th1 e Th2, que eram capazes de produzir grupos distintos de citocinas e conseqüentemente apresentavam funções distintas (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Uma vez diferenciados, os linfócitos Th1 secretam IFN- γ e TNF- α (SZABO *et al.*, 2003). Estes estão preferencialmente envolvidos com a eliminação de parasitas intracelulares por serem importantes ativadores de macrófagos (CONSTANT & BOTTOMLY, 1997). Já os linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 e estão envolvidos com a eliminação de antígenos extracelulares, por serem importantes na ativação de eosinófilos e da imunidade humoral (CONSTANT & BOTTOMLY, 1997). A diferenciação Th1/Th2 deve ser muito bem controlada, pois uma resposta Th1 exacerbada pode levar à destruição tecidual e ao surgimento de doenças autoimunes, enquanto uma exacerbada resposta Th2 pode gerar atopia e asma alérgica (SZABO *et al.*, 2003).

O surgimento de um determinado subtipo se dá a partir do padrão de sinais recebidos pelo linfócito durante sua interação inicial com o antígeno. As citocinas são um dos principais sinais que influenciam nessa diferenciação. Os linfócitos que são ativados na presença de IL-12 e IFN- γ se diferenciam em células do tipo Th1, enquanto os que são ativados na presença de IL-4 se tornam células do tipo Th2 (SZABO *et al.*, 2003).

Durante essa diferenciação, ocorre ativação de uma série de fatores de transcrição que são importantes para determinar o padrão de citocinas que essa célula irá produzir.

Existem fatores envolvidos somente com o fenótipo Th1, e outros envolvidos somente com o fenótipo Th2, e ainda os que estão envolvidos nos dois tipos de diferenciação, como o NFAT e NFκB (HO & GLIMCHER, 2002). Os fatores de transcrição são importantes principalmente na transcrição das citocinas, contudo também podem promover a transcrição de outros fatores de transcrição ou de receptores, como exemplificado abaixo.

Após os linfócitos T CD4 entrarem em contato com IFN- γ , ocorre a ativação de STAT1 que induz a transcrição de T-bet (AFKARIAN *et al.*, 2002). T-bet, por sua vez, aumenta a transcrição de IFN- γ nessa célula e induz a expressão da subunidade β 2 do receptor de IL-12, aumentando ainda mais a produção de IFN- γ e o estabelecimento do fenótipo Th1 (AFKARIAN *et al.*, 2002) (**Figura 3**).

Já quando linfócitos T CD4 entram em contato com IL-4, ocorre a ativação de STAT6 que induz a transcrição de GATA-3 e c-Maf, fatores importantes na produção de IL-4, IL-5 e IL-13; e no estabelecimento do fenótipo Th2 (RENGARAJAN *et al.*, 2000) (**Figura 3**).

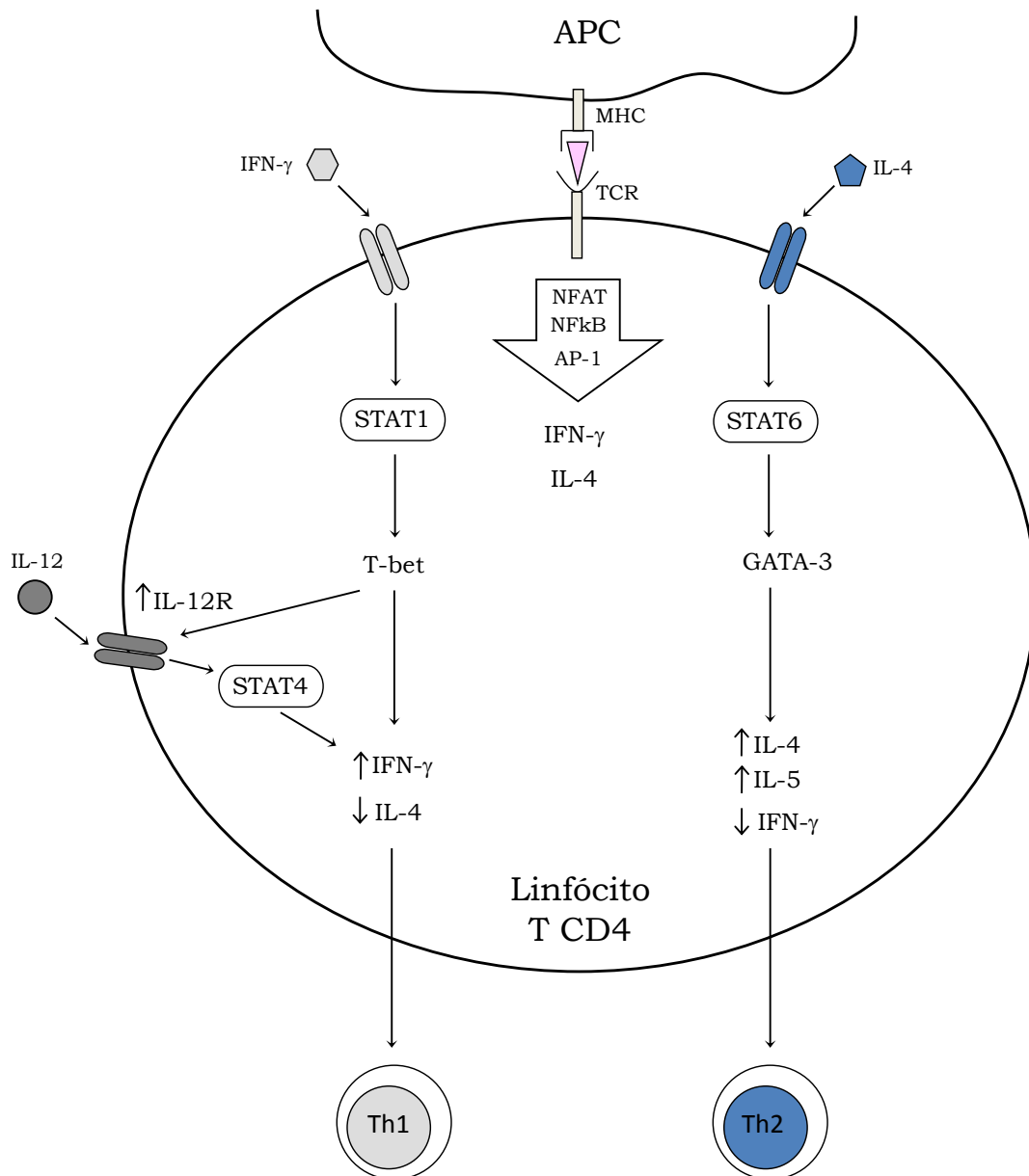


Figura 3: Diferenciação Th1/Th2. Se o linfócito T CD4 *naive* que está sendo ativado pela APC entrar em contato com o IFN- γ , este ativa STAT1 que induz a expressão de T-bet, que juntamente com outros fatores de transcrição, induz a expressão do IFN- γ e do receptor de IL-12 e assim estabelecendo a diferenciação Th1. Caso o linfócito T CD4 *naive* que está sendo ativado pela APC entre em contato com a IL-4, esta ativa STAT6 que induz a expressão de GATA-3, que juntamente com outros fatores de transcrição, induz a expressão de IL-4 e a diferenciação Th2. Adaptado de Szabo *et al.*, 2003.

Muito tempo depois da descrição inicial dos subtipos Th1 e Th2, foram descritos outros subtipos de linfócitos T CD4 (**Figura 4**), como Th17, que está envolvido na resistência a uma variedade de infecções; e os regulatórios, chamados Treg, que inibem a resposta contra antígenos próprios ou do ambiente (WEAVER *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2008).

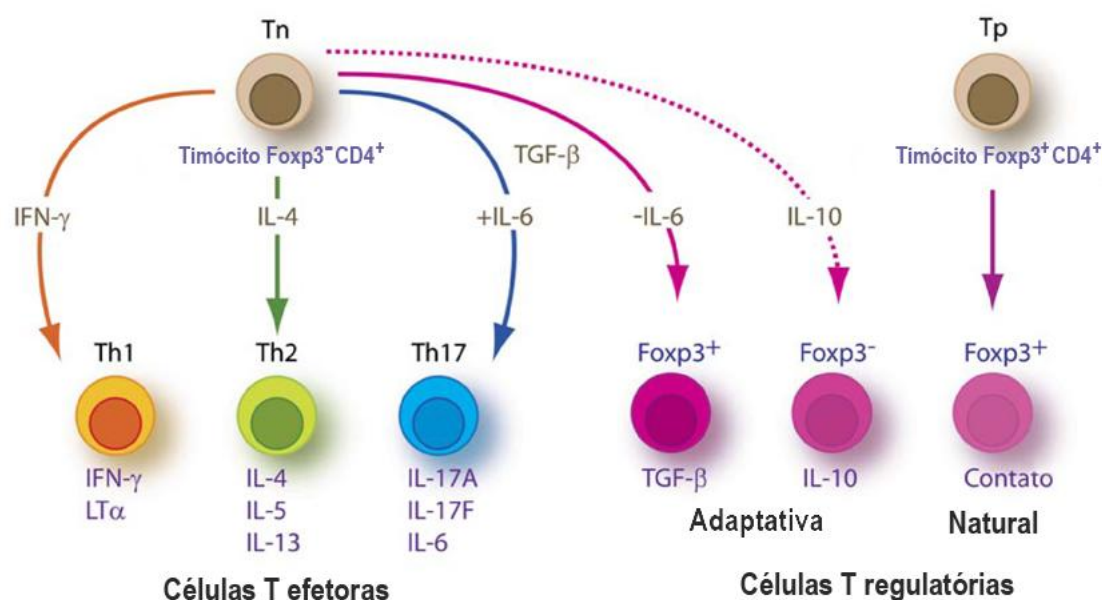


Figura 4: Diversificação das linhagens de linfócitos T CD4. Apesar da diferenciação T CD4 ter sido definida pelo paradigma Th1/Th2 por quase duas décadas, o número de possíveis linhagens aumentou consideravelmente nos últimos tempos. Adaptado de Weaver *et al.* (2006).

1.2.3.1 - Influência das DCs na diferenciação T *helper*:

As DCs têm um papel central na ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4. Além das DCs apresentarem o antígeno através de moléculas de MHC de classe II e fornecerem as moléculas coestimulatórias necessárias para gerar células efetoras, elas secretam citocinas, que serão de extrema importância na diferenciação T *helper* (KAPSENBERG *et al.*, 2003).

O subtipo de DC envolvida influencia na diferenciação T *helper* (MOSER & MURPHY, 2000). Em camundongos, as DCs CD8 α ⁺ estimulam a diferenciação Th1,

enquanto que as $CD8\alpha^-$ estimulam a diferenciação Th2 (MALDONADO-LÓPEZ *et al.*, 1999). Sabe-se que a DC $CD8\alpha^+$ é um dos subtipos que produz IL-12 e IFN- γ , logo capazes de promover a diferenciação Th1, enquanto as $CD8\alpha^-$ produzem muito pouco dessas citocinas (OHTEKI *et al.*, 1999; PULENDRAN *et al.*, 2001).

Como já mencionado anteriormente, as citocinas são de extrema importância para a diferenciação de linfócitos T CD4. Para diferenciação Th1, as citocinas mais importantes são o IFN- γ , a IL-12 e a IL-18. Apesar de não sabermos a fonte inicial do IFN- γ , sabe-se que ele é importante para estabilizar o fenótipo Th1, suprimindo a produção de IL-4 (ZHANG *et al.*, 2001) e para induzir a expressão do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) através de T-bet (AFKARIAN *et al.*, 2002). APCs, principalmente DCs, poderiam ser a fonte inicial de IFN- γ e com isso influenciarem a diferenciação Th1 (FRUCHT *et al.*, 2001), contudo existem ainda dúvidas se as APCs seriam realmente capazes de produzir IFN- γ e qual seria sua real relevância (BOGDAN *et al.*, 2006).

Já as citocinas IL-12 e IL-18 são produzidas quase exclusivamente por APCs, como macrófagos e DCs (SZABO *et al.*, 2003), e agem sinergicamente na produção de IFN- γ (OKAMURA *et al.*, 1998; STOBER *et al.*, 2001). A produção inicial de IL-12 e IL-18 pela DC pode ser induzida através da ativação de PRRs (AKIRA *et al.*, 2001). A produção de IL-12 pode ser intensificada após a interação da DC com o linfócito T, através da ligação CD40-CD40L (CELLA *et al.*, 1996). Contudo, a IL-12 e a IL-18 só poderão agir sobre os linfócitos após a indução de seus receptores. Como as DCs possuem expressão constitutiva dos receptores de IL-12 e IL-18, essas citocinas são capazes de induzir a produção de IFN- γ por essas células (STOBER *et al.*, 2001). O IFN- γ então age sobre os linfócitos T CD4 induzindo a expressão da subunidade β 2 do receptor da IL-12 (AFKARIAN *et al.*, 2002). A IL-12 agora é capaz de agir no linfócito, aumentando a produção de IFN- γ e induzindo a expressão do receptor da IL-18 (AKIRA,

2000). A IL-18 age então aumentando ainda mais a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4 e estabelecendo assim o fenótipo Th1 (AKIRA, 2000) (**Figura 5**).

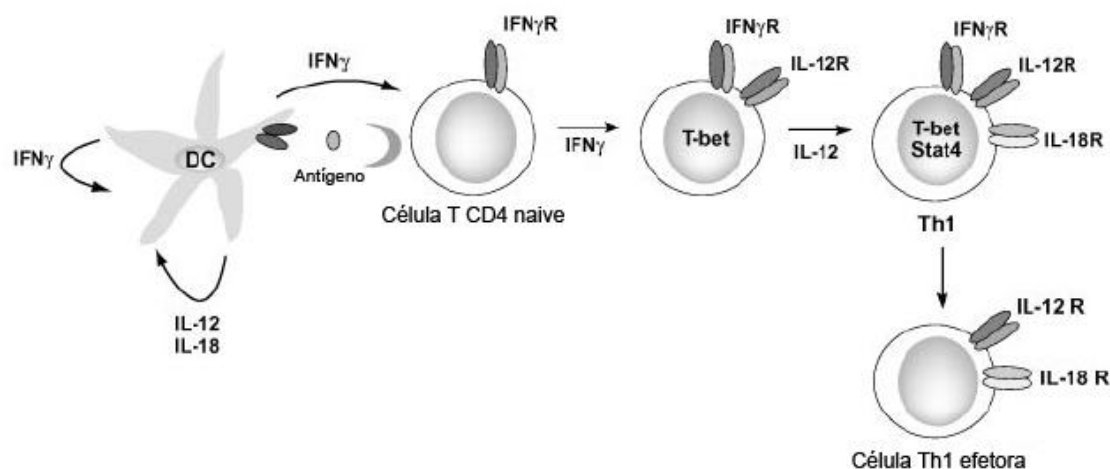


Figura 5: Influência da DC na diferenciação Th1. Os patógenos invasores induzem a DC a produzir IL-12 e IL-18, que agem sobre a DC induzindo a produção de IFN- γ . O IFN- γ vai agir sobre a própria DC e sobre os linfócitos T CD4 *naive* que estiverem interagindo com ela. O IFN- γ vai se ligar a seu receptor, que já está presente em linfócitos *naive*, induzindo a expressão de T-bet, que por sua vez, induz a expressão do IFN- γ e do receptor β 2 da IL-12. A IL-12, vinda da DC, pode agora agir sobre o linfócito em diferenciação ativando STAT4 que aumentará a produção de IFN- γ e induzirá a expressão do receptor α da IL-18. A IL-12 e IL-18 agirão sinergicamente na célula Th1 induzindo uma alta produção de IFN- γ . Figura adaptada de Szabo *et al.* (2003).

Esses subtipos de DCs estão principalmente concentrados em áreas distintas. As DCs CD8 α^+ são encontradas nas áreas ricas em linfócitos T do baço, de linfonodos e das placas de Peyer; enquanto que as DCs CD8 α^- estão localizadas nas zonas marginais do baço, nos sinus subcapsulares dos linfonodos e na região subepitelial das placas de Peyer (PULENDRAN *et al.*, 2001). Uma vez que as DCs são potentes iniciadoras da resposta imune e que são capazes de modular o tipo de resposta, as diferenças entre os subtipos podem ser a chave para correlacionar a rota de administração do antígeno com o surgimento de diferentes respostas imunológicas (PULENDRAN *et al.*, 2001).

1.3 - Família NFAT

O fator nuclear de células T ativadas (NFAT) foi inicialmente descrito em células T, entretanto foi posteriormente encontrado também em outros tipos celulares. O NFAT é uma família de fatores de transcrição composta por 5 membros, o NFAT1 (NFATp, NFATc2), o NFAT2 (NFATc, NFATc1), o NFAT3 (NFATc4), o NFAT4 (NFATx, NFATc3) e o NFAT5 (TonE-BP) (RAO *et al.*, 1997; LOPEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 1999), que são expressos diferencialmente em células linfóides e não linfóides (**Figura 6**).

O NFAT1 é expresso principalmente em células e tecidos do sistema imune, como por exemplo, linfócitos T e B, células NK, mastócitos, monócitos e macrófagos, porém, não está presente em neutrófilos (WANG *et al.*, 1995). O NFAT1 também pode ser encontrado em alguns tecidos do sistema nervoso, como epitélio e bulbo olfativos (HO *et al.*, 1994).

Família NFAT			
Membros	Nomes alternativos	Regulação	Expressão no sistema imune
NFAT-1	NFATc2 e NFATp	Cálcio - calcineurina	✓
NFAT-2	NFATc1 e NFATc	Cálcio - calcineurina	✓
NFAT-3	NFATc4	Cálcio - calcineurina	✗
NFAT-4	NFATc3 e NFATx	Cálcio - calcineurina	✓
NFAT-5	TonEBP e OREBP	Estresse osmótico	✓

Figura 6: Membros da família NFAT. A família NFAT é composta por cinco membros, nomeados de 1 a 5, sendo que cada um deles apresenta nomenclaturas alternativas. Os quatro primeiros membros são regulados pela via cálcio-calcineurina, enquanto o último membro está envolvido com o estresse osmótico. Com exceção do NFAT3, todos os outros membros são encontrados no sistema imunológico. Adaptado de Macian *et al.* (2005).

Os quatro primeiros membros da família são ativados após a estimulação de receptores acoplados à mobilização de cálcio, como os receptores de antígenos das células B e T, receptores Fc γ e Fc ϵ , e receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (RAO *et al.*, 1997). Enquanto o último membro está associado ao estresse osmótico (**Figura 6**).

O aumento dos níveis intracitoplasmáticos de cálcio ativa a enzima calcineurina (fosfatase dependente de cálcio-calmodulina). Essa enzima desfosforila o NFAT, que está presente constitutivamente no citoplasma, na forma fosforilada. Uma vez desfosforilado, o NFAT expõe sua sequência de localização nuclear (NLS) e transloca para o núcleo onde modula a expressão de uma série de genes (RAO *et al.*, 1997) (**Figura 7**).

A ativação de outras vias, como a via das Ras/MAP quinases, levam à ativação de outros fatores de transcrição, como c-Fos e c-Jun (dímero chamado de AP-1), que cooperam com o NFAT na região promotora dos genes (RAO *et al.*, 1997)

A ativação do NFAT pode ser bloqueada através de drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A (CsA) e o FK506, que são capazes de inibir a atividade da enzima calcineurina (RAO *et al.*, 1997) (**Figura 7**).

O NFAT pode se ligar a regiões promotoras e amplificadoras (*enhancers*) de diversos genes, principalmente genes que codificam citocinas, como a IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF e IFN- γ , e receptores de superfície, como o CD40L, o CTLA-4 e o FasL (RAO *et al.*, 1997). Essas proteínas estão envolvidas com vários eventos durante a resposta imune, como por exemplo, na diferenciação dos linfócitos T *helper*, na inflamação, na alergia e, possivelmente, em doenças auto-imunes.

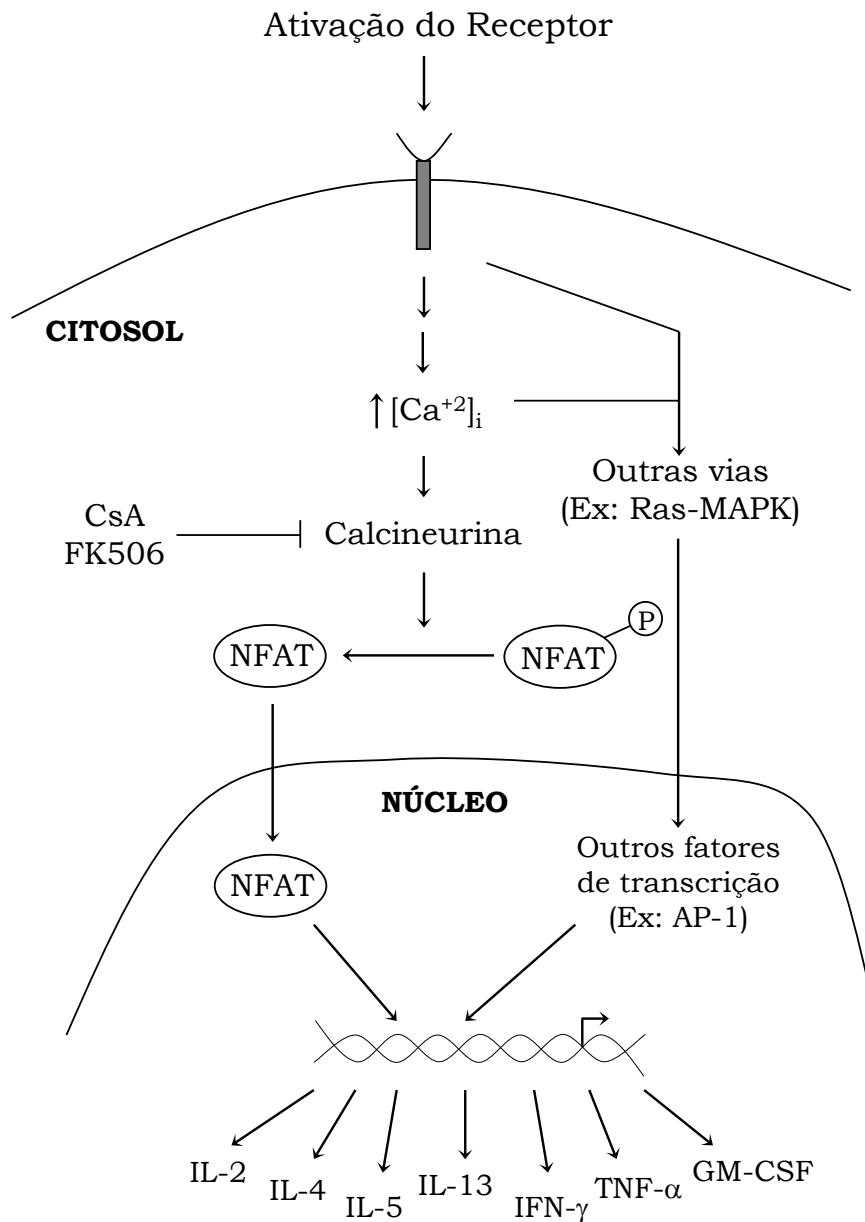


Figura 7: Ativação do NFAT. Alguns receptores celulares induzem a um aumento dos níveis intracitoplasmáticos de cálcio que leva a ativação da enzima calcineurina. Essa desfosforila o NFAT, que transloca para o núcleo, onde em cooperação com outros fatores de transcrição, modula a expressão de uma série de genes. Drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A (CsA) e o FK506 bloqueiam a atividade da calcineurina, bloqueando assim, a ativação do NFAT. Adaptado de Rao (1994).

1.3.1 - NFATs em DCs:

Pouco se sabe sobre a expressão e função dos membros da família NFAT em DCs. Aparentemente, DCs derivadas de medula óssea de camundongos expressam os 4 membros regulados por cálcio (XU *et al.*, 2009). Entretanto, existem poucas vias conhecidas que induzem cálcio em DCs (FESKE, 2007), e menores ainda são aquelas que levam à ativação dos NFATs.

Foi demonstrado que ATP induz influxo de cálcio em DCs mielóides de camundongo através de canais de cálcio do tipo CRAC (canais de cálcio ativados pela liberação de cálcio), de forma semelhante ao que ocorre em linfócitos T (HSU *et al.*, 2001). Porém, ainda não há descrição se os membros da família NFAT seriam ativados por esse estímulo e quais genes estariam sendo regulados.

Sabe-se que o influxo de cálcio, induzido tanto pelo ATP quanto por ionóforo de cálcio, leva à maturação das DCs, com aumento de MHC de classe II e moléculas coestimulatórias (HSU *et al.*, 2001; FARIES *et al.*, 2001). O tratamento de DCs com CsA inibe o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (LEE *et al.*, 1999), e a apresentação de antígenos (LEE *et al.*, 2005), porém não afeta a expressão das moléculas de MHC (LEE *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2005). Apesar de existirem evidências de que a maturação de DCs induzida por influxo de cálcio seja mediada pela fosfatase calcineurina (ENGELS *et al.*, 2000), ainda não se sabe qual é o envolvimento dos NFATs nesta maturação.

Perrin-Cocon *et al.* (2004) demonstraram de forma indireta que a fosfolipase A2 secretória (sPLA₂) pode induzir a ativação de NFATs em DCs humanas derivadas de monócitos do sangue, entretanto as vias envolvidas nessa ativação ainda não são conhecidas.

A via mais dissecada até momento mostra que o receptor de β -glicanos, dectina-1, quando estimulado com zymosan ou curdlan é capaz de induzir influxo de cálcio, através da ativação de Syk e fosfolipase $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$), que consequentemente ativa NFAT (ROGERS *et al.*, 2005; GOODRIDGE *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009) (revisado em GOODRIDGE *et al.*, 2008). Frente ao estímulo de zymosan, os NFATs parecem estar envolvidos com a expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2) e a consequente produção de prostaglandina-E2 (PGE_2), assim como na regulação da expressão de algumas citocinas como IL-2, IL-12 e IL-10, mas não em outras como TNF- α e IL-6 (GOODRIDGE *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não foi demonstrado quais membros da família NFAT estariam envolvidos nesta via.

Trabalhos mais recentes demonstraram funções individuais para alguns membros da família NFAT. Zanoni *et al.* (2009) demonstraram que lipopolissacarídeo (LPS) ativa NFAT1 através de uma via exclusivamente dependente de CD14, e independente de TLR4 (revisado em GRANUCCI *et al.*, 2008). A ativação de NFAT1 via CD14 parece ser necessária para regular o ciclo de vida das DCs, causando a morte por apoptose de DCs terminalmente diferenciadas (ZANONI *et al.* 2009). Enquanto que Kayama *et al.* (2009) demonstraram que *Trypanosoma cruzi* é capaz de ativar NFAT2, e que essa ativação seria importante para induzir a produção de IFN- γ por DCs. Eles demonstraram que DCs derivadas de fígado fetal de camundongos deficientes NFAT2 se desenvolvem normalmente, contudo apresentam, quando estimuladas com *T. cruzi*, uma diminuição da expressão de IFN- γ e IL-12p40, mas não de IL-6 e TNF (KAYAMA *et al.*, 2009). Entretanto, a via pela qual *T. cruzi* estaria ativando o NFAT2 ainda não foi demonstrada.

Todavia, ainda serão necessários muitos estudos nesta área para se identificar novas vias de ativação e esclarecer que papéis cada membro da família NFAT exerce em DCs. Provavelmente ainda levará certo tempo para que fique estabelecido que os

membros da família NFAT também estão envolvidos em vias de sinalização em células do sistema imune inato, e não somente em células da resposta imune adaptativa, como podemos evidenciar na revisão feita por Geijtenbeek *et al.* (2009).

1.3.2 - Camundongos deficientes em NFAT1

Para se entender melhor o papel individual de cada membro da família NFAT, foram gerados camundongos deficientes desses fatores (revisado em MACIAN *et al.*, 2005) Os camundongos deficientes em NFAT1 se desenvolveram normalmente e são imunocompetentes (XANTHOUDAKIS *et al.*, 1996; HODGE *et al.*, 1996). Diferente do que se esperava, eles apresentaram um aumento da resposta imune, com um discreto aumento do baço, além de hiperproliferação linfocitária e hipereosinofilia (XANTHOUDAKIS *et al.*, 1996; HODGE *et al.*, 1996). Contudo, uma das principais características desses animais foi apresentar um maior desvio da resposta imune para o tipo Th2, com aumento da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e diminuição de IFN- γ (KIANI *et al.*, 1997; VIOLA *et al.*, 1998), sugerindo que o NFAT1 regularia negativamente a formação da resposta Th2.

Com o intuito de entender os mecanismos envolvidos nessa superprodução de citocinas do tipo Th2, Kiani *et al.* (1997) observou que esse aumento era dependente da IL-4, uma vez que, quando anticorpos neutralizantes eram adicionados à cultura, a produção das citocinas Th2 diminuía aos níveis dos animais normais (NFAT1^{+/+}). Eles também observaram uma diminuição da expressão e dos níveis protéicos de IFN- γ nos animais NFAT1^{-/-}, que também parecia ser dependente de IL-4, já que, quando a IL-4 era bloqueada, os níveis de IFN- γ subiam, chegando aos níveis dos animais NFAT1^{+/+} (KIANI *et al.*, 1997).

Para esclarecer esse fenômeno, Kiani *et al.* (2001) analisaram a produção de IFN- γ em animais duplo deficientes para NFAT1 e IL-4. Eles observaram que mesmo não produzindo IL-4, os linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} produziram menos IFN- γ quando comparados aos linfócitos NFAT1^{+/+}. Sugerindo, portanto, que a produção diminuída de IFN- γ nos animais NFAT1^{-/-} não seria devido à alta produção de IL-4 e que o NFAT1 teria um papel central no controle da expressão do IFN- γ .

Todos esses trabalhos mostraram que o NFAT1 teria um papel central na regulação da diferenciação de linfócitos T CD4, diretamente regulando a expressão das citocinas ou através de mecanismos indiretos. Contudo, todos os estudos feitos até então para avaliar esse papel do NFAT1 utilizaram estimulações de linfócitos T CD4 *in vitro* com anti-CD3, não avaliando de fato como seria o papel do NFAT1 na diferenciação T *helper* em uma condição mais fisiológica.

Alguns modelos de infecção *in vivo* foram realizados com esse intuito (KIANI *et al.*, 1997). Kiani *et al.* (1997) demonstraram que animais NFAT1^{-/-} foram inicialmente suscetíveis à infecção por *Leishmania major*, porém curam a doença mais tardiamente. Essa suscetibilidade foi revertida com a administração de anticorpos anti-IL-4. Contudo, o IFN- γ também é extremamente importante para a cura dessa doença (REINER *et al.*, 1995) e estes animais apresentaram níveis normais de expressão de IFN- γ após 4 semanas da infecção, o que nos indica que o IFN- γ estaria exercendo seu papel normalmente e poderia estar sendo o responsável pela cura tardia desses animais. Estes resultados nos indicam então que, dependendo do modelo utilizado, o NFAT1 pode regular de forma diferencial a expressão de certas citocinas e conseqüentemente a diferenciação de linfócitos T CD4.

O melhor entendimento do papel do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação T *helper* em modelos fisiológicos seria de grande valia na clínica. Considerando que o

balanço entre as respostas Th1/Th2 pode definir a cura de uma determinada doença ou o surgimento de outra, a intervenção específica deste fator pode ser uma alternativa no tratamento clínico.

Para esclarecermos então o papel do NFAT1 na diferenciação T *helper* em uma situação fisiológica, utilizamos um modelo de sensibilização de camundongos com ovalbumina (OVA) e Adjuvante Completo de Freund (CFA). Este modelo é aparentemente menos complexo que um modelo de infecção, facilitando assim as análises e interpretações. Além disso, nosso laboratório já possuía protocolos estabelecidos para esse modelo e os utilizavam para análises da hiperproliferação de linfócitos NFAT1^{-/-}, o que nos facilitou enormemente o início deste trabalho (CAETANO *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

Estudar o papel do fator de transcrição NFAT1 nos mecanismos da diferenciação de linfócitos T CD4 em um modelo *in vivo* de sensibilização de camundongos com OVA e CFA. Considerando o papel central das DCs nesse mecanismo de diferenciação e a escassez de informações nesta área, estudaremos também o papel deste fator de transcrição especificamente nesse subtipo celular.

2.2 - Objetivos Específicos

1. Analisar o perfil de produção de citocinas no modelo de sensibilização.
2. Analisar o papel das diferentes populações linfocitárias no modelo de sensibilização.
3. Analisar o papel do CFA usado na sensibilização no perfil de produção de citocinas.
4. Analisar o papel de citocinas envolvidas com a diferenciação T CD4 no modelo de sensibilização.
5. Analisar o papel das APCs, principalmente das DCs, no perfil de produção de citocinas no modelo de sensibilização.
6. Avaliar a expressão e ativação do fator de transcrição NFAT1 em DCs purificadas de baço ou diferenciadas *in vitro* a partir da medula óssea.
7. Avaliar o papel do NFAT1 na biologia das DCs, como em seu processo de diferenciação, de maturação e na sua influência na diferenciação de linfócitos T CD4.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES

3.1.1 – ANTICORPOS E REAGENTES PARA MARCAÇÃO E ESTIMULAÇÃO CELULAR

Todos os anticorpos conjugados a fluocromos ou a biotina foram adquiridos das empresas BD PharMingen ou eBioscience e possuem especificidade contra moléculas murinas. Segue a lista dos anticorpos utilizados neste trabalho: anti-CD3-FITC (clone 145-2C11), anti-CD4-FITC (clone GK1.5), anti-CD4-PE (clone GK1.5), anti-CD4-biotinilado (clone L3T4), anti-CD8-FITC (clone Ly-2), anti-CD8-PE (clone Ly-2), anti-CD8-biotinilado (clone Ly-2), anti-B220-FITC (clone RA3-6B2), anti-B220-biotinilado (clone RA3-6B2), anti-CD11b-FITC (clone M1/70), anti-CD11c-FITC (clone HL3), anti-MHC classe II (IA-IE)-biotinilado (clone 2G9), anti-CD80-PE (clone 16-10A1), anti-CD86-PE (clone GL1), anti-CD40-PE (clone 3/23), anti-IFN- γ -PE (clone XMG1.2), anti-IL-4-APC (eBioscience; clone 11B11), anti-IL-2-PE (eBioscience; clone JES6-5H4), anti-IL-10-APC, anti-PanNK-biotinilado (clone DX5). Para anticorpos biotinilados, utilizou-se estreptavidinas conjugadas a FITC ou PE (PharMingen). Para estimulação *in vitro* de linfócitos T foi utilizado o anticorpo IgG de cabra contra a molécula total de IgG de hamster (ICN Pharmaceuticals) aderido a placa, juntamente com anticorpo anti-CD3 de hamster (hibridoma 2C11). Para inibição dos receptores Fc foi utilizado o anticorpo anti-CD16/CD32 (hibridoma 2.4G2). Para o ensaio de bloqueio de atividade, utilizou-se o anticorpo contra a IL-12 murina (Prepotech). Para western blot e imunofluorescência utilizou-se o anticorpo policlonal de coelho contra o NFAT1 (67.1) (Dr. Anjana Rao, Harvard University, Boston, MA), o anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a rodamina ou peroxidase (KPL) e DAPI (Molecular Probes). Para

estimulação das DCs e linfócitos T CD4, utilizou-se zymosan, Pam₃Cys (Pam₃Cys-Ser-(lys)₄; EMC Microcollections), Isonomicina (Calbiochem), PMA e CsA (LC Laboratories).

3.1.2 - OVALBUMINA

Foi feita uma solução estoque de 4 mg/mL de ovalbumina (OVA; Sigma) em PBS (Biolab), onde utilizou-se 1 parte dessa solução para uma parte de Adjuvante Completo de Freund ou Adjuvante Incompleto de Freund (CFA ou IFA, do inglês, *Complete Freund Adjuvant* ou *Incomplete Freund Adjuvant*; Sigma) para sensibilização ou diluiu-se em diferentes concentrações para cultura de células. Para a retirada do LPS, foi feita uma solução concentrada de 100 mg/mL de OVA. Essa solução foi então passada por uma coluna para remoção de endotoxinas (Detoxi-gelTM Endotoxin Removing Gel – PIERCE) e depois diluída para a concentração estoque de 4 mg/mL em solução fisiológica apirogênica.

3.1.3 - DMEM SUPLEMENTADO

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified eagle's médium) (Gibco) foi diluído em água MilliQ e adicionou-se 3,75 g/L de bicarbonato de sódio para tamponamento do pH. Em seguida, o meio foi suplementado com os seguintes reagentes (todos da Invitrogen Life Technologies): 10 mL de piruvato de sódio, 10 mL de vitaminas, 10 mL de aminoácidos não essenciais, 20 mL de aminoácidos essenciais e 10 mL de penicilina/estreptomicina. O pH foi ajustado para 7.4 e adicionou-se 10 mL de HEPES, 10 mL de L-glutamina e 1 mL de β-mercaptoetanol (55 μM). O meio foi então

avolumado para 1 L com água Milliq. A este meio suplementado foram adicionados 100 mL de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) de forma a se ter 10% deste no volume total.

3.1.4 – REAGENTES UTILIZADOS PARA SEPARAÇÃO CELULAR

Para selecionar positivamente ou negativamente diferentes populações celulares utilizou-se colunas magnéticas MACS (Miltenyi Biotech) do tipo BS ou CS, esferas magnéticas (*beads*) conjugadas ao anticorpo anti-FITC ou a estreptavidina, e tampão MACS. Utilizou-se também para selecionar negativamente linfócitos T CD4 e DCs o kit de separação magnética Dynabeads (Invitrogen).

Tampão MACS (PBS com 0,5% de SFB e 2 mM de EDTA).

Solução de ACK (Para 100 mL, utilizou-se 0,722 g de NH_4Cl , 0,358 g de Na_2HPO_4 , 0,0372 g de EDTA e 0,168 g de NaHCO_3 , ajustou-se o pH para 7.2 e avolumou-se com água destilada).

3.1.5 – REAGENTES E TAMPÕES PARA WESTERN BLOT

Tampão de ressuspensão (40mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de EDTA e 60 mM de pirofosfato de sódio).

Tampão de separação 4x (Para 500 mL, utilizou-se 90,5 g de Tris-base, 2,5 g de SDS, pH 8.8,)

Gel de separação 6% (4,8 mL de bis-acrilamida 30% (29:1; BIORAD), 6 mL do tampão de separação 4x e 13.1 mL de água destilada; 200 µL de persulfato de sódio 10% e 20 µL de TEMED).

Tampão de empacotamento 4x (Para 200 mL, utilizou-se 12,1 g de Tris-base, 0,8 g de SDS, pH 6.8.)

Gel de empacotamento 4% (1,35 mL de bis-acrilamida 30% (29:1), 2,5 mL do tampão de empacotamento 4x e 6,1 mL de água destilada; 70 µL de persulfato de sódio 10% e 20 µL de TEMED).

Tampão de amostra 5x (Para 75 mL, utilizou-se 4,2 g de Tris-base, 10 mL de glicerol, 10 mL de azul de bromofenol 0,1%, 15 g de SDS e ajustou-se o pH para 6.8. Para cada 3 mL dessa solução adicionou-se 1 mL de β-mercaptoetanol).

Tampão de corrida 10x (Para 1 L, utilizou-se 30,3 g de Tris-base, 144 g de glicina e 10 g de SDS).

Tampão de transferência (7,57 g de Tris-base, 36,05 g de glicina, 0,5 L de metanol e 2 L de água destilada).

TBS-T (Para 1 L de TBS, utilizou-se 12 g de Tris-base, 90 g de NaCl e ajustou-se o pH para 7,4. Para preparar o TBS-T, adicionou-se 0,05% de Tween-20).

Solução de bloqueio (TBS com 5% de leite desnatado).

3.1.6 - TAMPÃO DE CORRIDA DO RPA

O tampão de corrida utilizado no RPA foi o TBE. Para se fazer o tampão concentrado 10x, utilizou-se 54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico e 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8 para 500 mL de TBE. Para a corrida diluiu-se o TBE 10x para 0,5x.

3.1.7 – TAMPÕES PARA MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINA

Tampão de marcação (1% de SFB, 0,09% (m/v) de azida de sódio, avolumou-se com PBS 1x e ajustou-se o pH para a faixa 7.4 – 7.6).

Tampão de permeabilização (Para 100 mL da solução, utilizou-se 5 mL de saponina 10% e avolumou-se com tampão de marcação).

3.2 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos, com 8 a 12 semanas de idade, das seguintes linhagens: C57Bl/6; geneticamente deficientes para NFAT1 (NFAT1^{-/-}) e seu respectivo controle (NFAT1^{+/+}) (XANTHOUDAKIS *et al.*, 1996); e transgênico com TCR específico para OVA restrito ao MHC classe II (OT-II) (BARNDEN *et al.*, 1998). Os animais foram cruzados e mantidos no biotério do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

3.3 - SENSIBILIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram sensibilizados subcutaneamente nas patas traseiras com 200 µg de OVA emulsificada em CFA ou IFA. Após 15 dias da sensibilização, os animais foram sacrificados e os linfonodos drenantes das patas (inguinal e poplíteo) e/ou o baço foram retirados e macerados para dissociação das células.

3.4 - CULTURA DE CÉLULAS

Todas as culturas de células foram realizadas utilizando o meio de cultura DMEM suplementado como descrito no item 3.1.3. Em alguns experimentos, as células foram estimuladas com doses variadas de OVA (0,3, 0,5 ou 1,0 mg/mL) ou com 1 µg/mL de anti-CD3 ligado à placa com anti-IgG (0,3 mg/mL), com a adição ou não de anti-IL-12 (1,0 µL/mL), e mantidas em estufas úmidas a 37°C, em uma taxa de 5% de CO₂.

3.5 - PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DO BAÇO

Para podermos estudar as DCs de baço, estabelecemos alguns protocolos de purificação e obtenção destas. Estabelecemos um protocolo baseando-se em alguns já descritos na literatura (FUKAO *et al.*, 2000; HOCHREIN *et al.*, 2001). Este protocolo iniciou-se com a dissociação das células do baço em uma solução contendo 2 mg/mL de colagenase I (Gibco) por 45 minutos a 37°C. As hemácias foram então lisadas com uma solução de ACK, onde utilizou-se 1 mL da solução para cada baço. Essa suspensão foi incubada por 5 minutos e adicionou meio de cultura para inibição da reação. As células restantes foram ressuspensas em HBSS 1x e incubadas por 5 minutos com 20 mM de EDTA para desfazer as interações celulares. A suspensão celular resultante continha cerca de 5% de DCs (células CD11c positivas – **Figura 8**, Pré-percoll).

Antes da purificação, fizemos um enriquecimento através de um gradiente de percoll, onde foram retirados principalmente os granulócitos. As células foram colocadas sobre um gradiente de Percoll (Amersham) 54% e centrifugadas a 2000g por 10 minutos, à temperatura ambiente. As células da interfase foram recolhidas e lavadas para retirada

do percoll. A suspensão celular após o percoll passou a ter em torno de 30% de DCs (**Figura 8**, Pós-percoll/Pré-coluna).

As células foram então incubadas com anti-CD16/32 por 15 minutos para bloquear a ligação da porção Fc dos anticorpos as células. As células foram ressuspensas em Tampão MACS e marcadas com o anticorpo anti-CD11c-FITC durante 30 minutos. As células foram centrifugadas, suspensas novamente em Tampão MACS e marcadas com esferas magnéticas (anti-FITC) por 30 minutos. As células foram então passadas na coluna magnética do tipo CS (MACS – Miltenyi Biotec) e aproximadamente 30 mL de Tampão MACS foram utilizados para lavar e retirar as células não desejadas. Com a coluna fora do suporte, foi injetado com a seringa Tampão MACS na coluna e, depois de recolocar a coluna no suporte, aproximadamente 15 mL de Tampão MACS foram utilizados para retirar as células não desejadas. Este último procedimento foi executado duas vezes. Para se retirar as células desejadas da coluna, este ultimo procedimento foi executado três vezes com a coluna sempre fora do suporte. Ao final da purificação, obtivemos um grau de pureza que variou de 60 a 95% (**Figura 8**, Pós-coluna).

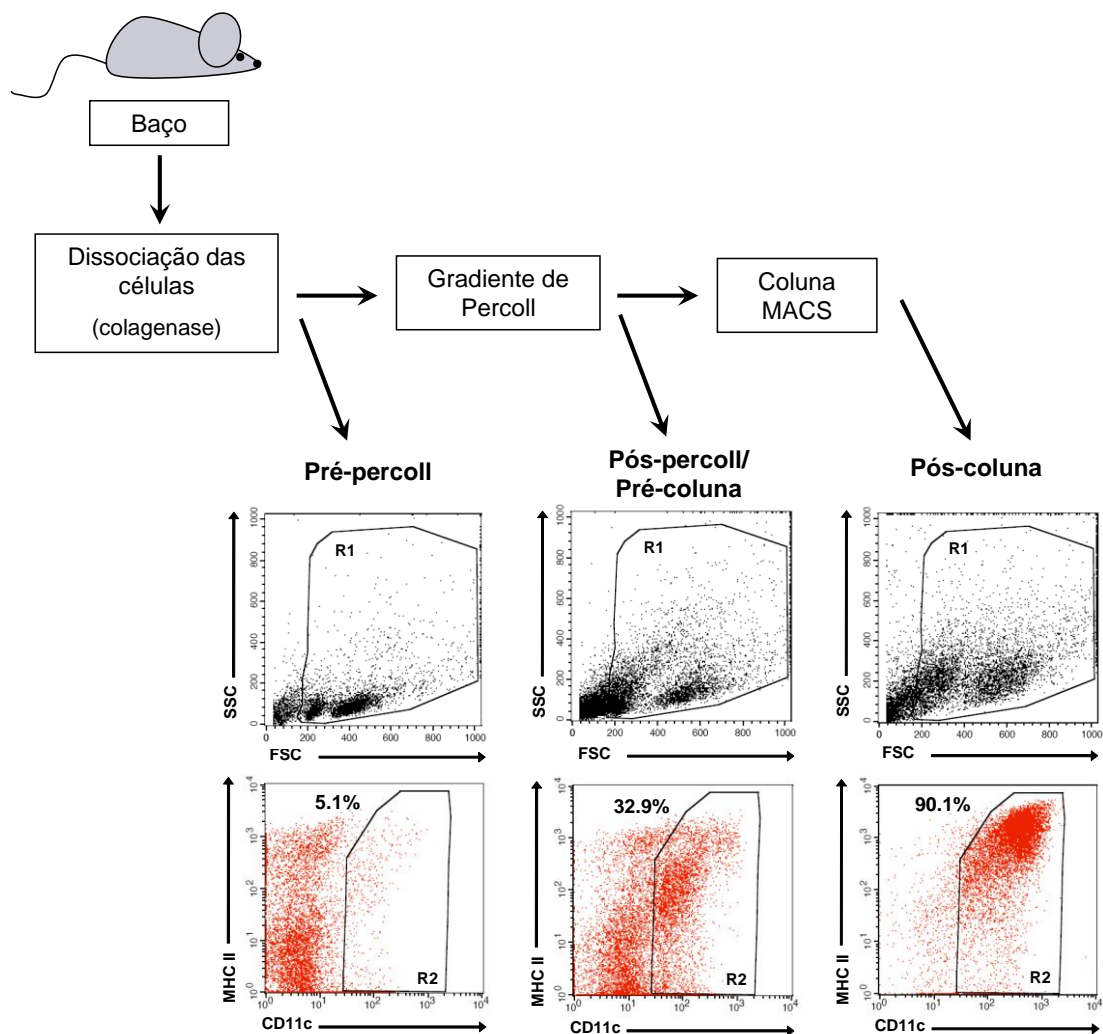


Figura 8: Processo de purificação de DCs de baço. Esquema mostra resumidamente o processo de purificação de DCs de baço; e o perfil das células ao longo da purificação. As células do baço foram dissociadas em uma solução contendo collagenase. As células foram enriquecidas em um gradiente de percoll e purificadas em colunas MACS. As células foram marcadas com anti-CD11c e anti-MHCII e analisadas por citometria de fluxo. A primeira fileira de *dotplots* mostra o perfil SSCxFSC das células ao longo do processo de purificação, enquanto que a segunda mostra as marcações fluorescentes de CD11c e MHC II dos eventos contidos dentro da região selecionada R1. A região selecionada R2 mostra a porcentagem de células CD11c positivas.

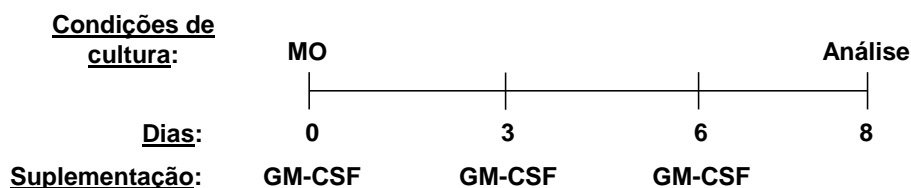
Para a técnica de imunofluorescência utilizamos a seleção por Dynabeads para purificar DCs de baço. O procedimento utilizado para isso foi igual ao descrito anteriormente, porém após o enriquecimento com o gradiente de percoll, as células foram marcadas com uma solução contendo diversos anticorpos contra as populações celulares

não desejadas e selecionadas negativamente através de um magneto, como descrito pelo fabricante. O grau de pureza obtido variou de 50 a 70% (dados não mostrados).

3.6 - DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS *IN VITRO* A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA

Uma forma de se obter grandes quantidades de DCs é através da diferenciação *in vitro* destas a partir de células precursoras da medula óssea (BM-DCs; do inglês, *Bone Marrow-Dendritic Cells*) (INABA *et al.*, 1992). Neste protocolo, as células da medula óssea foram cultivadas *in vitro* na presença de GM-CSF (Prepotech) por 8 dias. A medula óssea foi retirada do fêmur de camundongos *naive* e parte das células (2×10^6) foi plaqueada em 10 mL de meio na presença de GM-CSF (20 ng/mL) em uma placa de 10 cm (Corning; não tratadas). No 3º dia de cultura, foram adicionados 5 ou 10 mL de meio com GM-CSF (20 ng/mL). No 6º dia de cultura, foram retirados 7 ou 10 mL do meio da placa e adicionados 7 ou 10 mL de meio fresco com GM-CSF (20 ng/mL). No 8º dia, as células pouco aderentes foram recolhidas e utilizadas. Para se analisar a porcentagem de DCs presentes nesta suspensão celular, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD11c e anti-MHC II; e analisadas por citometria de fluxo. Obtivemos um grau de pureza que variou de 60 a 80% (**Figura 9**).

A



B

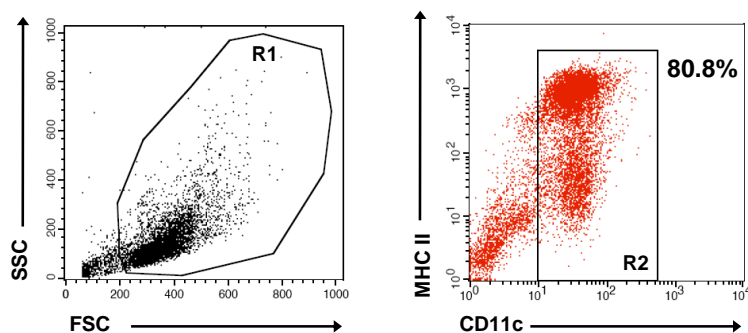


Figura 9: Diferenciação de DCs a partir de células precursoras da medula óssea. (A) Células da medula óssea (MO) do fêmur de camundongos foram colocadas em cultura com GM-CSF (dia 0). Nos dias 3 e 6, adicionou-se meio fresco contendo GM-CSF. No dia 8, as células foram recolhidas, marcadas com anti-CD11c e anti-MHCII e analisadas por citometria de fluxo. (B) O primeiro *dotplot* mostra o perfil SSCxFSC das células, enquanto que o segundo mostra as marcações fluorescentes de CD11c e MHC II dos eventos contidos dentro da região selecionada R1. A região selecionada R2 mostra a porcentagem de células CD11c positivas.

3.7 – WESTERN BLOT PARA NFAT1

Para avaliar a expressão da proteína NFAT1, as células foram ressuspensas em 20 μL de tampão de ressuspensão, lisadas com 20 μL de SDS 10% e adicionou-se 10 μL de tampão de amostra 5x. Esse lisado foi incubado a 100°C por 15 minutos. O extrato total de proteínas foi submetido à eletroforese de poli-acrilamida (SDS-PAGE) num gel de concentração de 6%, juntamente com um padrão de peso molecular (BIO-RAD). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana

foi incubada sob agitação com solução de bloqueio por 2 horas e em seguida incubada com o anticorpo primário anti-NFAT1 diluído (1:1000) em TBS-T por 2 horas. Após 3 lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (HRP) diluído (1:15.000) em TBS-T por 1 hora. Após mais 6 lavagens a membrana foi revelada com o kit ECL, como indicado pelo fabricante (Amersham) e autoradiografado.

3.8 - IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA NFAT1

DCs purificadas de baço, através do kit Dynabeads, foram deixadas durante 4 horas para aderir em lamínulas previamente tratadas com gelatina 2% (15 minutos a 37°C). Depois da adesão, as células foram deixadas sem estímulo ou foram estimuladas com ionomicina (5 μ M) por 10 minutos a 37°C. CsA (2 μ M) foi adicionada 15 minutos antes da estimulação. As células foram então fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. A superfície das DCs foram marcadas com o anticorpo anti-CD11c-biotinilado (1:100) e posteriormente com estreptavidina-FITC (1:100). As células foram então permeabilizadas com tampão de lavagem (PBS com 5% de SFB e 0,5% de NP-40) e incubadas com o anticorpo primário anti-NFAT1 (1:100) por 2 horas. Após algumas lavagens, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a rodamina (1:100) por 30 minutos e com DAPI por 1 minuto. As lamínas foram montadas utilizando 5 μ L de N-propil-galato para conservação da fluorescência. As imagens foram então obtidas em um microscópio de fluorescência (Olympus BX60).

3.9 - CITOMETRIA DE FLUXO

As células marcadas com fluocromos foram analisadas no FACScalibur (Becton Dickinson), utilizando o Cell Quest (Becton Dickinson) como programa para aquisição e análise dos dados.

3.10 - ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para medir as concentrações das citocinas, $1,0$ ou $2,0 \times 10^6$ células/poço foram cultivadas em placa de 24 poços de fundo chato e estimuladas ou não com OVA ou anti-CD3. O sobrenadante livre de células foi analisado quanto aos níveis das proteínas IFN- γ , IL-4 e IL-12 p70 através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), como descrito pelo fabricante (PharMingen, PharMingen e Prepotech).

3.11 - ENSAIO DE PROTEÇÃO A RNASE (RPA)

Para analisar a expressão gênica do IFN- γ e da IL-12 nas células totais do linfonodo, $1,0 \times 10^7$ células/poço foram cultivadas em placas de 6 poços de fundo chato e estimuladas com $0,5$ mg/mL de OVA. Após 6, 24 e 48 horas as células foram recolhidas e o RNA total foi extraído, utilizando Trizol (Gibco) como descrito pelo fabricante. Para analisar a expressão de IFN- γ em linfócitos T CD4 purificados, $6,0 \times 10^7$ células totais do linfonodo foram cultivadas em placas de 10 cm e estimuladas com $0,5$ mg/mL de OVA. Após 24 horas, os linfócitos T CD4 foram purificados e o RNA total dessas células foi extraído utilizando Trizol como descrito pelo fabricante. A expressão dos RNAs mensageiros foi analisada utilizando o kit de RPA, como descrito pelo fabricante

(PharMingen), através da hibridização de 3 a 4 µg de RNA com a sonda mCK-2 (IL-12 p35, IL-12 p40, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, MIF, IL-6 e IFN- γ), sendo a normalização das massas de RNA feita através da expressão de dois genes constitutivos, o L32 e o GAPDH. Após a secagem, o gel foi revelado por auto-radiografia.

3.12 - MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS

Para detecção da produção de IFN- γ nas diferentes populações de linfócitos do linfonodo, $2,0 \times 10^6$ células/poço foram cultivadas em placa de 24 poços de fundo chato e estimuladas com 0,5 mg/mL de OVA. Cinco horas antes de completar 72 horas, foi adicionada brefeldina A 1:1000 (como indicado pelo fabricante - PharMingen). As células foram primeiramente incubadas com anti-CD16/32 para bloquear a ligação da porção Fc dos anticorpos por 15 minutos. Em seguida foram marcadas na superfície com anticorpos fluorescentes anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-PanNK ou anti-CD11b durante 15 minutos, fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos, permeabilizadas com uma solução contendo saponina 0,5% (tampão de permeabilização) por 10 minutos e marcadas intracelularmente com o anticorpo anti-IFN- γ por 30 minutos. As células foram lavadas entre cada etapa com tampão de marcação ou com tampão de permeabilização. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo.

3.13 - PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS

Os linfócitos T e B foram purificados a partir das células totais do linfonodo através de colunas magnéticas MACS para seleção negativa. As células foram suspensas em Tampão MACS e marcadas com anticorpos específicos contra as populações não

desejadas durante 15 minutos. Foram utilizados os anticorpos anti-CD8 e anti-B220 para purificar linfócitos T CD4, somente anti-B220 para purificar linfócitos T; anti-CD4 e anti-CD8 para purificar linfócitos B. As células foram centrifugadas, suspensas novamente em Tampão MACS e marcadas com esferas magnéticas (estreptavidina ou anti-FITC) por 15 minutos. As células foram então colocadas na coluna magnética e aproximadamente 30 mL de Tampão MACS foram utilizados para lavar e recolher as células de interesse. O grau de purificação das células foi analisado através de marcações de citometria de fluxo com anticorpos específicos para cada população linfocitária. Foram obtidos graus de pureza que variaram entre 80 e 92%.

3.14 - DEPLEÇÃO DE LINFÓCITOS

Os linfócitos T CD4, T CD8 e B foram depletados a partir das células totais do linfonodo através de colunas magnéticas MACS para seleção negativa. As células foram suspensas em Tampão MACS e marcadas com anticorpos específicos contra as populações a serem depletadas (anti-CD4-biotinilado, anti-CD8-biotinilado ou anti-B220-biotinilado) durante 15 minutos. As células foram centrifugadas, suspensas novamente em Tampão MACS e marcadas com esferas magnéticas (estreptavidina) por 15 minutos. As células foram então colocadas na coluna magnética e aproximadamente 30 mL de Tampão MACS foram utilizados para lavar e recolher as células de interesse. O grau de purificação das células foi analisado através de marcações de citometria de fluxo com anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD8-FITC. Foram obtidos graus de pureza que variaram entre 80 e 92%.

3.15 - DIFERENCIAÇÃO DE LINFOCITOS T CD4 *IN VITRO*

Linfócitos T CD4 purificados de linfonodos de camundongos *naive* NFAT1^{-/-} ou NFAT1^{+/+} foram diferenciados *in vitro* em condições neutras, isto é, sem adição de citocinas (condição conhecida como *default*). As células foram estimuladas com anti-CD3 ligado à placa (1 µg/ml). Após 24 horas, foi adicionado IL-2 (20U/mL) a cultura. No terceiro dia, as células foram recolhidas, lavadas, e re-colocadas em cultura somente na presença de IL-2, sem estimulação (condição conhecida como *resting*). Após 2 dias, as células foram reestimuladas com anti-CD3 ligado a placa (1 µg/ml). O sobrenadante livre de células foi recolhido após 24, 48 e 72 horas após a reestimulação e analisado por ELISA.

3.16 - COCULTURA DE APCs COM LINFÓCITOS T

O baço de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} sensibilizados foram macerados e as hemácias foram removidas utilizando solução de ACK 1x. A suspensão celular resultante foi irradiada com 2500 rads, para funcionar com APCs. Linfócitos T foram purificados a partir de linfonodos drenantes de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} sensibilizados e co-cultivados com as APCs na proporção de 1:5 (linfócitos:APCs; 1×10^6 : 5×10^6) e OVA BN n/;'.l;/l(0,5 mg/mL) por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi então recolhido e analisado por ELISA.

3.17 - COCULTURA DE DCs COM LINFÓCITOS T CD4

DCs foram purificadas de baço de animais NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} sensibilizados e colocadas em cultura na presença de OVA (0,5 mg/mL) em placas de 24 poços na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/poço e $1,0 \times 10^6$ células/poço, respectivamente. Os linfócitos T CD4 foram purificados a partir dos linfonodos drenantes de animais NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} sensibilizados e adicionados a essa cultura 24 horas depois, na proporção de 1:10 (APC:linfócitos). O sobrenadante livre de células foi então recolhido e analisado por ELISA.

DCs purificadas de baço de animais NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} sensibilizados foram colocadas *in vitro* juntamente com 0,5 mg/mL de OVA e linfócitos T CD4 purificados de camundongos OT-II, na proporção de 1:10 (1×10^5 : 1×10^6 ; DCs:linfócitos), e deixadas por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi então recolhido e analisado por ELISA.

DCs diferenciadas da medula óssea de animais NFAT1^{+/+} ou NFAT1^{-/-} *naive* foram colocadas *in vitro* juntamente com 250 mM de peptídeo OVA e linfócitos T CD4 purificados de camundongos OT-II, na proporção de 1:10 (1×10^5 : 1×10^6 ; DCs:linfócitos), e deixadas por 72 horas. Os linfócitos foram então recolhidos e expandidos utilizando o mesmo volume de meio com IL-2 (20 ng/mL) por 3 dias consecutivos. As células foram então estimuladas com ionomicina (1 μ M) e PMA (20 mM) por 6 horas. Duas horas antes de terminar a estimulação, adicionou-se brefeldina A (10 μ g/mL). Ao final da estimulação as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e guardadas a 4°C. As células foram então marcadas para citocinas intracelulares.

3.18 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística utilizada para comparar os valores dos animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foi o teste *t* de Student's não pareado. Para a comparação entre as culturas tratadas e não tratadas com anti-IL12 foi o teste *t* de Student's pareado. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior produção de IFN- γ .

Com o intuito de entender melhor o envolvimento do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação de linfócitos T CD4, camundongos deficientes em NFAT1 (NFAT1^{-/-}) e seu respectivo controle (NFAT1^{+/+}) foram sensibilizados subcutaneamente com OVA e CFA. Quinze dias após a sensibilização, os linfonodos drenantes desses animais foram retirados e as células totais estimuladas *in vitro* com o mesmo antígeno, a OVA, por 72 horas (**Figura 10A**). Analisamos então as principais citocinas que caracterizam a diferenciação de linfócitos T CD4 no sobrenadante dessas culturas através da técnica de ELISA. Surpreendentemente, observamos que o sobrenadante das células NFAT1^{-/-} apresentou quantidades superiores tanto de IFN- γ quanto de IL-4, quando comparado com o sobrenadante das células NFAT1^{+/+} (**Figura 10B**). Sugerindo que parte dos linfócitos T CD4 dos animais NFAT1^{-/-} assumiu *in vivo* o perfil Th1, enquanto que a outra parte assumiu o perfil Th2.

Entretanto, quando essas células dos linfonodos drenantes foram estimuladas *in vitro* com anti-CD3, observamos um perfil de diferenciação semelhante ao descrito anteriormente (KIANI *et al.*, 1997), onde o sobrenadante das células NFAT1^{-/-} apresentou menores quantidades de IFN- γ e maiores de IL-4, quando comparado com o sobrenadante das células NFAT1^{+/+} (**Figura 10C**). Sugerindo uma maior diferenciação dos linfócitos para Th2.

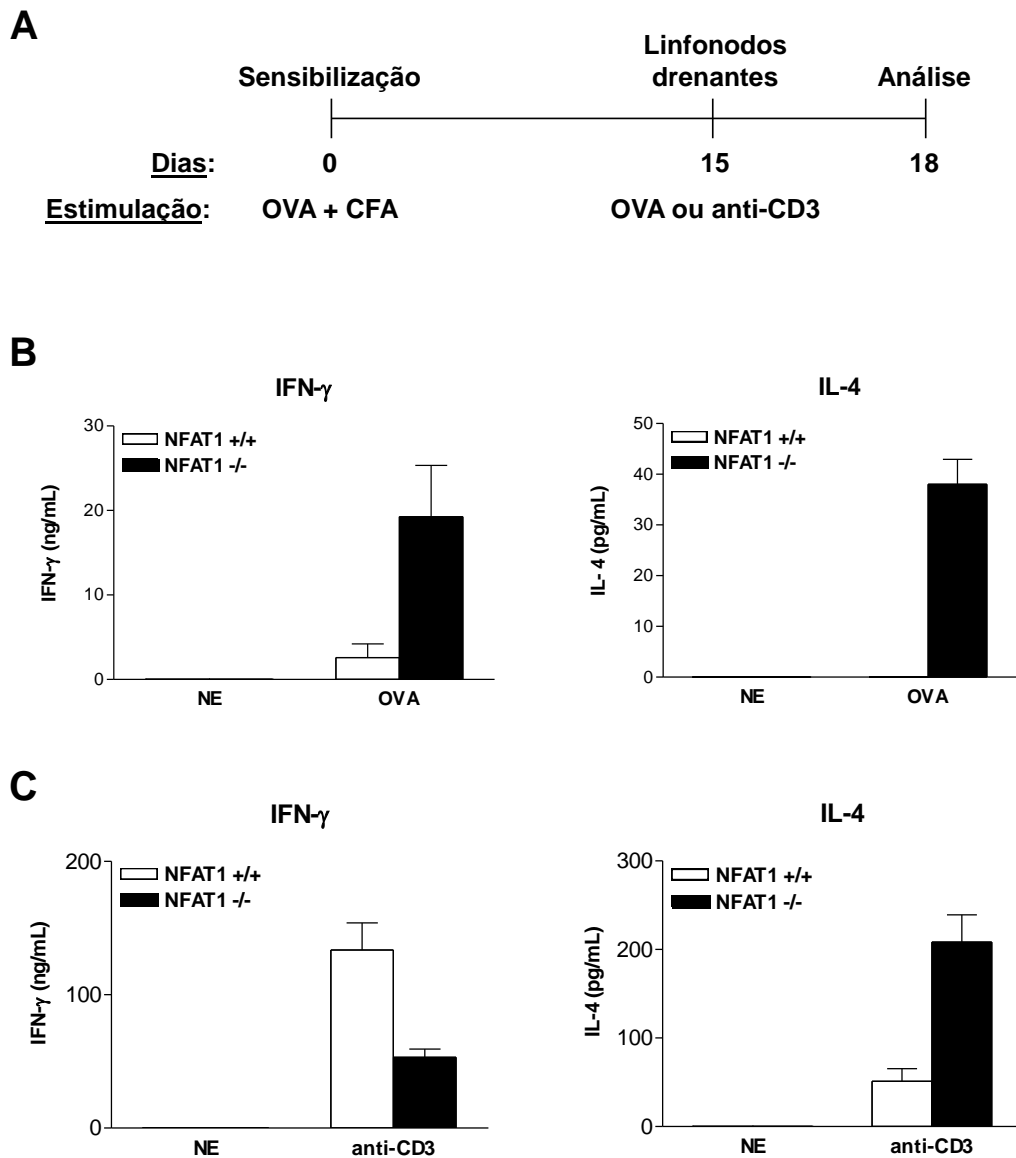
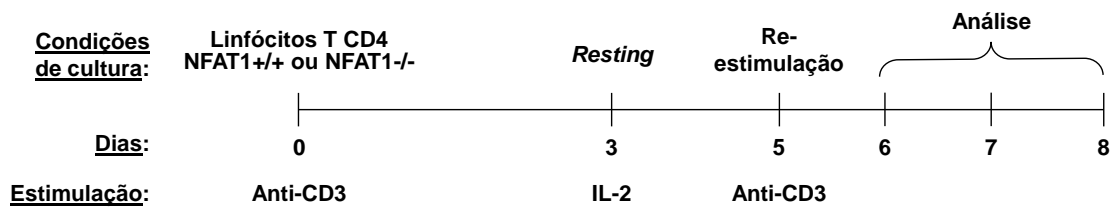


Figura 10: Perfis distintos de produção de IFN- γ frente a diferentes estímulos *in vitro*. (A) Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados subcutaneamente com 200 μ g de OVA emulsificada em CFA nas patas traseiras. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células colocadas em cultura e reestimuladas ou não (NE) com 0,5 mg/mL de OVA (B) ou com 1 μ g/mL de anti-CD3 ligado a placa (C) por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis das proteínas IFN- γ e IL-4 através de ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm SEM (n=3) e são representativos de 3 experimentos independentes.

O fato do estímulo com OVA requerer o envolvimento de APCs, provavelmente DCs, para produção de IFN- γ , e o estímulo com anti-CD3 não, sugere que o fator NFAT1 de APCs ou DCs seria extremamente importante para o controle da produção desta citocina. O mesmo não parece ser verdade para a produção de IL-4, já que independentemente se o estímulo envolve ou não APCs ou DCs, a produção desta citocina pelas células NFAT1^{-/-} foi exacerbada.

Esta hipótese parece ficar ainda mais clara quando diferenciamos linfócitos T CD4 *naive* com anti-CD3 *in vitro* (Figura 11A). Observamos que os linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} apresentaram quantidades diminuídas de IFN- γ quando comparado com os linfócitos NFAT1^{+/+} (Figura 11B), enquanto que as quantidades de IL-4 no sobrenadante de linfócitos deficientes em NFAT1 ainda se apresentaram altas (Figura 11B). Esse perfil de produção de citocinas mostra que linfócitos T CD4, quando diferenciados *in vitro*, apresentam somente uma maior diferenciação para Th2, reforçando a idéia de que as DCs NFAT1^{-/-} estão envolvidas com a superprodução de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-} no modelo de sensibilização *in vivo*.

A



B

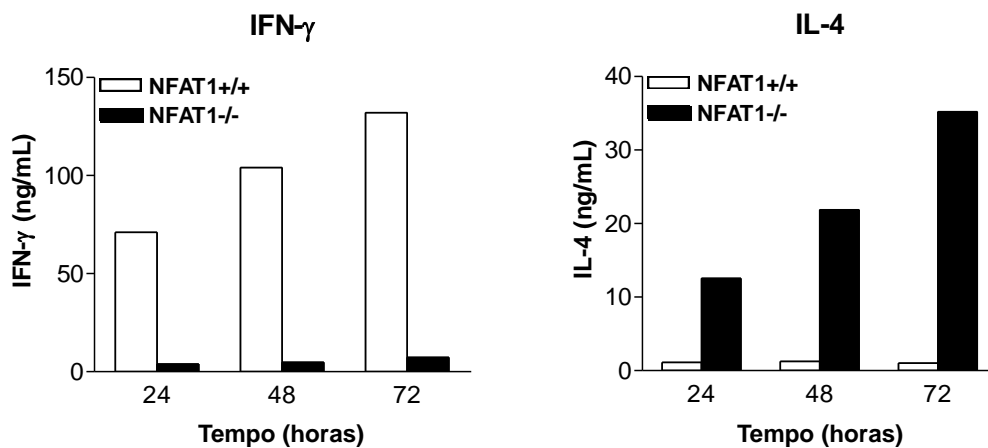


Figura 11: Linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} diferenciam-se preferencialmente para Th2 quando estimulados com anti-CD3 *in vitro*. (A) Linfócitos T CD4 purificados de linfonodos de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} *naive* foram estimulados *in vitro* com anti-CD3 ligado à placa (1 μ g/mL). No 3^o dia, as células foram deixadas sem estimulação, somente na presença de IL-2 (20U/mL) por 48 horas (condição conhecida como *Resting*). Após esse período, as células foram estimuladas novamente com anti-CD3 ligado a placa (1 μ g/mL). (B) O sobrenadante livre de células foi recolhido após diferentes tempos de estimulação e analisado para os níveis das proteínas IFN- γ e IL-4 através de ELISA. Os resultados representam um pool de 3 animais e são representativos de 3 experimentos independentes.

Para caracterizar melhor os níveis aumentados de IFN- γ nas culturas das células NFAT1^{-/-} estimuladas *in vitro* com OVA, analisamos primeiramente a expressão do RNA mensageiro desta citocina através da técnica de RPA. As células totais do linfonodo de animais sensibilizados foram estimuladas *in vitro* com OVA e o RNA total foi recolhido após diferentes tempos de estímulo. Observamos que a expressão de IFN- γ foi induzida após o estímulo de 6 horas com OVA, em ambos os animais (**Figura 12**). Pudemos observar também que as células NFAT1^{-/-} expressaram mais IFN- γ que as células NFAT1^{+/+} em todos os tempos analisados (**Figura 12**). Este resultado então nos mostra que a superprodução de IFN- γ está ocorrendo a nível transcripcional.

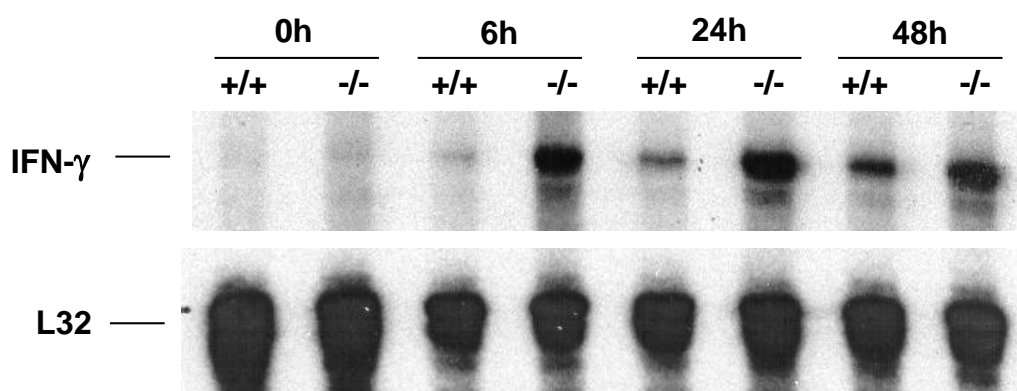


Figura 12: Células NFAT1^{-/-} expressaram mais IFN- γ após estímulo *in vitro* com OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA por 6, 24 e 48 horas ou deixadas sem estímulo (0 horas). O RNA celular total foi analisado por RPA para expressão de mRNA do IFN- γ e L32. Estes resultados representam um pool de 3 animais e é representativo de 2 experimentos independentes.

Observamos, através de ELISA, que os níveis protéicos do IFN- γ no sobrenadante da cultura acompanharam o aumento de seu RNA mensageiro (**Figura 13**). Observamos também que as culturas das células NFAT1^{-/-} apresentaram maiores quantidades de IFN- γ em todos os tempos analisados, e que a diferença entre os animais NFAT1^{-/-} e NFAT1^{+/+} foi aumentando com o aumento do tempo de estímulo (**Figura 13**).

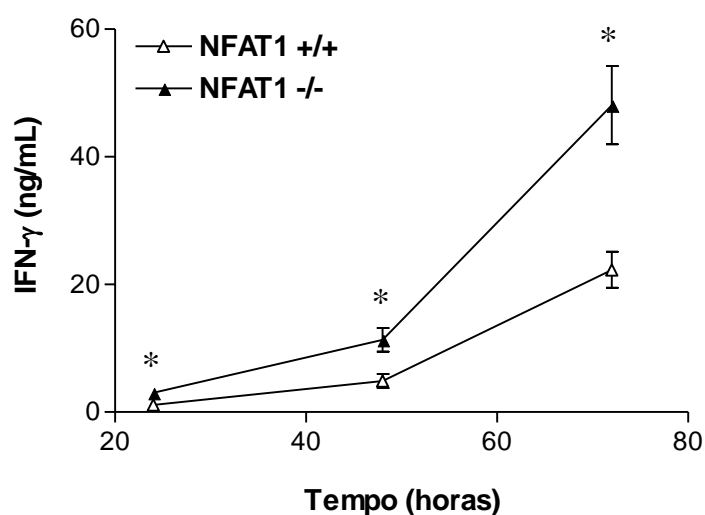


Figura 13: Células NFAT1^{-/-} apresentaram mais IFN- γ no sobrenadante após estímulo *in vitro* com OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA por 24, 48 e 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm SEM (n=3) e são representativos de 2 experimentos independentes. O asterisco (*) indica resultados significativamente maiores quando comparado com os camundongos NFAT1^{+/+} ($p < 0,05$).

Observamos também que os níveis protéicos de IFN- γ aumentaram no sobrenadante das culturas com doses crescentes da OVA, principalmente dos animais NFAT1^{-/-} (**Figura 14**), e que, independentemente da dose da OVA, as células dos animais NFAT1^{-/-} produziram maiores quantidades de IFN- γ quando comparado com os animais NFAT1^{+/+} (**Figura 14**).

Estes resultados nos mostram que a produção aumentada de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-} está correlacionada com o estímulo de OVA e conseqüentemente reforça a idéia de que as APCs estariam envolvidas nesse processo.

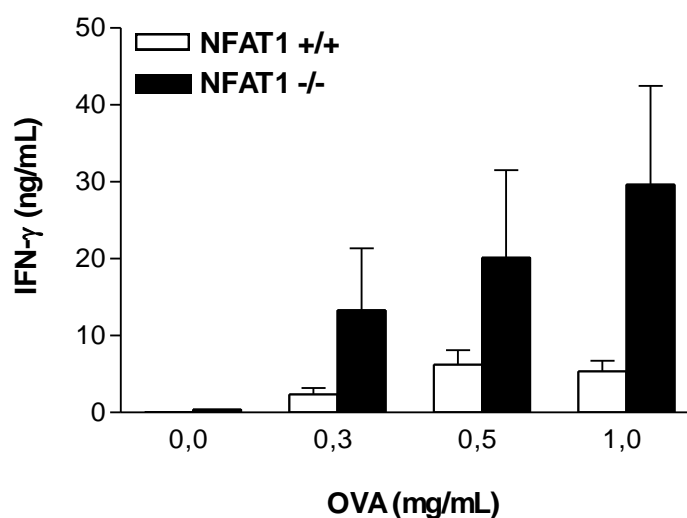


Figura 14: Células NFAT1^{-/-} apresentaram mais IFN- γ no sobrenadante frente a diferentes doses de OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados, as células colocadas em cultura e estimuladas ou não com 0,3, 0,5 e 1,0 mg/mL de OVA por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm SEM (n=3) e são representativos de 2 experimentos independentes.

4.2 – Linfócitos T CD4 foram os principais produtores de IFN- γ .

Considerando que diferentes populações celulares são capazes de produzir IFN- γ , utilizamos a marcação intracelular de citocinas combinada com a marcação de superfície para analisar que população celular seria responsável pela produção aumentada de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}. Observamos que os linfócitos T CD4 foram os principais produtores tanto nos animais NFAT1^{+/+} quanto nos NFAT1^{-/-} (**Figura 15**). Também observamos produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8 e B, entretanto, em bem menores proporções com relação à CD4 (**Figura 15**). Outras células que poderiam estar produzindo IFN- γ , como células NK ou macrófagos, não foram detectadas através de citometria de fluxo (dados não mostrados), devido à sua baixa frequência no linfonodo.

Intrigantemente, observamos uma diminuição na porcentagem de linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} produtores de IFN- γ (3,56%) em relação aos linfócitos T CD4 NFAT1^{+/+} (6,24%) (**Figura 15**), não condizendo com os resultados obtidos por ELISA (**Figura 13**) e por RPA (**Figura 12**) que mostraram uma produção aumentada de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}.

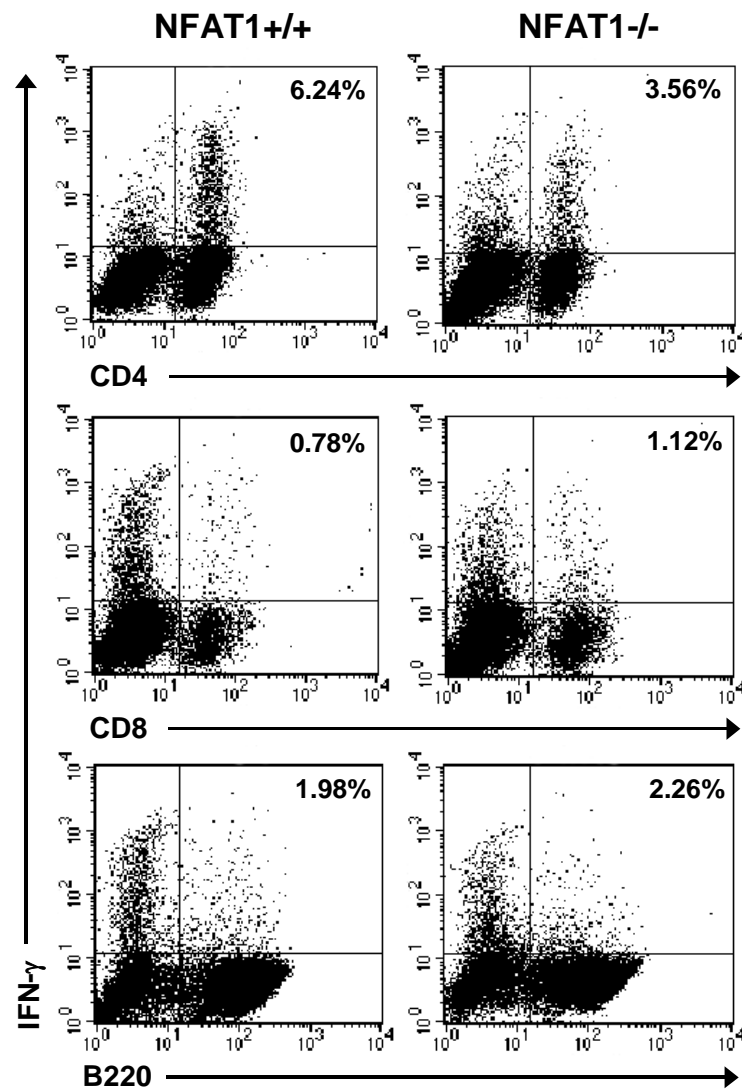


Figura 15: Linfócitos T CD4 foram os principais produtores de IFN- γ após estímulo *in vitro* com OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA por 72 horas. Brefeldina A foi adicionada à cultura 5 horas antes do procedimento de marcação. As células foram então recolhidas e marcadas na superfície com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 ou anti-B220. Depois as células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação intracelular com anticorpo anti-IFN- γ . As células foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados representam pool de 3 animais de 3 experimentos independentes.

Para esclarecermos se os linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} seriam as células responsáveis pela superprodução de IFN- γ , primeiramente, utilizamos a técnica de RPA para saber como estava a expressão de IFN- γ especificamente nesse subtipo celular. Para isso, estimulamos *in vitro* as células dos linfonodos drenantes de animais sensibilizados com OVA por 24 horas. Purificamos então os linfócitos T CD4 e analisamos a expressão de IFN- γ . Observamos que os linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} expressaram mais IFN- γ quando comparado com a expressão dos linfócitos NFAT1^{+/+} (**Figura 16**). Além disso, os linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} expressaram mais IFN- γ quando comparado as células totais do linfonodo, sugerindo um enriquecimento da população responsável pela produção aumentada de IFN- γ .

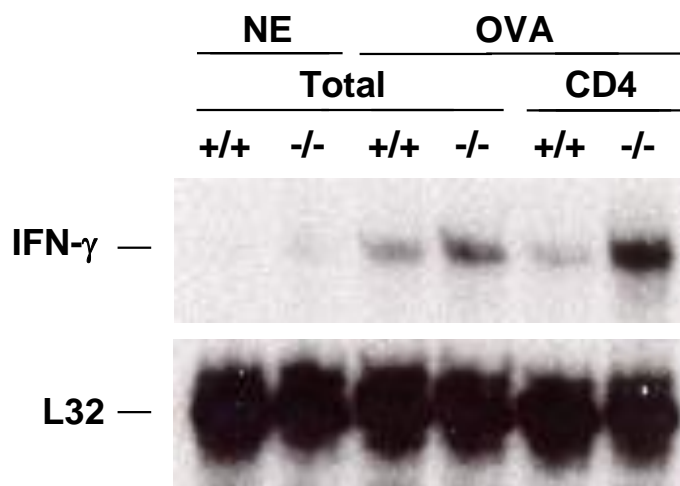


Figura 16: Linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} expressaram mais IFN- γ após estímulo *in vitro* com OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA ou deixadas sem estímulo (NE) por 24 horas. Linfócitos T CD4 foram purificados a partir das células estimuladas. O RNA celular total foi analisado por RPA para IFN- γ e L32. Estes resultados representam um pool de 4 animais e é representativo de 2 experimentos.

A outra forma que utilizamos para saber a importância dos linfócitos T CD4 na superprodução de IFN- γ , foi depletando cada população específica antes do estímulo *in vitro* com OVA. Após 72 horas, analisamos a produção de IFN- γ e observamos uma diminuição significativa na produção de IFN- γ somente quando os linfócitos T CD4 foram depletados (**Figura 17**), mostrando a extrema importância dessa população na produção desta citocina, enquanto os linfócitos T CD8 e B não pareceram estar envolvidos.

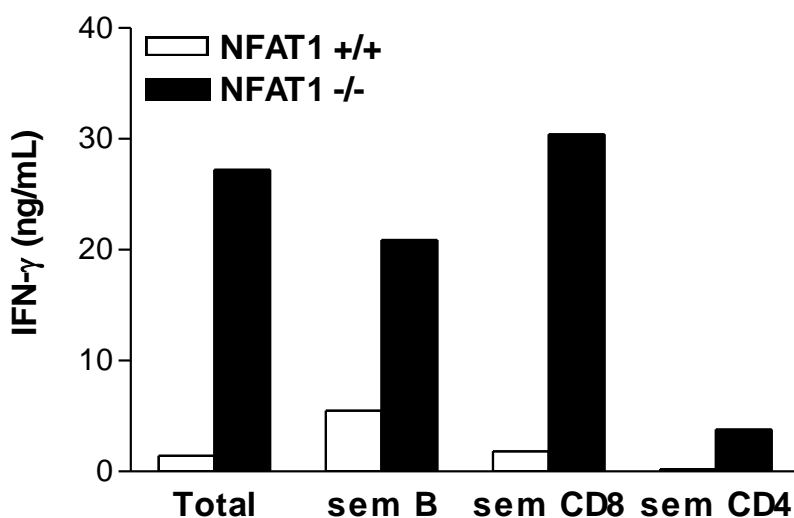


Figura 17: Linfócitos T CD4 foram extremamente importantes para produção de IFN- γ após estímulo *in vitro* com OVA. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células totais ou depletadas das populações de linfócitos B, T CD8 ou T CD4 foram colocadas em cultura e estimuladas com 0,5 mg/mL de OVA por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. Os resultados representam pool de 4 animais de 3 experimentos independentes.

4.3 – Estímulos microbianos intensificaram a produção de IFN- γ , mas não foram fundamentais para sua produção.

Uma vez que a sensibilização dos animais foi feita com CFA, que contém a forma inativa da *Mycobacterium tuberculosis*, e que, conseqüentemente, induz a modulação da resposta para Th1 (SHIBAKI & KATZ, 2002), analisamos a produção de IFN- γ por células de animais sensibilizados com IFA, que não contém a *Mycobacterium*. Observamos que a quantidade de IFN- γ produzida pelos linfócitos NFAT1^{-/-} foi extremamente reduzida quando os animais foram sensibilizados com IFA (**Figura 18A**). Essa redução não foi observada tão claramente nos animais NFAT1^{+/+}. Entretanto, a produção de IFN- γ pelos linfócitos dos animais NFAT1^{-/-} sensibilizados com IFA continuou aumentada quando comparada aos animais NFAT1^{+/+} (**Figura 18A**), mostrando que a *M. tuberculosis* presente no CFA intensificou a produção de IFN- γ , principalmente pelos linfócitos NFAT1^{-/-}, porém sua presença não foi fundamental.

Como a solução de OVA, usada tanto na sensibilização dos animais quanto no estímulo *in vitro*, pode conter contaminação de lipopolissacarídeos (LPS), que também é um indutor da resposta Th1, utilizamos uma solução de OVA sem LPS para analisar seu papel na produção de IFN- γ . Observamos que a produção de IFN- γ diminuiu quando a OVA utilizada estava livre de LPS, quando comparado com a OVA normal, independente se os animais eram sensibilizados com CFA ou IFA (**Figura 18B**). Entretanto, continuamos observando uma produção aumentada de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-} em relação aos NFAT1^{+/+} (**Figura 18B**). Estes resultados então mostram que a produção aumentada de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-} também não depende do LPS presente na OVA.

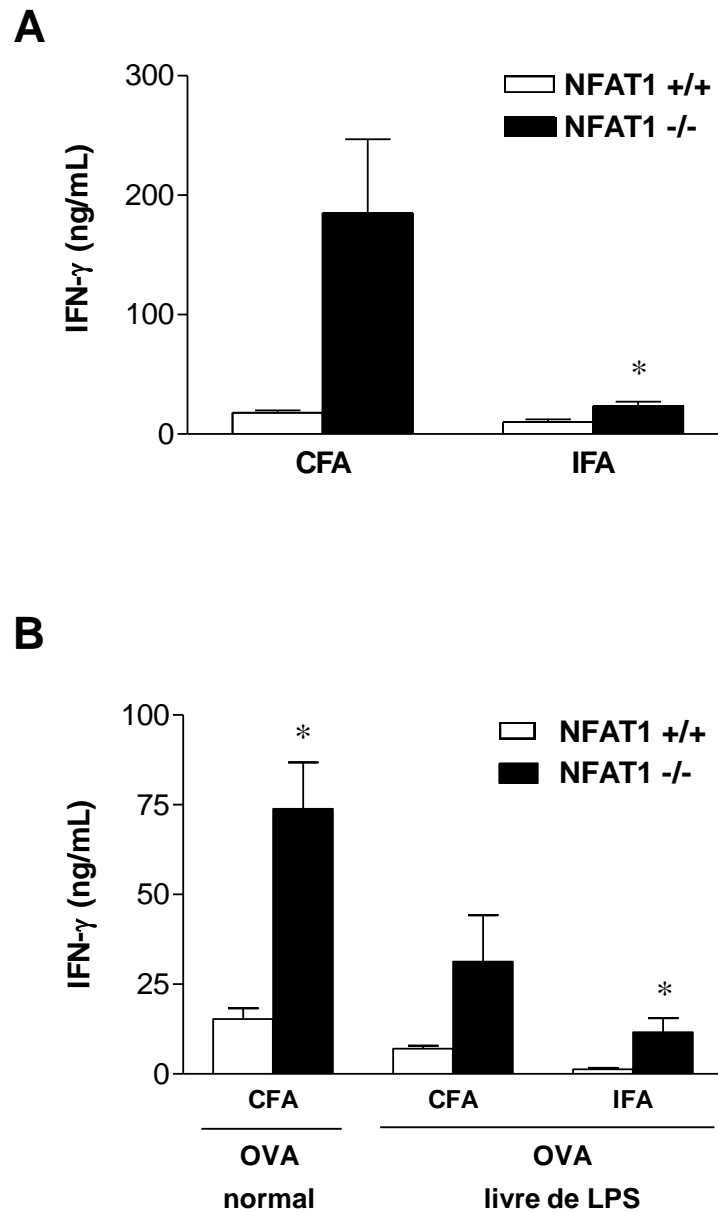


Figura 18: Estímulos microbianos intensificaram a produção de IFN- γ induzida pela OVA.

Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados subcutaneamente com 200 μ g de OVA normal (A) ou livre de LPS (B) emulsificada em CFA ou IFA nas patas traseiras. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis das proteínas IFN- γ através de ELISA. Os resultados estão expressos em média \pm SEM (n=3 a 5) e são representativos de 2 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparado com NFAT1^{+/+} ($p < 0,05$).

4.4 – Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior produção de IL-12.

Um dos principais fatores que induz a produção de IFN- γ é a citocina IL-12. A IL-12 é uma citocina heterodimérica formada pelas subunidades p35 e p40 (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Para avaliarmos o papel da IL-12 na produção de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}, analisamos inicialmente a expressão de suas subunidades através da técnica de RPA. Observamos aumento de expressão da subunidade p35 da IL-12 nas células NFAT1^{-/-} em relação as NFAT1^{+/+}, em todos os tempos analisados, inclusive antes mesmo do estímulo *in vitro* com OVA (0h) (**Figura 19**). Apesar do estímulo com OVA ter induzido um aumento na expressão da subunidade p35 após 6 horas, a expressão desta subunidade foi diminuindo ao longo do tempo de cultura (**Figura 19**). Entretanto, não observamos diferença na expressão da subunidade p40 entre as células NFAT1^{-/-} e NFAT1^{+/+} (**Figura 19**). Assim como a subunidade p35, a p40 também teve sua expressão diminuída ao longo do tempo de cultura. Sabendo-se que a IL-12 é expressa principalmente por APCs (TRINCHIERI *et al.*, 2003; MACATONIA *et al.* 1995) e que a subunidade p40, diferentemente da p35, é expressa exclusivamente por APCs, podemos sugerir que a diminuição da expressão de ambas as subunidades seja decorrente da morte das APCs ao longo da cultura.

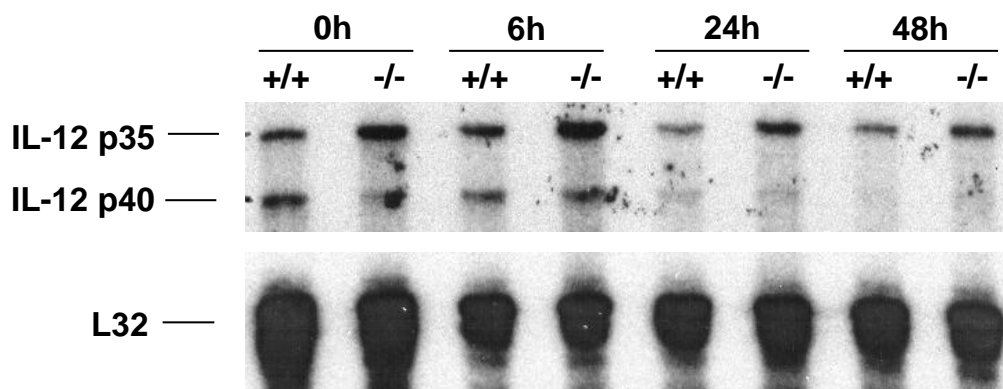


Figura 19: Células NFAT1^{-/-} apresentaram uma maior expressão de IL-12. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descritos na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com 0,5 mg/mL de OVA por 6, 24 e 48 horas ou deixadas sem estímulo (0 horas). O RNA celular total foi analisado por RPA para IL-12 p35, IL-12 p40, L32. Estes resultados representam um pool de 3 animais e é representativo de 2 experimentos independentes.

Levando-se em conta que a expressão de p35 não está vinculada à expressão de p40 e que cada uma dessas subunidades pode formar outras citocinas distintas (TRINCHIERI *et al.*, 2003), precisávamos avaliar a produção do heterodímero de IL-12, o p70. Para isso, células totais do linfonodo foram estimuladas *in vitro* com OVA por 24 horas. Observamos, através de ELISA, que o sobrenadante da cultura de células NFAT1^{-/-} apresentou maiores quantidades da proteína IL-12, quando comparado com o sobrenadante das células NFAT1^{+/+} (**Figura 20**), sugerindo que a produção aumentada de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-} possa ser devido à produção aumentada de IL-12.

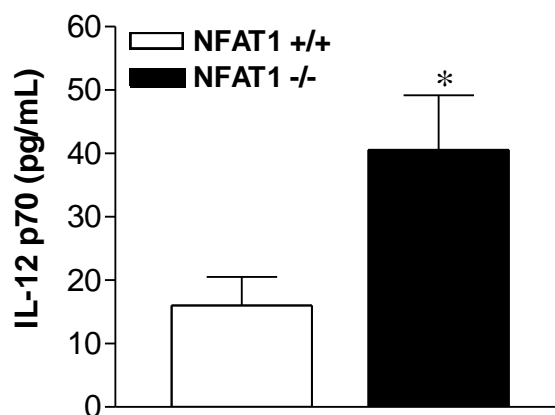


Figura 20: Células NFAT1^{-/-} apresentaram mais IL-12 no sobrenadante. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados. As células dos linfonodos foram estimuladas *in vitro* com OVA (0,5 mg/mL) por 24 horas e no sobrenadante livre de células foi analisado os níveis da proteína IL-12 p70 por ELISA. O resultado está expresso como média \pm SEM (n=5). O asterisco (*) indica resultado significativo em relação às células NFAT1^{+/+} ($p < 0.05$).

Para confirmarmos o papel da IL-12 na produção de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}, utilizamos anticorpos neutralizante anti-IL-12 no início da cultura. Após 72 horas do estímulo *in vitro* com OVA, observamos que a adição dos anticorpos anti-IL-12 reduziu significativamente a produção de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-} (**Figura 21**), mostrando que a IL-12 teve um importante papel na produção aumentada de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}.

Como as principais células produtoras de IL-12 são as APCs, principalmente DCs (TRINCHIERI *et al.*, 2003; MACATONIA *et al.* 1995), estes resultados reforçam a idéia de que as APCs NFAT1^{-/-} estejam envolvidas com a superprodução de IFN- γ pelos linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-}.

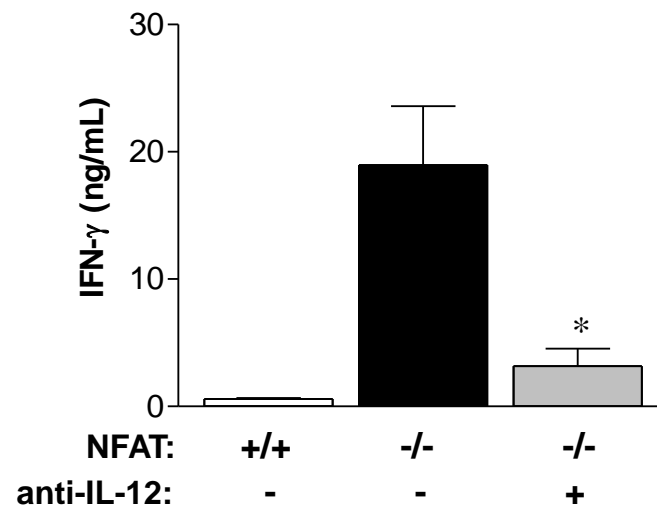


Figura 21: IL-12 é extremamente importante para produção de IFN- γ por linfócitos NFAT1^{-/-}. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes foram retirados e as células foram estimuladas *in vitro* com OVA (0,5 mg/mL) por 72 horas na presença ou não do anticorpo neutralizante anti-IL-12 (1 μ g/mL). O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. O resultado está expresso como média \pm SEM (n=5) e é representativo de 4 experimentos independentes. O asterisco (*) indica resultado significativo em relação às células NFAT1^{-/-} não tratadas com anti-IL-12 ($p < 0.05$).

4.5 – APCs deficientes em NFAT1 contribuíram para produção de IFN- γ .

Para avaliarmos se o NFAT1 das APCs estaria regulando negativamente a produção de IFN- γ pelos linfócitos, utilizamos células de baço irradiadas, como APCs, e cocultivamos com linfócitos T. Observamos uma produção bastante aumentada de IFN- γ quando tanto a APC quanto os linfócitos eram deficientes para NFAT1, quando comparado com a cocultura de APCs e linfócitos NFAT1^{+/+} (**Figura 22**). Entretanto quando as APCs foram trocadas, o fenótipo dos linfócitos se inverteu, onde os linfócitos NFAT1^{+/+} passaram a produzir mais IFN- γ enquanto os linfócitos NFAT1^{-/-} passaram a produzir menos (**Figura 22**). Estes resultados mostram que as APCs NFAT1^{-/-} foram capazes de induzir uma maior produção de IFN- γ , independentemente se esses linfócitos tinham ou não NFAT1.

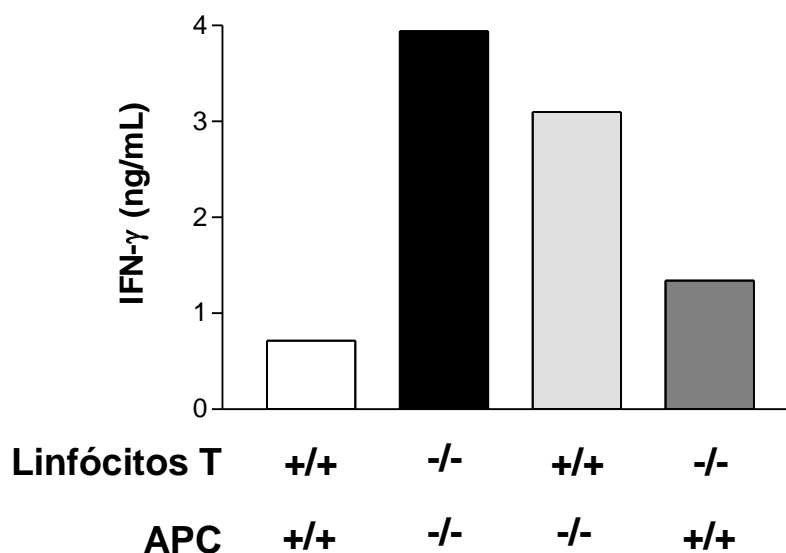


Figura 22: APCs NFAT1^{-/-} induziram uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes e baço foram retirados. Linfócitos T foram purificados dos linfonodos drenantes e cultivados junto com os esplenócitos irradiados. As células foram estimuladas com 0,5 mg/mL de OVA por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi então analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. Os resultados representam um pool de 3 animais e são representativos de 2 experimento independentes.

Neste modelo de baço irradiado, diversas células podem funcionar como APCs, e tanto linfócitos T CD4 quanto T CD8 podem produzir IFN- γ . Para sabermos o papel das DCs na produção de IFN- γ especificamente por linfócitos T CD4, cocultivamos esses dois tipos celulares, ambos purificados de animais sensibilizados, na presença de OVA e medimos o IFN- γ por ELISA após 72 horas. Observamos uma maior produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4 NFAT1^{-/-} quando foram cocultivados com DCs também deficientes em NFAT1, quando comparado com a cocultura de DCs e linfócitos NFAT1^{+/+} (**Figura 23**). Entretanto, quando as DCs foram trocadas, observamos somente um pequeno aumento na produção de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{+/+}, e uma pequena diminuição nos linfócitos NFAT1^{-/-} (**Figura 23**). Sugerindo que as DCs NFAT1^{-/-} foram capazes de induzir uma maior produção de IFN- γ , contudo, o genótipo dos linfócitos T CD4 mostrou ser mais importante na produção desta citocina.

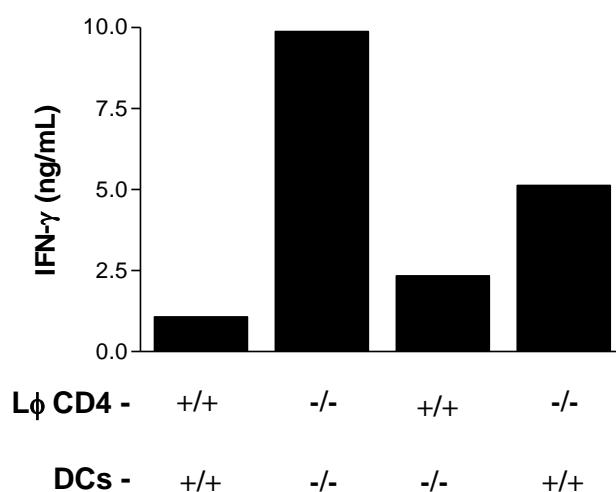


Figura 23: DCs NFAT1^{-/-} induziram uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Após 15 dias, os linfonodos drenantes e o baço foram retirados. As DCs purificadas do baço foram cultivadas por 24 horas somente com 0,5 mg/mL de OVA. Os linfócitos T CD4 foram purificados dos linfonodos drenantes de animais sensibilizados e cocultivados na proporção 1:10 com as DCs por 72 horas. O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis da proteína IFN- γ através de ELISA. Os resultados representam um pool de 3 animais e são representativos de 2 experimento independentes.

4.6 - DCs deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1 *in vitro*.

Para realmente avaliarmos a capacidade das DCs NFAT1^{-/-} na diferenciação de linfócitos T CD4 *in vitro*, utilizamos camundongos transgênicos com o TCR específico para OVA (OT-II). Cocultivamos então, DCs purificadas de baço de camundongos sensibilizados com linfócitos T CD4 purificados de camundongos OT-II *naive*. Após 3 dias de estimulação com OVA, as células foram deixadas na presença de IL-2 e na ausência de estímulo por 24 horas. Linfócitos T CD4 repurificados foram então reestimuladas com anti-CD3 por 3 dias (**Figura 24A**). Observamos, após esse protocolo de diferenciação *in vitro*, que os linfócitos T CD4 produziram uma maior quantidade de IFN- γ e menor de IL-4 quando foram cocultivados com DCs NFAT1^{-/-}, quando comparado com os linfócitos que foram cocultivados com DCs NFAT1^{+/+} (**Figura 24B**). Estes resultados demonstram que as DCs deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior capacidade para diferenciar linfócitos T CD4 para o fenótipo Th1, sugerindo um importante papel para o fator de transcrição NFAT1 em DCs.

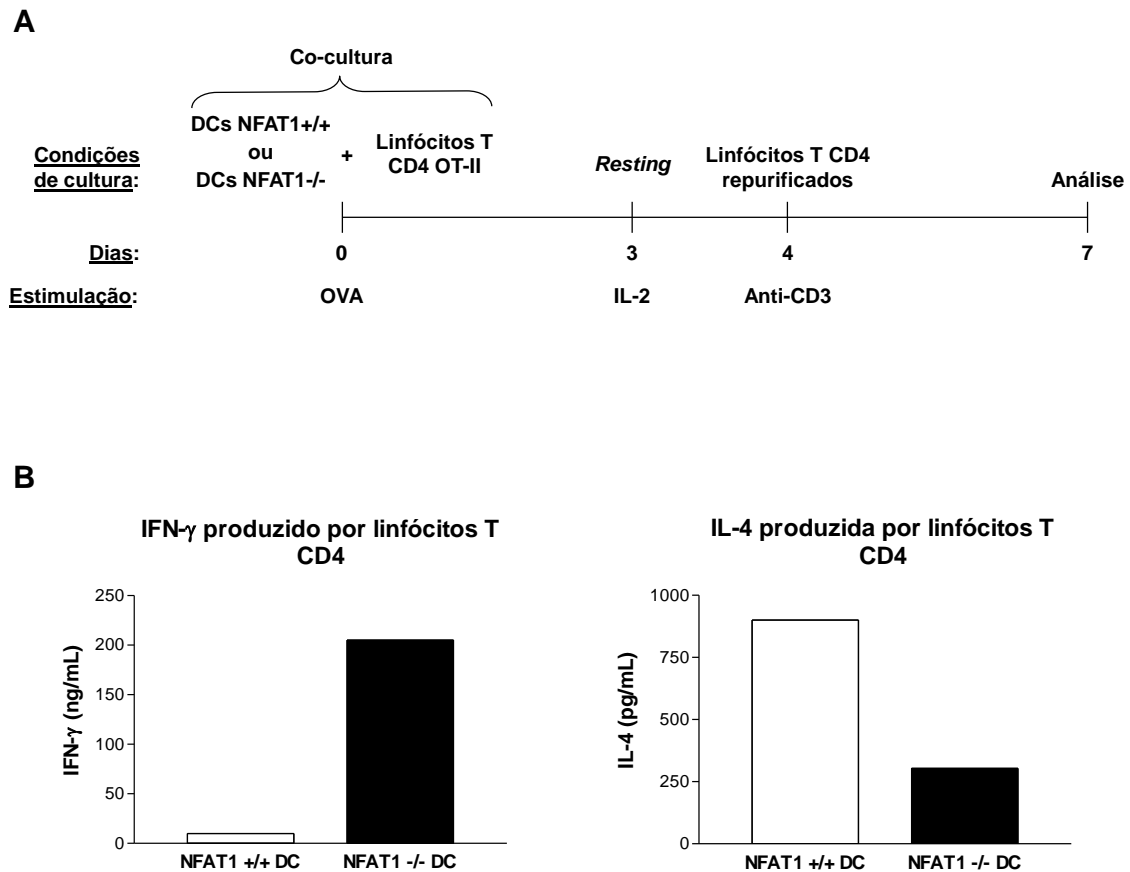


Figura 24: DCs NFAT1^{-/-} apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1. (A) Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Quinze dias depois, DCs foram purificadas do baço desses animais e cocultivadas com linfócitos T CD4 purificados dos linfonodos de camundongos OT-II (proporção 1:10), na presença de OVA (0,5 mg/mL). Depois de 3 dias, as células totais foram deixadas sem estímulo na presença de IL-2 (condição conhecida com *Resting*) por 24 horas. Os linfócitos T CD4 foram então repurificados e reestimulados com anti-CD3 ligado a placa (1 μ g/mL) por 72 horas. (B) O sobrenadante livre de células foi recolhido e analisado para os níveis das proteínas IFN- γ e IL-4 através de ELISA. Este resultado é representativo de 3 experimentos independentes.

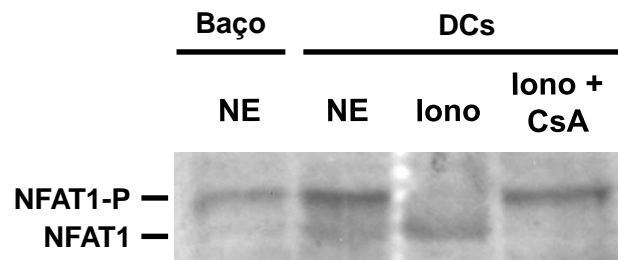
4.7 - DCs purificadas de baço ou derivadas de medula óssea apresentaram NFAT1 funcional.

Para podermos estudar o papel que o fator de transcrição NFAT1 apresentava em DCs, precisávamos primeiramente confirmar que as DCs apresentavam esse fator de transcrição e que ele era funcional neste tipo celular. Analisamos a expressão de NFAT1 tanto em DCs derivadas *in vivo* (purificadas de baço), quanto em DCs derivadas *in vitro* a partir da medula óssea.

Utilizando células totais de baço como controle, observamos através da técnica de western blot, que as DCs purificadas de baço de camundongos C57Bl/6 apresentaram uma alta expressão do fator de transcrição NFAT1 (**Figura 25A**), e que a grande maioria se apresentou na forma fosforilada (não ativado). A indução do influxo de cálcio através do ionóforo de cálcio, ionomicina, provocou a rápida desfosforilação (ativação) do NFAT1, como pudemos observar por seu deslocamento diferencial no gel. A droga imunossupressora, CsA, capaz de bloquear a fosfatase calcineurina, inibiu a desfosforilação do NFAT1 (**Figura 25A**).

O mesmo foi observado através da técnica de imunofluorescência, onde DCs purificadas de baço apresentaram NFAT1. Apesar de termos observado marcação para NFAT1 no núcleo, a grande maioria se localizava no citoplasma (**Figura 25B**). A estimulação com ionomicina induziu parcialmente a translocação do NFAT1 para o núcleo, enquanto que a CsA inibiu essa translocação (**Figura 25B**).

A



B

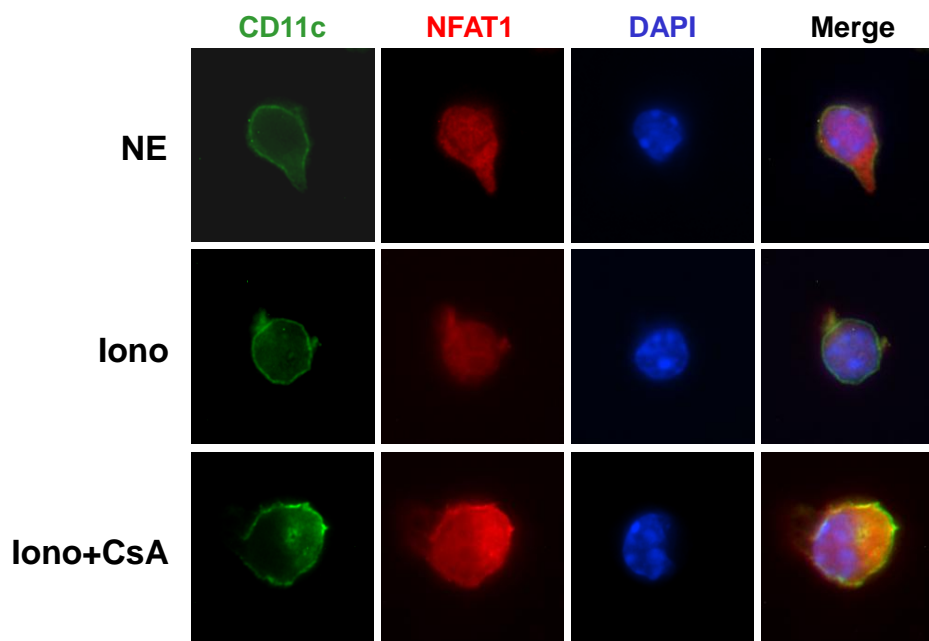


Figura 25: DCs de baço apresentaram NFAT1 funcional. (A) Células totais de baço e DCs purificadas de baço (2×10^6 células - 85% de pureza) de camundongos C57BL/6 foram deixadas sem estímulo (NE) ou foram estimuladas com ionomicina (Iono) ($5 \mu\text{M}$) por 10 minutos. Ciclosporina A (CsA) ($2 \mu\text{M}$) foi adicionada 15 minutos antes do estímulo com Iono. O extrato total de proteína foi analisado por western blot usando o anticorpo anti-NFAT1 (67.1) e anticorpo contra IgG de coelho conjugado à peroxidase. (B) DCs purificadas de baço de camundongos C57BL/6 foram aderidas a lamínulas previamente tratadas com gelatina 2%. Após a adesão, as células foram deixadas sem estímulo (NE) ou foram estimuladas com ionomicina (Iono) ($5 \mu\text{M}$) por 10 minutos a 37°C . CsA ($2 \mu\text{M}$) foi adicionada 15 minutos antes do estímulo com Iono. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e a superfície celular das DCs foi marcada com anti-CD11c biotilado e estreptavidina-FITC (primeira coluna). As células foram então permeabilizadas e marcadas com o anticorpo anti-NFAT1 (67.1) e anticorpo contra IgG de coelho conjugado à rodamina (segunda coluna). E por último, as células foram marcadas com DAPI (terceira coluna) e observadas em um microscópio de fluorescência. A quarta coluna mostra a sobreposição das 3 marcações fluorescentes (Merge). Este resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

Assim como as DCs purificadas de baço, as DCs obtidas *in vitro* a partir da medula óssea também apresentaram o fator de transcrição NFAT1, e este também foi capaz de ser ativado pelo estímulo de ionomicina (**Figura 26**). Utilizando o zymosan (parede fúngica rica em β -glicanos) como estímulo, observamos uma rápida e transiente ativação do NFAT1, com pico máximo de ativação em 10 minutos (**Figura 26A**). Mostrando que um estímulo que mimetiza uma infecção fisiológica também foi capaz de ativar o fator de transcrição NFAT1. Contudo, não observamos ativação do NFAT1 quando utilizamos o Pam₃Cys (ligante de TLR-2) como estímulo (**Figura 26B**). Estes resultados corroboram com os da literatura que mostram que a família NFAT pode ser ativada através do receptor de β -glicano, o dectina-1, mas não pela via de TLR-2 (GOODRIDGE *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009).

Estes resultados então mostram que além das DCs apresentarem o fator de transcrição NFAT1, este fator pôde ser ativado com diferentes estímulos, se mostrando funcional.

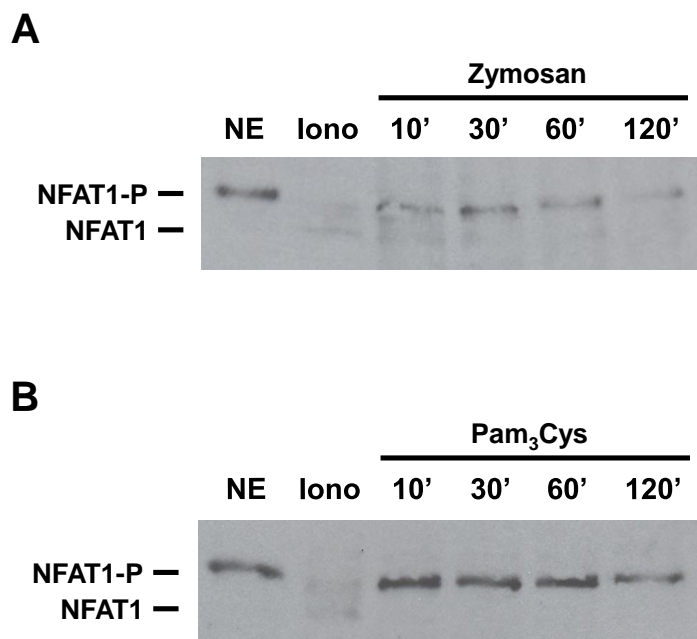


Figura 26: DCs derivadas *in vitro* da medula óssea também apresentaram NFAT1 funcional. DCs (4×10^5 células – 60% de pureza) derivadas *in vitro* a partir da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram deixadas sem estímulo (NE) ou foram estimuladas com ionomicina (Iono) ($5 \mu\text{M}$) por 10 minutos ou estimuladas com Zymosan ($100 \mu\text{g/mL}$) (**A**) ou Pam₃Cys (100ng/mL) (**B**) por 10, 30, 60 e 120 minutos. O extrato total de proteínas foi analisado por *western blot* utilizando o anticorpo primário anti-NFAT1 (67.1) e anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado à peroxidase.

4.8 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram um número maior de DCs.

Um dos primeiros eventos na biologia das DCs é sua geração na medula óssea e distribuição pelos diversos tecidos do corpo. Para avaliarmos se o fator NFAT1 teria algum envolvimento nesses momentos iniciais da vida das DCs, analisamos o número de DCs presentes no baço de camundongos NFAT1^{-/-} e comparamos com camundongos controle (NFAT1^{+/+}). Observamos que os animais NFAT1^{-/-} apresentaram um número significativamente maior de DCs quando comparado com os animais NFAT1^{+/+} (**Figura 27A**). Além disso, observamos que o grau de pureza obtido nas purificações de DCs de baço de animais NFAT1^{-/-} foi superior aos obtidos para animais NFAT1^{+/+} (**Figura 27B**), sugerindo uma maior proporção de DCs dentro da população total do baço dos animais deficientes para NFAT1. Estes resultados nos sugerem que o fator NFAT1 deve participar de algum evento relacionado ao ciclo de vida das DCs. Isto é, o NFAT1 poderia regular negativamente a geração das DCs na medula óssea, ou a migração delas para o baço, ou sua morte.

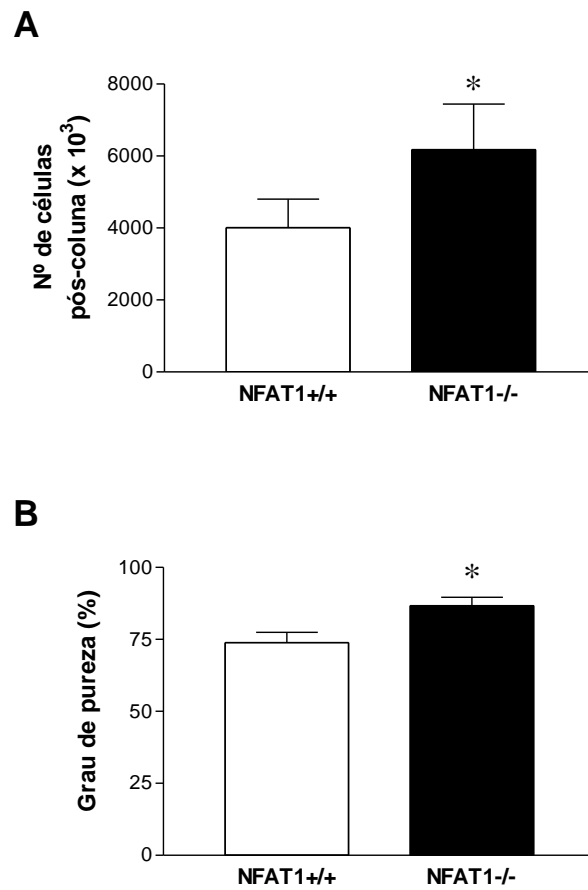


Figura 27: Camundongos NFAT1^{-/-} apresentaram um número maior de DCs no baço. Comparações entre o número de células (**A**) e o grau de pureza (**B**) obtidos nas purificações de DCs de baço de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} feitas através de colunas MACS. Os resultados estão expressos em média \pm SEM (n=19). O asterisco (*) indica resultados significativamente maiores quando comparado com os camundongos NFAT1^{+/+} ($p < 0.02$).

4.9 - Camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior porcentagem de DCs CD8 α ⁺.

Analisando as subpopulações de DCs presentes no baço, observamos que além de terem apresentado um número maior de DCs no baço, animais NFAT1^{-/-} apresentaram uma maior porcentagem da subpopulação CD8 α ⁺, quando comparado com os animais NFAT1^{+/+}, que apresentaram a porcentagem normalmente descrita de 20-25% (KAMATH *et al.*, 2000) (**Figura 28**). Este resultado também foi observado em camundongos *naive* (dados não mostrados), logo demonstrando que o aumento desta subpopulação não está relacionado com o processo de sensibilização. Estes resultados então sugerem que o NFAT1 possa regular negativamente a geração desta subpopulação no baço. Além disso, essa maior porcentagem de DCs CD8 α ⁺ nos animais NFAT1^{-/-} poderia ser a responsável pela maior capacidade que as DCs NFAT1^{-/-} possuem em diferenciar os linfócitos T CD4 para Th1, já que a subpopulação de DCs CD8 α ⁺ está envolvida com esse tipo de diferenciação (MALDONADO-LÓPEZ *et al.*, 1999).

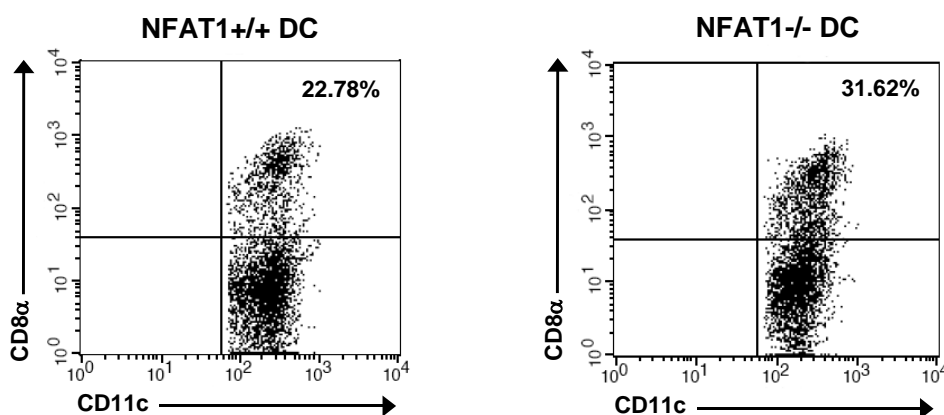


Figura 28: DCs NFAT1^{-/-} apresentaram um maior percentual da subpopulação CD8 α ⁺. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Quinze dias depois, DCs foram purificadas do baço desses animais. A população total de DCs NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foi marcada com anti-CD8 e analisada por citometria de fluxo. Este resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

4.10 - DCs deficientes em NFAT1 não apresentaram diferença no processo de maturação.

Para que as DCs exerçam seu principal papel que é ativar e modular a resposta de linfócitos T é preciso que elas sejam ativadas, geralmente por PAMPs, e passem pelo processo de maturação. Para avaliarmos se o fator de transcrição NFAT1 teria algum papel neste processo, purificamos DCs de baço de camundongos NFAT1^{-/-} e ^{+/+}, *naive* ou sensibilizados, e analisamos as principais moléculas que indicam a maturação das DCs. Para isso, as DCs foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40 e anti-MHC II e analisadas por citometria de fluxo. Observamos que as DCs NFAT1^{-/-}, tanto purificadas de animais *naive* quanto sensibilizados, não apresentaram diferença na expressão de nenhuma das moléculas analisadas, quando comparado com DCs de animais NFAT1^{+/+} (dados não mostrados; **Figura 29**). Sugerindo que o fator NFAT1 não estaria envolvido com o processo de maturação das DCs.

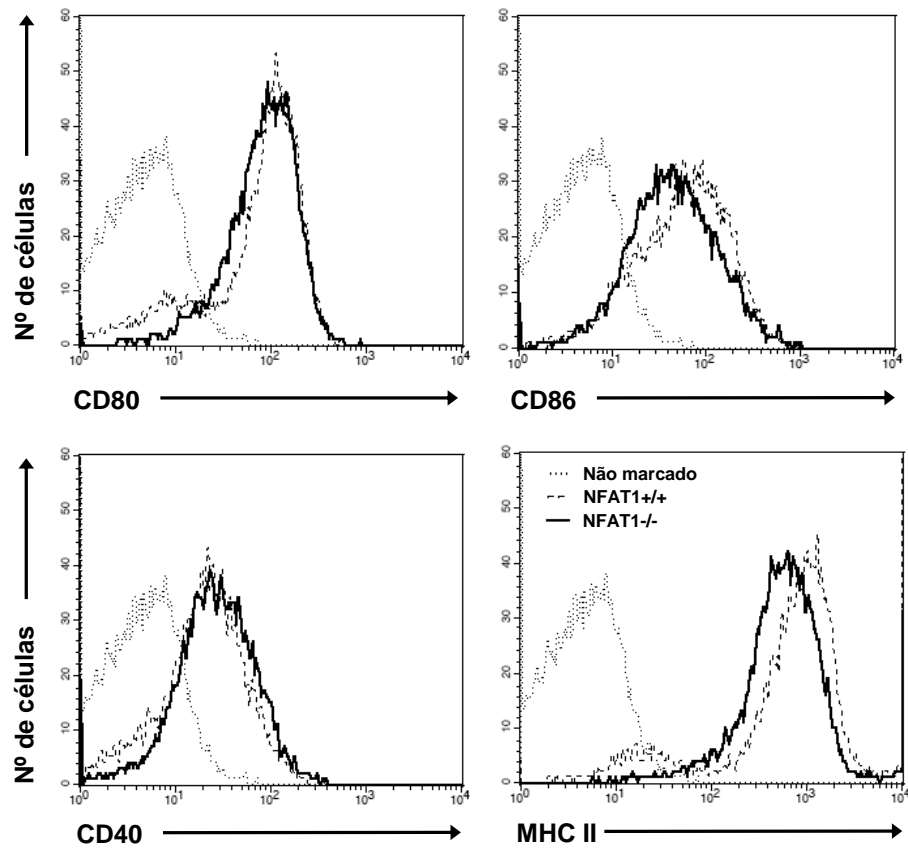


Figura 29: DCs NFAT1^{-/-} apresentaram o mesmo padrão de maturação que DCs NFAT1^{+/+}. Os camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram sensibilizados como descrito na Figura 10A. Quinze dias depois, DCs foram purificadas do baço desses animais. A população total de DCs NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foi marcada com anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40 ou anti-MHC II e analisada por citometria de fluxo. Este resultado é representativo de 2 experimentos independentes.

4.11 - BM-DCs deficientes em NFAT1 também apresentaram uma maior capacidade de induzir a diferenciação Th1 *in vitro*.

Para avaliarmos o papel da subpopulação de DCs $CD8\alpha^+$ na diferenciação Th1 utilizamos DCs derivadas *in vitro* a partir da medula óssea (BM-DCs), já que estas não apresentam esta subpopulação, sendo exclusivamente compostas por DCs $CD8\alpha^-$ (INABA *et al.*, 1992; NAIK *et al.*, 2005; dados não mostrados). Cocultivamos então BM-DCs de animais NFAT1^{-/-} e seu respectivo controle (B6) com linfócitos T CD4 purificados de animais OT-II. Após 3 dias de estimulação e 3 dias consecutivos de expansão, avaliamos a produção de citocinas por esses linfócitos, através de marcação intracelular de citocinas (**Figura 30A**). Observamos que os linfócitos que foram cocultivados com BM-DCs deficientes em NFAT1 produziram mais IFN- γ , quando comparado com os linfócitos cocultivados com BM-DCs controle (**Figura 30B**). Entretanto, não observamos diferença na produção de IL-2 entre as diferentes coculturas, mostrando que o fator de transcrição NFAT1 de DCs influenciou especificamente a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4.

Estes resultados mostram que as DCs NFAT1^{-/-} derivadas *in vitro* a partir da medula óssea também possuem uma maior capacidade de diferenciar linfócitos T CD4 para Th1 e nos sugere que a subpopulação $CD8\alpha^+$ pode não ser fundamental neste processo.

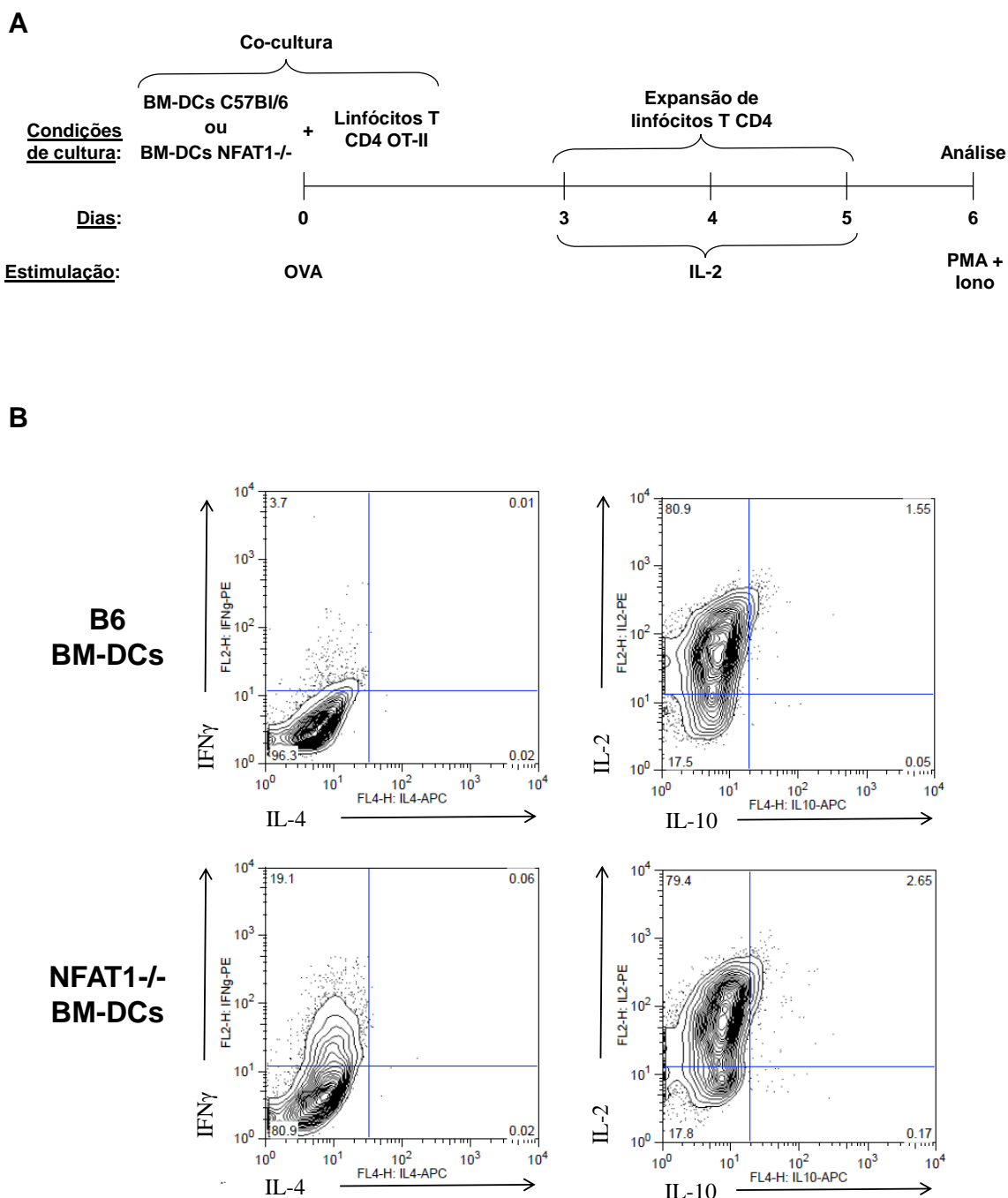


Figura 30: BM-DCs NFAT1-/- também induziram uma maior diferenciação Th1. (A) DCs derivadas *in vitro* a partir da medula óssea (BM-DCs) de camundongos C57Bl/6 e NFAT1-/- foram cocultivadas com linfócitos T CD4 purificados dos linfonodos de camundongos OT-II (proporção 1:10), na presença de peptídeo de OVA (250 μ M). Depois de 3 dias, as células foram recolhidas e expandidas na presença de IL-2 (20 U/mL) por 3 dias consecutivos. As células foram então estimuladas com PMA (10 nM) e Ionomicina (1 μ M) por 6 horas. Duas horas antes do fim do estímulo, adicionou-se Brefeldina A (10 mg/mL). Ao final do estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e guardadas a 4°C. **(B)** As células foram então marcadas intracelularmente com anticorpos contra diferentes citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-10) e analisadas por citometria de fluxo.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Papel do NFAT1 na regulação da produção de IFN- γ .

Com o intuito de entender melhor o papel individual do fator de transcrição NFAT1 na diferenciação de linfócitos T CD4 e consequentemente na resposta imunológica, utilizamos em nossos estudos camundongos deficientes para esse fator de transcrição. Alguns resultados obtidos anteriormente mostraram que os linfócitos T CD4 desses camundongos apresentavam uma tendência à diferenciação Th2, com alta produção de IL-4, IL-5 e IL-13, e baixa produção de IFN- γ (KIANI *et al.*, 1997); e consequentemente um aumento da resposta alérgica *in vivo* (VIOLA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2009).

Entretanto, tivemos uma grande surpresa ao observar que esses camundongos deficientes produziam altos níveis de IFN- γ simultaneamente com altos níveis de IL-4 em um modelo *in vivo* de sensibilização com OVA e CFA. Buscando esclarecer o fenômeno, observamos que essa alta produção de IFN- γ estava relacionada com a estimulação com a OVA e que o uso de CFA intensificava essa produção (**Figura 10-14 e 18**). Como de certa forma esperado, observamos que as principais células produtoras desse IFN- γ neste modelo eram linfócitos T CD4 (**Figura 15**), indicando uma maior diferenciação para Th1 e sugerindo que o NFAT1 estaria funcionando como um regulador negativo da expressão de IFN- γ .

Contudo, já havia sido demonstrado que o NFAT1 seria um regulador positivo da expressão de IFN- γ tanto em linfócitos T CD4 quanto em T CD8 (KIANI *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Este fato nos fez refletir sobre um resultado que tínhamos que mostrava que dependendo do tipo de estimulação usada observávamos um padrão diferente de produção de IFN- γ , isto é, se as células eram estimuladas com OVA havia uma superprodução de IFN- γ , quanto que se elas fossem estimuladas com anti-CD3

havia uma produção diminuída dessa citocina (**Figura 10C e 11**). Sendo a estimulação com anti-CD3 uma estimulação policlonal e que independe da participação de outros tipos celulares, diferentemente da OVA que necessita ser fagocitada, processada e apresentada em um contexto de MHC por APCs a linfócitos específicos, nos sugeriu que a superprodução de IFN- γ poderia estar relacionada com o envolvimento das APCs. Ensaios de cocultura *in vitro* nos mostraram então que de fato as APCs que não apresentavam NFAT1 foram capazes de induzir uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T (**Figura 22**).

Este resultado nos fez questionar que papel o fator de transcrição NFAT1 estaria exercendo nas APCs e como ele poderia estar sendo ativado nessas células. O fato da *M. tuberculosis* intensificar enormemente a produção de IFN- γ nos sugere que os NFATs possam ser ativados através de algum PRR que reconhece esse microorganismo. Apesar de ainda não estar demonstrado que a *M. tuberculosis* seja capaz de ativar os NFATs, existem algumas evidências que sugerem este fato. Sabemos que o receptor dectina-1 é capaz de reconhecer certas estruturas na *M. tuberculosis* e que este é capaz de ativar NFATs (GEIJTENBEEK & GRINGHUIS, 2009; YADAV & SCHOREY, 2006; GOODRIDGE *et al.*, 2007).

Os membros da família NFAT foram abundantemente estudados em linfócitos, não somente por terem sido descritos inicialmente neste tipo celular (SHAW *et al.*, 1988), mas também por terem se mostrado de extrema importância no funcionamento dessas células. Consequentemente, o estudo desses fatores em outros tipos celulares sempre foi bastante escasso, como é o caso das APCs. Pouco é sabido a respeito de sua expressão, das vias pelas quais eles seriam ativados nessas células, assim como, que genes importantes para fisiologia deste tipo celular os NFATs regulariam. Considerando que tínhamos indícios que o NFAT1 estaria regulando alguma função na APC referente à

diferenciação de linfócitos T CD4 e que a principal APC envolvida nessa diferenciação é a DC, investigamos ainda neste trabalho o NFAT1 especificamente nas DCs.

Ensaio de cocultura *in vitro* nos mostraram que DCs deficientes em NFAT1 foram capazes de induzir não só uma maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 (**Figura 23**), como uma maior diferenciação Th1, com altos níveis de IFN- γ e baixos de IL-4 (**Figura 24**), levando-nos a questionar que características essas DCs apresentavam que davam a elas essa capacidade. Um dos principais fatores envolvidos na indução da diferenciação Th1 é a citocina IL-12, que é produzida principalmente por DCs. O fato de termos encontrado uma maior produção de IL-12 nos camundongos NFAT1^{-/-} e que essa IL-12 foi fundamental para superprodução de IFN- γ (**Figuras 19-21**), nos indicou que uma das formas que as DCs deficientes em NFAT1 influenciariam uma maior diferenciação Th1 seria através de uma maior produção de IL-12.

O que podemos inferir sobre o nosso modelo de sensibilização é que, durante o processo, a *Mycobacterium tuberculosis* contida no CFA é reconhecida pelas DCs da pele através de diversos PRRs, principalmente TLR2, TLR9 e dectina-1 (BAFICA *et al.*, 2005; ROTHFUCHS *et al.*, 2007). Esse reconhecimento é fundamental para a maturação e migração destas DCs até os linfonodos drenantes. Uma vez dentro das áreas ricas em células T do linfonodo, as DCs apresentam os antígenos, incluindo a OVA, ativando seletivamente linfócitos específicos e consequentemente induzindo a diferenciação de linfócitos T CD4 específicos para Th1, principalmente através da produção de IL-12.

Essa maior produção de IL-12 pelas DCs poderia ser devido a uma regulação direta do NFAT1 sobre os genes das subunidades da IL-12, como já foi demonstrado para a subunidade p40 (ZHU *et al.*, 2003). Entretanto, nossos estudos mostraram um aumento somente na expressão da subunidade p35 e não na p40, sugerindo que frente a essas condições de estímulo, o NFAT1 poderia estar regulando a expressão da

subunidade p35 ou que a superprodução desta citocina esteja ocorrendo de forma indireta. Uma vez que ainda não existem indícios de que os NFATs regulem a subunidade p35, podemos suspeitar de um efeito indireto.

Esse efeito indireto poderia estar ocorrendo através de uma série de fatores capazes de induzir a produção de IL-12, como citocinas e moléculas de superfície (TRINCHIERI *et al.*, 2003). Um dos primeiros eventos que levam a produção de IL-12 nas DCs é a ativação de PRRs através de PAMPs. Em nosso modelo, o reconhecimento da *Mycobacterium tuberculosis* presente no CFA pelas DCs, através principalmente dos receptores TLR2, TLR9 e dectina-1, induz a produção de IL-12 (BAFICA *et al.*, 2002; ROTHFUCHS *et al.*, 2007). Uma maior expressão de um desses receptores e o consequente aumento das vias de sinalização em células NFAT1^{-/-} poderia levar a uma maior produção de IL-12. Análises da expressão de TLR2 em células NFAT1^{-/-} não revelaram significantes aumentos (dados não mostrados), contudo a expressão dos outros receptores e dos componentes de suas vias de sinalização ainda precisa ser analisada.

No microambiente inflamatório ocorre a produção de uma série de citocinas que podem induzir a produção de IL-12 pelas DCs. Uma das principais citocinas que induzem a produção de IL-12 é o IFN- γ (MA *et al.*, 1996), porém também existem evidência de que a IL-4 e a IL-13 poderiam aumentar a produção desta citocina (D'ANDREA *et al.*, 1995). Levando-se em conta que camundongos deficientes em NFAT1 produzem níveis aumentados de todas essas citocinas, elas poderiam ser as responsáveis pela maior produção de IL-12.

Além das citocinas, moléculas de superfície também influenciam na produção de IL-12. Um dos principais fatores que intensificam drasticamente a produção de IL-12 é a interação do receptor CD40, presente nas DCs, com o CD40L de linfócitos (CELLA *et al.*, 1996). Um aumento na expressão de um desses receptores poderia justificar o

aumento da produção de IL-12 pelas células NFAT1^{-/-}. Entretanto, nossos resultados mostraram que as DCs deficientes em NFAT1 apresentaram níveis equivalente de CD40 em relação as DCs controle (**Figura 29**), sugerindo que esta via não estaria envolvida na superprodução de IL-12. Apesar de não termos ainda evidências sobre a expressão de CD40L em linfócitos NFAT1^{-/-}, podemos suspeitar que a superprodução de IL-12 também não está relacionada com essa molécula, já que nossos resultados de cocultura de DCs com linfócitos T CD4 demonstraram que as DCs NFAT1^{-/-} foram capazes de induzir uma maior diferenciação Th1 independente do fenótipo dos linfócitos T CD4.

Além da IL-12, existem outras citocinas que são produzidas por DCs e que estão envolvidas com a diferenciação Th1, como IL-18, IL-27 e IL-1 (SZABO *et al.*, 2003; SHIBUYA *et al.*, 1999), e que poderiam estar, juntamente com a IL-12, induzindo a superprodução de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-}. Kiani *et al.* (2001) demonstraram que os linfócitos T CD4 deficientes em NFAT1 e IL-4 produziram níveis diminuídos de IFN- γ quando estimulados *in vitro* com anti-CD3. Entretanto, quando esses linfócitos foram estimulados com IL-12 e IL-18, estes produziram mais IFN- γ quando comparado aos linfócitos controle, sugerindo que o NFAT1 possa estar regulando negativamente a produção de IFN- γ induzida por essas citocinas.

A princípio, o NFAT não está envolvido com as vias ativadas pelas citocinas IL-12 e IL-18. O NFAT é ativado nos linfócitos T através de seu TCR, e as citocinas IL-12 e IL-18 ativam STAT4, NF κ B e AP-1 (SZABO *et al.*, 2003). Existem evidências de que a IL-12/IL-18 induza a produção de IFN- γ independentemente da via de sinalização do TCR (YANG *et al.*, 1999). Contudo, alguns trabalhos mostraram interferência da via do TCR com as vias da IL-12 e IL-18 na produção de IFN- γ . Tsuji-Takayama *et al.* (1999) mostraram que para a IL-18 induzir a produção de IFN- γ é preciso que haja tanto a ativação do NF κ B quanto do NFAT. Estes pesquisadores mostraram que a estimulação

de clones Th1 somente com IL-18 induz uma baixa produção de IFN- γ . A estimulação com IL-18 deve estar associada ao estímulo com anti-CD3 para que haja indução de altos níveis de IFN- γ , isto é, a IL-18 deve induzir a ativação do NF κ B e o anti-CD3 do NFAT (TSUJI-TAKAYAMA *et al.*, 1999). Por outro lado, Yoshimoto *et al.* (1998) mostraram que a estimulação de linfócitos T com IL-12 e IL-18 é suficiente para induzir altos níveis de IFN- γ , sugerindo que a cooperação de STAT4 com NF κ B e AP-1 seria suficiente para ativar a expressão do IFN- γ , não necessitando do NFAT. Entretanto, se a estimulação com IL-12/IL-18 for associada ao estímulo de anti-CD3, a produção de IFN- γ diminui (YOSHIMOTO *et al.*, 1998). Esse fenômeno foi revertido com a adição de CsA, que bloqueia a ativação do NFAT (YOSHIMOTO *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem então que a via do TCR, mais especificamente o NFAT, poderia inibir a expressão de IFN- γ induzida pela IL-12/IL-18.

Com o intuito de esclarecer o papel da IL-18 na produção de IFN- γ em nosso modelo, utilizamos anticorpos neutralizantes anti-IL-18 em culturas de células de linfonodo de camundongos sensibilizados estimuladas *in vitro* com OVA. Contudo, o bloqueio desta citocina não interferiu na produção de IFN- γ (dados não mostrados), sugerindo que esta citocina não estaria envolvida ou não seria fundamental para produção de IFN- γ em nosso modelo.

Todavia, Wittmann *et al.* (2006) mostraram que quando linfócitos T humanos estimulados *in vitro* com anti-CD3, anti-CD28 e IL-12 foram tratados com CsA houve um aumento da produção de IFN- γ quando comparado com os linfócitos não tratados. Na ausência da IL-12, a CsA inibiu a produção de IFN- γ , condizendo com resultados já descritos anteriormente. Citocinas como IL-18, IL-23 e IL-27 não promoveram o mesmo efeito que a IL-12. Além disso, foi observado um aumento na expressão de c-fos e consequentemente da atividade de AP-1. Diante desses resultados, Wittmann *et al.*

(2006) propõem que o aumento da expressão de IFN- γ induzido pela CsA requer a cooperação dessas três vias de transdução de sinal, sugerindo que os baixos níveis de NFAT levariam a esse aumento.

Os resultados e a hipótese de Wittmann *et al.* (2006) nos ajudam então a construir uma hipótese sobre nosso modelo onde linfócitos deficientes em NFAT1 produziram altos níveis de IFN- γ quando foram estimulados com OVA, isto é, através de APCs, e níveis diminuídos quando foram estimulados somente com anti-CD3. Durante a estimulação com a OVA, a APC fornece ao linfócito T CD4 o primeiro sinal através do TCR, o segundo sinal através do CD28 e o terceiro sinal através da IL-12; e a ausência do NFAT1 nos linfócitos mimetizaria o efeito da CsA, induzindo consequentemente ao aumento da expressão de IFN- γ . Essa hipótese então sugere um papel diferencial do NFAT1 sobre a regulação da expressão de IFN- γ em relação aos outros membros da família NFAT. Além disso, sugere que dependendo da combinação dos fatores de transcrição que estão se ligando ao promotor do IFN- γ , o NFAT1 pode regular positivamente ou negativamente a expressão do gene dessa citocina.

Alguns resultados obtidos por van Rietschoten *et al.* (2001) reforçam este modelo proposto. Eles mostraram que o fator de transcrição NFAT1 se liga preferencialmente ao promotor do receptor β 2 da IL-12 (IL-12R β 2) em relação a outro membro da família, o NFAT2. Sugerindo que essa preferência de ligação do NFAT1 também pode estar ocorrendo no promotor do IFN- γ . Além disso, van Rietschoten *et al.* (2001) demonstram que o tratamento com CsA aumentou a expressão do receptor IL-12R β 2, mostrando que o NFAT1 regularia negativamente a expressão desse receptor. Diante deste resultado, podemos suspeitar que as células dos camundongos NFAT1^{-/-} apresentem então uma maior expressão do receptor IL-12R β 2. A combinação dessa hipótese com o fato das células NFAT1^{-/-} produzirem maiores quantidades de IL-12 nos sugere que estaria

ocorrendo uma maior ativação da via de sinalização induzida por essa citocina, possivelmente uma maior ativação de STAT4, o que poderia levar conseqüentemente a uma maior expressão de IFN- γ .

Entretanto, não podemos excluir o possível papel de outras citocinas em nosso modelo. A citocina IL-1 também pode ser uma candidata. O papel da IL-1 na resposta imune, principalmente na resposta inata, é bastante claro, entretanto, seu papel na diferenciação Th1/Th2 é um tanto controverso. Weaver *et al.* (1988) demonstraram inicialmente que a IL-1 promovia a proliferação de clones Th2. Enquanto que, Shibuya *et al.* (1998) demonstraram que a IL-1 α era necessária, juntamente com a IL-12, para o desenvolvimento Th1. Em nosso modelo, observamos que as células dos animais NFAT1 $^{-/-}$ apresentaram uma expressão de RNA de IL-1 α e β bastante aumentada, quando comparada as células dos animais NFAT1 $^{+/+}$ (dados não mostrados). Apesar de não termos ainda investigado sua expressão a nível protéico, podemos suspeitar de uma maior sinalização das vias de PRRs de membrana das DCs deficientes em NFAT1, como os TLRs, que são capazes de induzir a expressão de IL-1. Contudo, não podemos inferir se essa IL-1 está sendo clivada e liberada, e com isso tendo alguma ação.

5.2 - Papel do NFAT1 em DCs.

Apesar de não termos comprovado durante este trabalho os mecanismos moleculares que estão induzindo uma maior produção de IFN- γ por linfócitos NFAT1 $^{-/-}$, mostramos, no entanto, que essa indução seria devido a uma ação conjunta de diversos fatores provenientes das DCs NFAT1 $^{-/-}$. Nossos resultados mostraram que o NFAT1 apresenta funções importantes nas DCs, principalmente envolvendo o processo de diferenciação de linfócitos T CD4. Considerando que a disponibilidade de informações

sobre os NFATs em DCs sempre foi muito escassa, resolvemos investigar também neste trabalho que papéis o NFAT1 estaria exercendo nessas células.

Apenas recentemente, isto é, nos últimos três anos, têm surgido evidências nesta área. Até mesmo a expressão dos diversos membros da família NFAT em DCs ainda não foi demonstrada de forma clara e direta na literatura. Apesar de parecer evidente que as DCs apresentariam NFAT1, demonstramos neste trabalho de forma direta que tanto DCs purificadas de baço, quanto derivadas a partir da medula óssea apresentaram NFAT1 e que esse fator se mostrou funcional (**Figura 25 e 26**).

Todos os trabalhos publicados até então que estudaram NFATs em DCs apontam para um papel positivo para esses fatores na regulação de certas citocinas como IL-2, IL-10, IL-12 e IFN- γ , mas não em outras como TNF- α e IL-6 (GOODRIDGE *et al.*, 2007; ZANONI *et al.*, 2009; KAYAMA *et al.*, 2009). Entretanto, somente Kayama *et al.* (2009) mostram o papel individual de um dos membros da família, neste caso o NFAT2, na regulação dessas citocinas. Como já discutido anteriormente, nossos resultados nos sugerem um papel oposto para o NFAT1 sobre a regulação da IL-12 (**Figura 19-21**). Os fatos de Kayama *et al.* (2009) terem mostrado uma regulação de NFAT2 sobre a expressão de IL-12p40, e nossa suspeita de que o NFAT1 regule a expressão de IL-12p35, sugerem novamente que os diferentes NFATs possam ter preferência por certos promotores, ou que o mesmo fator possa regular positivamente ou negativamente a expressão de certas citocinas dependendo do modelo utilizado.

Outra função sugerida pela literatura até o momento, para os NFATs, seria na regulação do ciclo de vida das DCs, isto é, na indução da morte por apoptose de DCs terminalmente diferenciadas (ZANONI *et al.*, 2009). Este trabalho usou como modelo especificamente um dos membros da família, o NFAT1, devido a sua já descrita função na indução da morte por apoptose (SCHUH *et al.*, 1998). ZANONI *et al.* (2009)

mostraram que DCs de camundongos deficientes em NFAT1 apresentaram uma maior sobrevivência após tratamento *in vivo* com LPS, sugerindo que o NFAT1 regularia a morte das DCs. Em nosso trabalho obtivemos um resultado que também sugere este papel para o NFAT1 nas DCs. Observamos que camundongos NFAT1^{-/-} apresentaram um maior número de DCs no baço (**Figura 27**), sugerindo que o NFAT1 poderia estar de fato envolvido na indução da morte de DCs.

Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de estarem ocorrendo outros mecanismos que levaram aos camundongos NFAT1^{-/-} a apresentarem um maior número de DCs no baço. Principalmente por termos observado não só um maior número total de DCs, mas também um aumento na proporção de um dos subtipos de DC, o CD8 α ⁺ (**Figura 28**). Este número maior de DCs pode ter ocorrido devido a uma maior geração dessas células na medula óssea desses animais deficientes, sugerindo um papel negativo para o NFAT1 na geração desta subpopulação.

As citocinas GM-CSF e FLT3L mostraram estar envolvidas na geração das DCs tanto *in vitro* quanto *in vivo* (INABA *et al.*, 1992; BRASEL *et al.*, 2000; LYMAN & JACOBSEN, 1998; DARO *et al.*, 2000). Considerando que os NFATs são conhecidos por regularem a expressão de diversas citocinas no sistema imune, e que já foi mostrado estarem envolvidos com a regulação do GM-CSF (RAO *et al.*, 1997), podemos sugerir que os camundongos NFAT1^{-/-} podem apresentar uma maior expressão dessas citocinas e conseqüentemente uma maior geração de DCs pela medula óssea. Contudo, Daro *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento de camundongos com GM-CSF induziu no baço desses animais uma maior expansão de DCs do subtipo CD8 α ⁻, sugerindo que possivelmente não seria o GM-CSF a citocina envolvida no aumento do número de DCs nos camundongos NFAT1^{-/-}. O tratamento de camundongos com FLT3L também induziu a expansão de DCs, uma vez que esses animais apresentaram um número

aumentado dessas células em vários órgãos linfóides (LYMAN & JACOBSEN, 1998; MARASKOVSKY *et al.*, 1996). Entretanto, ainda não está claro na literatura se a citocina FLT3L induziria a expansão preferencial do subtipo CD8 α^+ e nem que os NFATs possam regular a expressão desta citocina.

Na verdade, ainda não está bem claro como ocorre a geração da subpopulação de DCs CD8 α^+ (DEL HOYO *et al.*, 2002; NAIK *et al.*, 2003) (revisado em SATHE & SHORTMAN, 2008). Contudo, foi demonstrado que o fator de transcrição ICSBP (do inglês, *Interferon Consensus Sequence-Binding Protein*) é essencial para a geração desta subpopulação de DCs (ALIBERTI *et al.*, 2003). Além de o ICSBP ser somente expresso em DCs CD8 α^+ , camundongos deficientes para esse fator de transcrição apresentaram uma profunda e seletiva deficiência na geração desse subtipo de DCs (ALIBERTI *et al.*, 2003). Considerando que existem evidências de interação do NFAT com ICSBP (ZHU *et al.*, 2003), podemos sugerir que o NFAT1 possa regular negativamente a geração das DCs CD8 α^+ através de uma colaboração com ICSBP. De qualquer maneira, nossos resultados sugerem que o NFAT1 regule negativamente a geração das DCs CD8 α^+ , logo podemos suspeitar que essa subpopulação apresente uma expressão aumentada de NFAT1 com relação às outras subpopulações nos camundongos normais.

Outro ponto importante na biologia das DCs é seu processo ou estado de maturação. Apesar de existirem algumas sugestões de que os NFATs poderiam estar envolvidos nesse processo (ENGELS *et al.*, 2000), nossos resultados sugerem que o NFAT1 não estaria envolvido (**Figura 29**). Apesar de Kayama *et al.* (2009) terem observado que DCs de camundongos deficientes em NFAT2 apresentaram uma pequena redução na maturação de DCs ativadas com *T. cruzi*, essa redução foi revertida com a adição de IFN- γ e não foi observada quando as DCs foram estimuladas com LPS, sugerindo que essa redução não estaria ocorrendo por efeito direto do NFAT2. Logo,

acreditamos que os NFATs não estejam envolvidos com o processo de maturação das DCs.

Contudo, o ponto central na biologia das DCs é quando elas interagem com os linfócitos e direcionam a resposta imune adaptativa. Como já citado, as DCs exercem um papel central no direcionamento da diferenciação dos linfócitos T CD4. Observamos em nosso trabalho que o fator de transcrição NFAT1 presente em DCs influencia no direcionamento Th1 (**Figura 24 e 30**). Como já discutido anteriormente, a nossa maior suspeita seria que as DCs NFAT1^{-/-} estariam produzindo mais IL-12 e desta forma induzindo uma maior diferenciação Th1. O fato de termos observado uma maior porcentagem de DCs do subtipo CD8 α ⁺, que é o subtipo que mais produz IL-12 e com maior envolvimento na diferenciação Th1, nos sugeriu que essa população poderia estar especificamente envolvida com a capacidade das DCs NFAT1^{-/-}. Contudo, nossos ensaios de cocultura de DCs derivadas *in vitro* a partir de medula óssea, que não apresentam essa subpopulação, sugerem que a capacidade que as DCs NFAT1^{-/-} apresentam em induzir uma maior diferenciação Th1 não parece depender dessa subpopulação (**Figura 30**).

Apesar da outra subpopulação de DCs (CD8 α ⁻) não ser a subpopulação mais envolvida com a diferenciação Th1, ela também é capaz de produzir IL-12 em níveis mais baixos, logo as DCs CD8 α ⁻ NFAT1^{-/-} poderiam estar produzindo mais IL-12 que as DCs controle e induzindo uma maior diferenciação Th1 comparativamente. Além disso, já foi mostrado que as DCs CD8 α ⁻ também podem induzir a diferenciação Th1 através de mecanismos independentes de IL-12, através da expressão da molécula de superfície Delta 4 (ligante do receptor Notch) (SKOKOS & NUSSENZWEIG, 2007). É possível que as DCs CD8 α ⁻ NFAT1^{-/-} tenham uma maior expressão de Delta 4 e com

isso induzam uma maior diferenciação Th1. Entretanto, ainda não existem evidências de uma correlação entre NFATs e ligantes de Notch.

Há também a possibilidade de que as DCs NFAT1^{-/-}, seja qual for a subpopulação, estejam induzindo uma maior diferenciação Th1 por estarem em maior número, ou como já discutimos anteriormente, por estarem sobrevivendo por mais tempo. ZANONI *et al.* (2009) mostraram uma maior indução da resposta de linfócitos T CD4 por DCs NFAT1^{-/-} e sugerem que essa indução está correlacionada com a maior sobrevivência das DCs.

Independentemente dos mecanismos que estão ocorrendo, mostramos em nosso trabalho que o fator de transcrição NFAT1 presente em DCs é fundamental para modular a diferenciação de linfócitos T CD4. Sendo os NFATs e as DCs importantes alvos terapêuticos através do uso de drogas imunossupressoras (HACKSTEIN & THOMSON, 2004), podemos sugerir com nossos resultados que, se bloquearmos especificamente o fator de transcrição NFAT1 em DCs, podemos aumentar a resposta imune para o fenótipo Th1 e com isso aumentar as chances de cura de diversas doenças que dependem desse tipo de resposta, como por exemplo, a tuberculose.

6. CONCLUSÕES

- Células dos camundongos NFAT1^{-/-} sensibilizados apresentaram uma maior produção de IFN- γ quando reestimuladas *in vitro* com OVA.
- A produção aumentada de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-} se correlaciona com o estímulo de OVA e com as APCs.
- Linfócitos T CD4 foram os principais produtores de IFN- γ frente ao estímulo de OVA e os principais responsáveis pela superprodução de IFN- γ pelas células NFAT1^{-/-}.
- Estímulos microbianos presentes na sensibilização, como a *Mycobacterium tuberculosis* e o LPS, intensificaram a produção de IFN- γ , mas não foram fundamentais para sua produção.
- A citocina IL-12 foi um dos principais fatores envolvidos na superprodução de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-}.
- APCs NFAT1^{-/-} foram as responsáveis por induzir uma maior produção de IFN- γ pelos linfócitos NFAT1^{-/-}.
- O fator de transcrição NFAT1 está presente em DCs purificadas de baço ou derivadas de medula óssea e foi ativado com estímulos que induzem o influxo de cálcio ou com estímulos fisiológicos como o zymosan.
- O fator de transcrição NFAT1 parece estar envolvido com o ciclo de vida das DCs, mas não em seu processo de maturação.
- O fator de transcrição NFAT1 de DCs, purificadas de baço ou derivadas de medula óssea, foi fundamental para modular a diferenciação Th1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFKARIAN, M., SEDY, J.R., YANG, J., JACOBSON, N.G., CEREB, N., YANG, S.Y., MURPHY, T.L., MURPHY, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nature Immunol.* **3**:549-557.
- AKIRA, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:59-63.
- AKIRA, S., TAKEDA, K., KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* **2**:675-680.
- ALIBERTI, J., SCHULZ, O., PENNINGTON, D.J., TSUJIMURA, H., REIS E SOUSA, C., OZATO, K., SHER, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8 α ⁺ dendritic cells. *Blood* **101**:305-310.
- ARDAVIN, C., WU, L., LI, C.L., SHORTMAN, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**:761-763.
- BAFICA, A., SCANGA, C.A., FENG, C.G., LEIFER, C., CHEEVER, A., SHER, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **12**:1715-1724.
- BANCHEREAU, J., STEINMAN, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
- BARNDEN, M.J., ALLISON, J., HEATH, W.R., CARBONE, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**:34-40.
- BOGDAN, C., SCHLEICHER, U. (2006). Production of interferon- γ by myeloid cells – fact or fancy? *TRENDS Immunol.* **27**:282-290.

- BRASEL, K., DE SMEDT, T., SMITH, J.L., MALISZEWSKI, C.R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**:3029-3039.
- BROWN, G.D. (2006). Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:33-43.
- CAETANO, M.S., VIEIRA-DE-ABREU, A., TEIXEIRA, L.K., WERNECK, M.B.F., BARCINSKI, M.A., VIOLA, J.P.B. (2002). NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocytes activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J.* **16**:1940-1942.
- CELLA, M., SCHEIDEGGER, D., PALMER-LEHMANN, LANE, P., LANZAVECCHIA, A., ALBER, G. (1996). Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation. *J. Exp. Med.* **184**:747-752.
- COLONNA, M., TRINCHIERI, G., LIU, Y. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**:1219-1226.
- CONSTANT, S.L., BOTTOMLY, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:297-322.
- CREAGH, E.M., O'NEILL, L.A.J. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *TRENDS Immunol.* **27**:352-357.
- D'AMICO, A., WU, L. (2003). The Early Progenitors of Mouse Dendritic Cells and Plasmacytoid Predendritic Cells Are within the Bone Marrow Hemopoietic Precursors Expressing Flt3. *J. Exp. Med.* **198**:293-303.
- D'ANDREA, A., MA, X., ASTE-AMEZAGA, M., PAGANIN, C., TRINCHIERI, G. (1995). Stimulatory and Inhibitory Effects of Interleukin (IL)-4 and IL-13 on the Production of Cytokines by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Priming for IL-12 and Tumor Necrosis Factor α Production. *J. Exp. Med.* **181**:537-546.

- DARO, E., PULENDRAN, B., BRASEL, K., TEEPE, M., PETTIT, D., LYNCH, D.H., VREMEC, D., ROBB, L., SHORTMAN, K., MCKENNA, H.J., MALISZEWSKI, C.R., MARASKOVSKY, E. (2000). Polyethylene Glycol-Modified GM-CSF Expands CD11b^{high}CD11c^{high} But Not CD11b^{low}CD11^{high} Murine Dendritic Cells In Vivo: a Comparative Analysis with Flt3 Ligand. *J. Immunol.* **165**:49-58.
- DEL HOYO, G.M., MARTÍN, P., ARIAS, C.F., MARÍN, A.R., ARDAVIN, C. (2002). CD8 α ⁺ dendritic cells originate from the CD8 α ⁻ dendritic cell subset by a maturation process involving CD8 α , DEC-205, and CD24 up-regulation. *Blood* **99**:999-1004.
- ENGELS, F.H.C., KREISEL, D., FARIES, M.B., BEDROSIAN, I., KOSKI, G.K., COHEN, P.A., CZERNIECKI, B.J. (2000). Calcium ionophore activation of chronic myelogenous leukemia progenitor cells into dendritic cells is mediated by calcineurin phosphatase. *Leuk. Res.* **24**:795-804.
- FARIES, M.B., BEDROSIAN, I., XU, S., KOSKI, G., ROROS, J.G., MOISE, M.A., NGUYEN, H.Q., ENGELS, FRIEDERKE, H.C., COHEN, P.A., CZERNIECKI, B.J. (2001). Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83⁺ dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* **98**:2489-2497.
- FESKE, S. (2007). Calcium signaling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:690-702.
- FONSECA, B.P.F., OLSEN, P.C., COELHO, L.P., FERREIRA, T.P.T., SOUZA, H.S., MARTINS, M.A., VIOLA, J.P.B. (2009). NFAT1 Transcription Factor Regulates Pulmonary Allergic Inflammation and Airway Responsiveness. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **40**:66-75.
- FRUCHT, D.M., FUKAO, T., BOGDAN, C., SCHINDLER, H., O'SHEA, J.J., KOYASU, S. (2001). IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *TRENDS Immunol.* **22**:556-560.

- FUKAO, T., MATSUDA, S., KOYASU, S. (2000). Synergistic Effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-Dependent IFN- γ Production by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **164**:64-71.
- GANTNER, B.N., SIMMONS, R.M., CANAVERA, S.J., AKIRA, S., UNDERHILL, D.M. (2003). Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *J. Exp. Med.* **197**:1107-1117.
- GEIJTENBEEK, T.B.H., GRINGHUIS, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:465-479.
- GOODRIDGE, H.S., SIMMONS, R.M., UNDERHILL, D.M. (2007). Dectin-1 Stimulation by *Candida albicans* Yeast or Zymosan Triggers NFAT Activation in Macrophages and Dendritic Cells. *J. Immunol.* **178**:3107-3115.
- GOODRIDGE, H.S., UNDERHILL, D.M. (2008). Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**:87-108.
- GRANUCCI, F., ZANONI, I., RICCIARDI-CASTAGNOLI. (2008). Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:1683-1697.
- HACKSTEIN, H., THOMSON, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:24-34.
- HEATH, W.R., CARBONE, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* **10**:1237-1244.
- HO, A.M., JAIN, J., RAO, A., HOGAN, P.G. (1994). Expression of the Transcription Factor NFATp in a Neuronal Cell Line and in the Murine Nervous System. *J. Biol. Chem.* **269**:28181-28186.
- HO, I., GLIMCHER, L.H. (2002). Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* **109**:S109-S120.

- HOCHREIN, H., SHORTMAN, K., VREMEC, D., SCOTT, B., HERTZOG, P., O'KEEFFE, M. (2001). Differential Production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by Mouse Dendritic Cell Subsets. *J. Immunol.* **166**:5448-5455.
- HOCHREIN, H., O'KEEFFE, M. (2008). Dendritic Cell Subsets and Toll-Like Receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**:153-177.
- HODGE, M.R., RANGER, A.M., CHARLES DE LA BROUSSE, F., HOEY, T., GRUSBY, M.J., GLIMCHER, L.H. (1996). Hyperproliferation and Dysregulation of IL-4 Expression in NF-ATp-Deficient Mice. *Immunity* **4**:397-405.
- HSU, S., O'CONNELL, P.J., KLYACHKO, V.A., BADMINTON, M.N., THOMSON, A.W., JACKSON, M.B., CLAPHAM, D.E., AHERN, G.P. (2001). Fundamental Ca²⁺ Signaling Mechanisms in Mouse Dendritic Cells: CRAC Is the Major Ca²⁺ Entry Pathway. *J. Immunol.* **166**:6126-6133.
- INABA, K., STEINMAN, R.M. (1984). Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J. Exp. Med.* **160**:1717-1735.
- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R.M. (1992). Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *J. Exp. Med.* **176**:1693-1702.
- INABA, K., INABA, M., NAITO, M., STEINMAN, R.M. (1993). Dendritic Cell Progenitors Phagocytose Particulates, Including Bacillus Calmette-Guerin Organisms, and Sensitize Mice to Mycobacterial Antigens In Vivo. *J. Exp. Med.* **178**:479-488.
- ITANO, A.A., JENKINS, M.K. (2003). Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* **4**:733-739.

- JENKINS, M.K., KHORUTS, A., INGULLI, E., MUELLER, D.L., MCSORLEY, S.J., REINHARDT, R.L., ITANO, A., PAPE, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:23-45.
- KAMATH, A.T., POOLEY, J., O'KEEFFE, M.A., VREMEC, D., ZHAN, Y., LEW, A.M., D'AMICO, A., WU, L., TOUGH, D.F., SHORTMAN, K. (2000). The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *J. Immunol.* **165**:6762-6770.
- KAPSENBERG, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:984-993.
- KARSUNKY, H., MERAD, M., COZZIO, A., WEISSMAN, I.L., MANZ, M.G. (2003). Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3⁺ Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3⁺ Dendritic Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* **198**:305-313.
- KAYAMA, H., KOGA, R., ATARASHI, K., OKUYAMA, M., KIMURA, T., MAK, T.W., UEMATSU, S., AKIRA, S., TAKAYANAGI, H., HONDA, K., YAMAMOTO, M., TAKEDA, K. (2009). NFATc1 Mediates Toll-Like Receptor-Independent Innate Immune Responses during *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Pathog.* **5**:1-15.
- KIANI, A., VIOLA, J.P.B., LICHTMAN, A.H., RAO, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* **7**:849-860.
- KIANI, A., GARCIA-CÓZAR, F.J., HABERMANN, I., LAFORSCH, S., AEBISCHER, T., EHNINGER, G., RAO, A. (2001). Regulation of interferon- γ gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* **98**:1480-1488.

- KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R.M., CLARK, S.C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B., TRINCHIERI, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**:827-845.
- LEE, J., GANSTER, R.W., GELLER, D.A., BURCKART, G.J., THOMSON, A.W., LU, L. (1999). Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: Association with Reduced Nuclear Translocation of Nuclear Factor Kappa B. *Transplantation* **68**:1255.
- LEE, Y., YANG, I., LEE, Y., IM, S., SONG, S., LI, H., HAN, K., KIM, K., EO, S.K., LEE, C. (2005). Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. *Blood* **105**:3951-3955.
- LEE, M.S., KIM, Y. (2007). Pattern-Recognition Receptor Signalling Initiated From Extracellular, Membrane, and Cytoplasmic Space. *Mol. Cells.* **23**:1-10.
- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C., ARAMBURU, J., RAKEMAN, A.S., RAO, A. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7214-7219.
- LYMAN, S.D., JACOBSEN, S.E.W. (1998). *c-kit* Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood* **91**:1101-1134.
- MA, X., CHOW, J.M., GRI, G., CARRA, G., GEROSA, F., WOLF, S.F., DZIALO, R., TRINCHIERI, G. (1996). The Interleukin 12 p40 Gene Promoter Is Primed by Interferon γ in Monocytic Cells. *J. Exp. Med.* **183**:147-157.
- MACATONIA, S.E., HOSKEN, N.A., LITTON, M., VIEIRA, P., HSIEH, C., CULPEPPER, J.A., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., MURPHY, K.M., O'GARRA, A. (1995). Dendritic Cells Produce IL-12 and Direct the Development of Th1 Cells from Naïve CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* **154**:5071-5079.

- MACIAN, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:472-484.
- MALDONADO-LÓPEZ, R., SMEDT, T.D., MICHEL, P., GODFROID, J., PAJAK, B., HEIRMAN, C., THIELEMANS, K., LEO, O., URBAIN, J., MOSER, M. (1999). CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* **189**:587-592.
- MANZ, M.G., TRAVER, D., MIYAMOTO, T., WEISSMAN, I.L., AKASHI, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**:3333-3341.
- MARASKOVSKY, E., BRASEL, K., TEEPE, M., ROUX, E.R., LYMAN, S.D., SHORTMAN, K., MCKENNA, H.J. (1996). Dramatic Increase in the Numbers of Functionally Mature Dendritic Cells in Flt3 Ligand-treated Mice: Multiple Dendritic Cell Subpopulations Identified. *J. Exp. Med.* **184**:1953-1962.
- MCKENNA, H.J., STOCKING, K.L., MILLER, R.E., BRASEL, K., DE SMEDT, T., MARASKOVSKY, E., MALISZEWSKI, C.R., LYNCH, D.H., SMITH, J., PULENDRAN, B., ROUX, E.R., TEEPE, M., LYMAN, S.D., PESCHON, J.J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**:3489-3497.
- MILOUD, T., HÄMMERLING, G.J., GARBI, N. (2010). Review of Murine Dendritic Cells: Types, Location, and Development. *Methods Mol. Biol.* **595**:21-42.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J. Immunol.* **136**:2348-2357.

- MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. (1989). Th1 and Th2 cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**:145-173.
- MÜLLER, M.R., SASAKI, Y., STEVANOVIC, I., LAMPERTI, E.D., GHOSH, S., SHARMA, S., GELINAS, C., ROSSI, D.J., PIPKIN, M.E., RAJEWSKY, K., HOGAN, P.G., RAO, A. (2009). Requirement for balanced Ca/NFAT signaling in hematopoietic and embryonic development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **106**:7034-7039.
- NAIK, S., VREMEC, D., WU, L., O'KEEFFE, M., SHORTMAN, K. (2003). CD8 α ⁺ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8 α ⁻ dendritic cell subset. *Blood* **15**:601-604.
- NAIK, S.H., PROIETTO, A.I., WILSON, N.S., DAKIC, A., SCHNORRER, P., FUCHSBERGER, M., LAHOUD, M.H., O'KEEFFE, M., SHAO, Q., CHEN, W., VILLADANGOS, J.A., SHORTMAN, K., WU, L. (2005). Cutting Edge: Generation of Splenic CD8⁺ and CD8⁻ Dendritic Cell Equivalents in Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Bone Marrow Cultures. *J. Immunol.* **174**:6592-6597.
- OHTEKI, T., FUKAO, T., SUZUE, K., MAKI, C., ITO, M., NAKAMURA, M., KOYASU, S. (1999). Interleukin 12-dependent Interferon γ Production by CD8 α ⁺ Lymphoid Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **189**:1981-1986.
- OKAMURA, H., KASHIWAMURA, S., TSUTSUI, H., YOSHIMOTO, T., NAKANISHI, K. (1998). Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.* **10**:259-264.
- PERRIN-COCON, L., AGAUGUÉ, S., COUTANT, F., MASUREL, A., BEZZINE, S., LAMBEAU, G., ANDRÉ, P., LOTTEAU, V. (2004). Secretory phospholipase A₂ induces dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **34**:2293-2302.

- PULENDRAN, B., MARASKOVSKY, E., BANCHEREAU, J., MALISZEWSKI, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends in Immunology* **22**:41-47.
- PULENDRAN, B., TANG, H., DENNING, T.L. (2008). Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **20**:61-67.
- RAO, A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today* **15**:274-281.
- RAO, A., LUO, C., HOGAN, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:707-747.
- REIS E SOUSA, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:476-483.
- RENGARAJAN, J., SZABO, S.J., GLIMCHER, L.H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* **21**:479-483.
- ROGERS, N.C., SLACK, E.C., EDWARDS, A.D., NOLTE, M.A., SCHULZ, O., SCHWEIGHOFFER, E., WILLIAMS, D.L., GORDON, S., TYBULEWICZ, V.L., BROWN, G.D., REIS E SOUSA, C. (2005). Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity* **22**:507-517.
- ROTHFUCHS, A.G., BAFICA, A., FENG, C.G., EGEN, J.G., WILLIAMS, D.L., BROWN, G.D., SHER, A. (2007). Dectin-1 Interaction with *Mycobacterium tuberculosis* Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* **179**:3463-3471.
- SALLUSTO, F., CELLA, M., DANIELI, C., LANZAVECCHIA, A. (1995). Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.

- SATHE, P., SHORTMAN, K. (2008). The steady-state development of splenic dendritic cells. *Muc. Immunol.* **1**:425-431.
- SATO, K., FUJITA, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergol. Int.* **56**:183-191.
- SCHUH, K., KNEITZ, B., HEYER, J., BOMMhardt, U., JANKEVICS, E., BERBERICH-SIEBELT, F., PFEFFER, K., MÜLLER-HERMELINK, H.K., SCHIMPL, A., SERFLING, E. (1998). Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **28**:2456-2466.
- SCHULER, G., STEINMAN, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* **161**:526-546.
- SHAW, J., UTZ, P.J., DURAND, D.B., TOOLE, J.J., EMMEL, E.A., CRABTREE, G.R. (1988). Identification of a Putative Regulator of Early T Cell Activation Genes. *Science* **241**:202-205.
- SHIBAKI, A., KATZ, S.I. (2002). Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp. Dermatol.* **11**:126-134.
- SHIBUYA, K., ROBINSON, D., ZONIN, F., HARTLEY, S.B., MACATONIA, S.E., SOMOZA, C., HUNTER, C.A., MURPHY, K.M., O'GARRA, A. (1998). IL-1 α and TNF- α are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN- γ in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J. Immunol.* **160**:1708-1716.
- SHORTMAN, K., LIU, Y. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:151-161.
- SHORTMAN, K., NAIK, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:19-30.

- SILBERBERG, I., BAER, R.L., ROSENTHAL, S.A. (1976). The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* **66**:210-217.
- SKOKOS, D., NUSSENZWEIG, M.C. (2007). CD8- DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. *J. Exp. Med.* **204**:1525-1531.
- STEINMAN, R.M., COHN, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *J. Exp. Med.* **137**:1142-1162.
- STEINMAN, R.M., LUSTIG, D.S., COHN, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional Properties in vivo. *J. Exp. Med.* **139**:1431-1445.
- STEINMAN, R.M., WITMER, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:5132-5136.
- STEINMAN, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.
- STEINMAN, R.M., TURLEY, S., MELLMAN, I., INABA, K. (2000). The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* **191**:411-416.
- STEINMAN, R.M. (2007). Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat. Med.* **13**:1155-1159.
- STINGL, G., TAMAKI, K., KATZ, S.I. (1980). Origin and Function of Epidermal Langerhans Cells. *Immunol. Rev.* **53**:149-174.

- STOBER, D., SCHIRMBECK, R., REIMANN, J. (2001). IL-12/IL-18-dependent IFN- γ release by murine dendritic cells. *J. Immunol.* **167**:957-965.
- SZABO, S.J., SULLIVAN, B.M., PENG, S.L., GLIMCHER, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:713-758.
- TEIXEIRA, L.K., FONSECA, B.P.F., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOZA, B.A., ROBBS, B.K., BOZZA, P.T., VIOLA, J.P.B. (2005). IFN- γ Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation. *J. Immunol.* **175**:5931-5939.
- TIMMERMAN, J.M., LEVY, R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* **50**:507-529.
- TRAVER, D., AKASHI, K., MANZ, M., MERAD, M., MIYAMOTO, T., ENGLEMAN, E.G., WEISSMAN, I.L. (2000). Development of CD8 α -Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science* **290**:2152-2154.
- TRINCHIERI, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:133-146.
- TRINCHIERI, G., SHER, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 179-190.
- TSUJI-TAKAYAMA, K., AIZAWA, Y., OKAMOTO, I., KOJIMA, H., KOIDE, K., TAKEUCHI, M., IKEGAMI, H., OHTA, T., KURIMOTO, M. (1999). Interleukin-18 induces interferon- γ production through NF- κ B and NFAT activation in murine T helper type 1 cells. *Cell. Immunol.* **196**:41-50.
- UENO, H., KLECHEVSKY, E., MORITA, R., ASPORD, C., CÃO, T., MATSUI, T., DI PUCCHIO, T., CONNOLLY, J., FAY, J.W., PASCUAL, V., PALUCKA, A.K., BANCHEREAU, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* **219**:118-142.

- VALLADEAU, J., SAELAND, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**:273-283.
- VAN RIETSCHOTEN, J.G.I., SMITS, H.H., VAN DE WETERRING, D., WESTLAND, R., VERWEIJ, C.L., DEN HARTOG, M.T., WIERENGA, E.A. (2001). Silencer Activity of NFATc2 in the Interleukin-12 Receptor β 2 Proximal Promoter in Human T Helper Cells. *J. Biol. Chem.* **276**:34509-34516.
- VIOLA, J.P.B., KIANI, A., BOZZA, P.T., RAO, A. (1998). Regulation of Allergic Inflammation and Eosinophil Recruitment in Mice Lacking the Transcription Factor NFAT1: Role of Interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* **91**:2223-2230.
- VREMEC, D., LIESCHKE, G.J., DUNN, A.R., ROBB, L., METCALF, D., SHORTMAN, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **27**:40-44.
- VREMEC, D., POOLEY, J., HOCHREIN, H., WU, L., SHORTMAN, K. (2000). CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *J. Immunol.* **164**:2978-2986.
- YADAV, M., SCHOREY, J.S. (2006). The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* **108**:3168-3175.
- YANG, J., MURPHY, T.L., OUYANG, W., MURPHY, K.M. (1999). Induction of interferon- γ production in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.* **29**:548-555.
- YOSHIMOTO, T., TAKEDA, K., TANAKA, T., OHKUSU, K., KASHIWAMURA, S., OKAMURA, H., AKIRA, S., NAKANISHI, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production. *J. Immunol.* **161**:3400-3407.

- WANG, D.Z., MCCAFFERY, P.G., RAO, A. (1995). The Cyclosporin-sensitive Transcription Factor NFATp Is Expressed in Several Classes of Cells in the Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **766**:182-194.
- WEAVER, C.T., HAWRYLOWICZ, C.M., UNANUE, E.R. (1988). T helper cell subsets require the expression of distinct costimulatory signals by antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8181-8185.
- WEAVER, C.T., HARRINGTON, L.E., MANGAN, P.R., GAVRIELI, M., MURPHY, K.M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity* **24**:677-688.
- WITTMANN, M., KILLIG, C., BRUDER, M., GUTZMER, R., WERFEL, T. (2006). Critical involvement of IL-12 in IFN- γ induction by calcineurina antagonists in activated human lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **80**:75-86.
- WU, L., D'AMICO, A., HOCHREIN, H., O'KEEFFE, M., SHORTMAN, K., LUCAS, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**:3376-3382.
- XANTHOUDAKIS, S., VIOLA, J.P.B., SHAW, K.T.Y., LUO, C., WALLACE, J.D., BOZZA, P.T., CURRAN, T., RAO, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**:892-895.
- XU, S., HUO, J., LEE, K., KUROSAKI, T., LAM, K. (2009). Phospholipase C γ 2 Is Critical For Dectin-1-Mediated Ca²⁺ Flux and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J. Biol. Chem.* **284**:7038-7046.
- ZANONI, I., OSTUNI, R., CAPUANO, G., COLLINI, M., CACCIA, M., RONCHI, A.E., ROCCHETTI, M., MINGOZZI, F., FOTI, M., CHIRICO, G., COSTA, B., ZAZA, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., GRANICCI, F. (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* **460**:264-268.

ZHANG, Y., APILADO, R., COLEMAN, J., BEM-SASSON, S., TSANG, S., HU-LI, J., PAUL, W.E., HUANG, H. (2001). Interferon- γ stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* **194**:165-172.

ZHU, C., RAO, K., XIONG, H., GAGNIDZE, K., LI, F., HORVATH, C., PLEVY, S. (2003). Activation of the Murine Interleukin-12 p40 Promoter by Functional Interactions between NFAT and ICSBP. *J. Biol. Chem.* **278**:39372-39382.

ZHU, J., PAUL, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**:1557-1569.

ANEXO

Teixeira, L.K., Fonseca, B.P.F., Vieira-de-Abreu, A., **Barboza, B.A.**, Robbs, B.K., Bozza, P.T., Viola, J.P.B. (2005). IFN- γ Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation. *J. Immunol.* **175**:5931-5939.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Animals, cells, and reagents

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

Cell isolation and flow cytometry

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

CD4⁺ Th differentiation

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

ELISA and intracellular cytokine staining

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

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

RNase protection assays, Western blot, and immunofluorescence staining

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

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

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

Retroviral construction and lymphocyte transduction

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

Transactivation assays

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

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

Eomesodermin (Eomes) RT-PCR

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

Pleurisy model

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

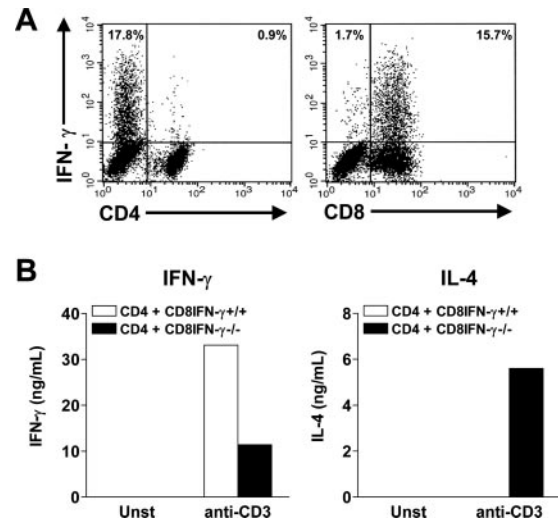


FIGURE 1. IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes enhances CD4⁺ Th1 differentiation. *A*, Total lymph node cells from naive C57BL/6 mice were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. Data are representative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

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

IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes

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

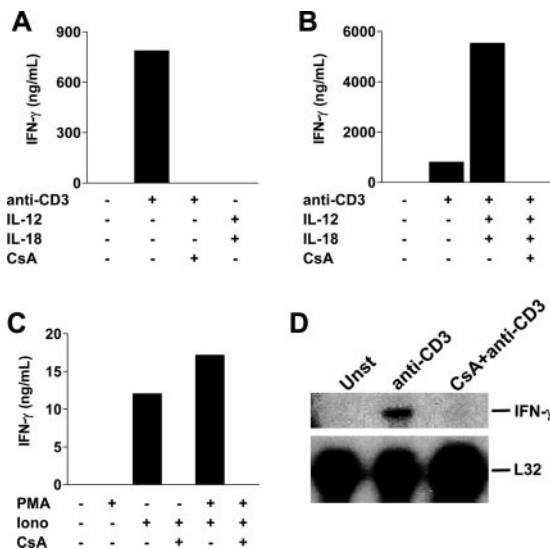


FIGURE 2. TCR triggering induces IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes in a CsA-sensitive manner. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated or stimulated in vitro as indicated: anti-CD3 (1 μ g/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml), PMA (10 nM),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

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

CD8⁺ T lymphocytes present functional NFAT1 protein

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

Effect of NFAT transcription factor on IFN- γ promoter

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

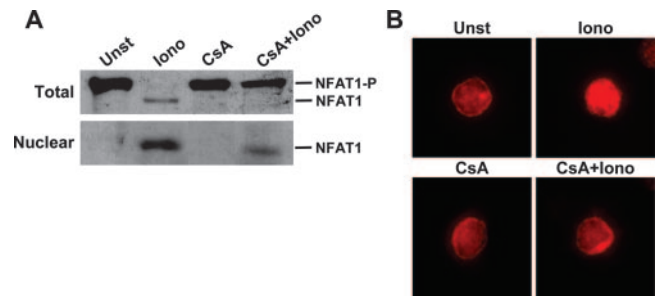


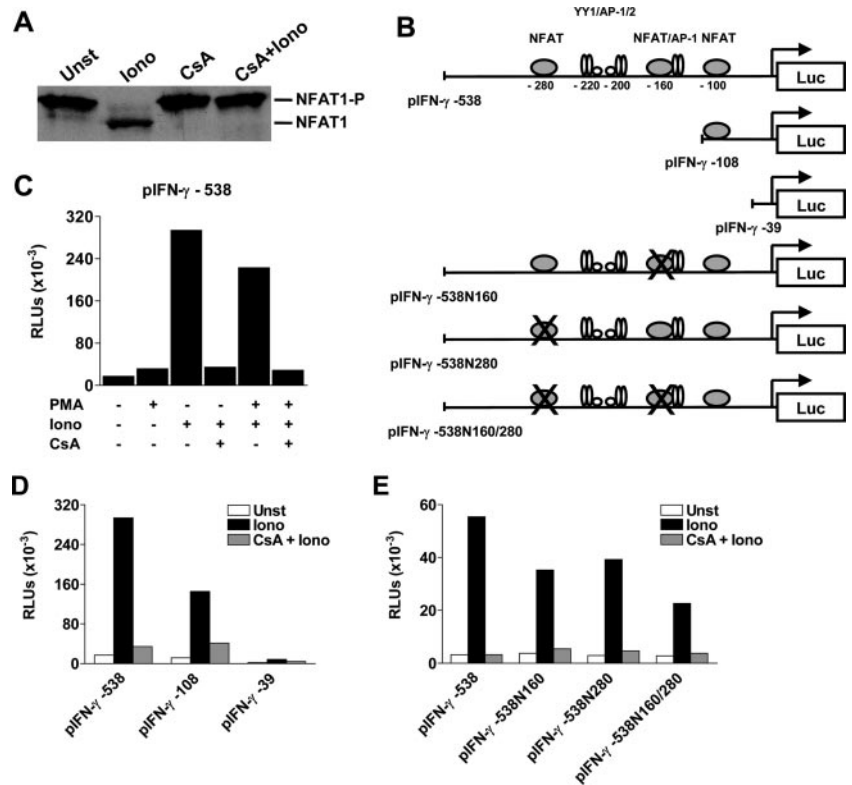
FIGURE 3. NFAT1 is dephosphorylated and translocated to the nucleus in CD8⁺ T lymphocytes after Ca²⁺ influx. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M) or CsA (5 μ M). CsA was added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

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

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

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

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



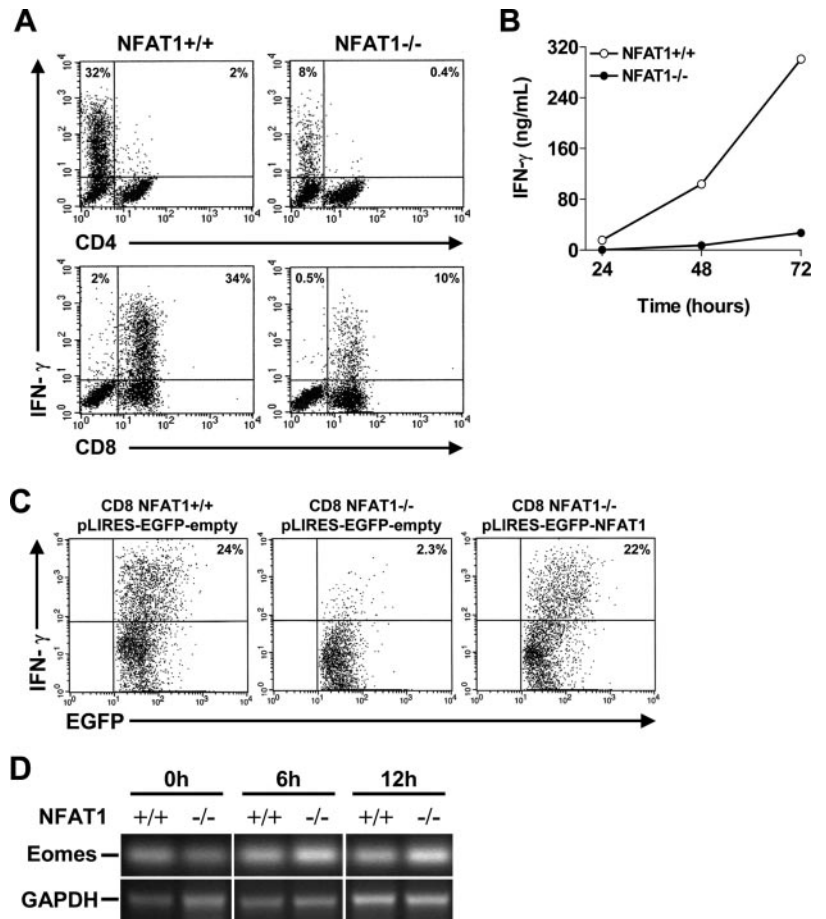
cells represented the main source of IFN- γ during the primary response (Fig. 5A). Furthermore, NFAT1^{-/-} mice showed a 3-fold decrease in the frequency of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells compared with NFAT1^{+/+} mice after 72 h of in vitro stimulation (Fig. 5A). Also, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells showed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

In vivo consequences of NFAT1-dependent IFN- γ production

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

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

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



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

Discussion

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

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

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

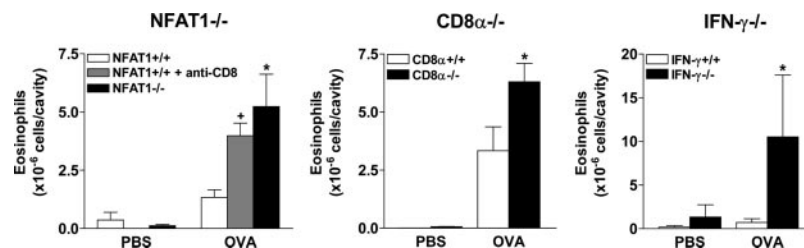
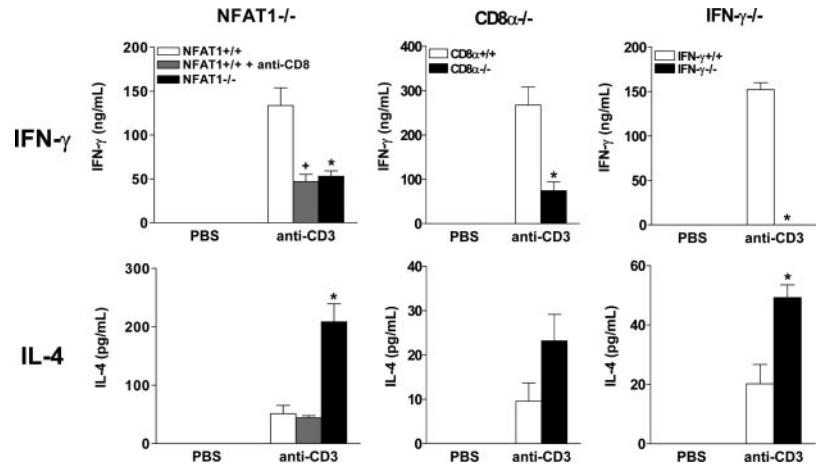


FIGURE 6. NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes controls eosinophilia in vivo. Naive animals (NFAT1^{+/+}, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{+/+}, CD8 α ^{-/-}, IFN- γ ^{+/+}, and IFN- γ ^{-/-}) or CD8⁺ T cell-depleted mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) were s.c. sensitized with OVA (200 μ g) emulsified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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

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

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

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](#)