



Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação em Oncologia

Análises de modificações epigenéticas em regiões regulatórias do gene *Ifng* em linfócitos T

Steffi Christine de Holanda Hanschke

2012

Análises de modificações epigenéticas em regiões regulatórias do gene *Ifng* em linfócitos T

Steffi Christine de Holanda Hanschke

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Dr. João P. B. Viola
Co-orientador: Dra. Patrícia S. Araújo-Souza

Rio de Janeiro

2012

H 249 Hanschke, Steffi Christine de Holanda

Análise de modificações epigenéticas em regiões regulatórias do gene *Ifng* em linfócitos T. / Steffi Christine de Holanda Hanschke – Rio de Janeiro: INCA, 2012.

108p.

Dissertação (Especialização) – Pesquisa Básica com ênfase em Imunologia em Oncologia– Instituto Nacional de Câncer.

Orientadores: Patricia Savia de Araújo Souza; João Paulo de Biaso Viola.

Inclui bibliografia.

1. Epigenética 2. Ifng 3. Cromatina 4. Metilação 5.Células T I. Souza, Patricia Savia de Araújo II. Biaso, João Paulo de Viola III. Instituto Nacional de Câncer III.Título

CDD 616.99449



Este trabalho foi realizado na Divisão de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa (CPQ) do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e recebeu auxílio financeiro da Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Steffi Christine de Holanda Hanschke

Análises de modificações epigenéticas em regiões regulatórias do gene
Ifng em linfócitos T

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA), visando à obtenção do título de
Mestre em Oncologia

Dr. Martin Hernan Bonamino, Pesquisador, Divisão de Medicina Experimental, INCA
(Membro Titular da Banca)

Dr. Miguel Angelo Martins Moreira, Pesquisador, Divisão de Genética, INCA
(Membro Titular da Banca)

Dr. Julio Scharfstein, Professor, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ
(Membro Titular da Banca)

Dr. Claudio Gustavo Stefanoff, Pesquisador, Coordenação de Pesquisa Clínica e
Incorporação Tecnológica, INCA (Suplente)

Dra. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro, Professora, Instituto de
Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ (Suplente)

Ao meu pai, Andreas Hanschke, que diante de todas as dificuldades me ensinou a ser forte e perseverante. O maior objetivo em fazer ciência é que no futuro nossas pesquisas possam ser aplicadas para gerar boas notícias como as que nós felizmente pudemos receber.

AGRADECIMENTOS

- A minha família, especialmente meus pais, Sonia e Andreas. Obrigada por sempre apoiarem minhas decisões e me incentivarem a alcançar meus objetivos. Vocês são meus maiores exemplos.
- Aos meus irmãos, André e Cláudio, e suas esposas, Zaira e Fernanda. Obrigada pela presença constante e pelos conselhos. E um obrigada especial a minha querida sobrinha Manu, que enche os dias de alegria e consegue me fazer esquecer de qualquer problema.
- Ao meu namorado Leo que foi essencial nesse período. Seja para me acalmar nos momentos de tensão e pressão, seja para tornar minha vida completa e ainda mais divertida. Amo você!
- Ao meu orientador João Viola, por ter me recebido em seu laboratório e tornar possível a realização deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, discussões científicas e por ser um orientador sempre presente.
- A minha co-orientadora, Patrícia Souza, ou simplesmente Pat. Obrigada por ter me ensinado praticamente tudo na bancada, por estar sempre disposta a ajudar nos experimentos, nas dúvidas e em todos os problemas do dia-a-dia. Obrigada por todo o apoio! Você e o João são sem dúvidas grandes exemplos para mim!
- A todos os amigos e companheiros da Divisão de Biologia Celular do INCA. Vocês tornam nosso ambiente de trabalho muito mais leve e divertido. Obrigada pelas discussões nas reuniões de 3ª feira, pelos conselhos, científicos ou não, e por tantos momentos de relaxamento na copa e nos eventos do lab. Ale, Amanda, André, Bruno, Bia, Cris, Douglas, Érika, Giu, Luciano, Marina, Matheus, Miriam, Pedro, Rê e Vanessa, muito obrigada pelas sugestões, críticas e pela amizade. Obrigada também pela companhia nos almoços, pelos desabafos coletivos e crises de risos! Um obrigado especial para Cris que me ajudou diretamente nos experimentos.
- Aos amigos de outros andares, em especial da Medicina Experimental (Bianca, Andressa e Chica), companheiros também da SBI.
- A todos meus amigos, especialmente os de Niterói que sempre estiveram presentes durante esse período, principalmente nos finais-de-semana!
- As agências de fomento que tornaram este trabalho possível: CNPq, CAPES, FAPERJ e ICGEB.

RESUMO

Título - Análise de modificações epigenéticas em regiões regulatórias do gene *Irfng* em linfócitos T.

**Steffi C. H. Hanschke
Patrícia S. Araújo-Souza
João P. B. Viola**

O interferon (IFN)- γ é a principal citocina envolvida na resposta imune anti-tumoral, além de ser essencial para a imunidade contra patógenos intracelulares. Enquanto células T CD8 produzem IFN- γ rapidamente após ativação, células T CD4 só produzem esta citocina após diferenciação no fenótipo Th1. Esta produção diferencial é refletida ao nível transcricional: após ativação células CD8 e Th1 apresentam uma indução rápida e crescente do mRNA de *Irfng*, enquanto células CD4 produzem baixos níveis do transcrito horas após ativação. Durante a diferenciação Th1, modificações epigenéticas no *locus Irfng* são necessárias para a expressão desta citocina. Para avaliarmos se a expressão diferencial de IFN- γ em células CD4 e CD8 também é dependente de modificações de cromatina, verificamos através de ensaios de hipersensibilidade a DNase I, a presença de regiões com diferente acesso à cromatina no *locus Irfng* em células CD4 e CD8 *naive* e Th1 e Th2. Muitas regiões analisadas apresentaram um padrão de hipersensibilidade a DNase I independente da produção de IFN- γ , entretanto uma região localizada no promotor proximal de *Irfng* (HSI-4) é mais sensível a DNase I em células CD8 e células Th1, o que correlaciona o acesso à cromatina à transcrição de *Irfng* nestas células. Desta forma esta região destacou-se como uma interessante região para analisarmos possíveis modificações epigenéticas diferenciais. Comparamos o padrão de metilação do promotor de *Irfng*, que inclui a região HSI-4, em células CD4 e CD8 estimuladas ou não por 3 e 72 horas. Observamos que o promotor está semelhantemente hipometilado em células CD4 e CD8 *naive*. Após a ativação estas células apresentam uma redução na metilação, da mesma forma que o observado em células Th1 reestimuladas. Encontramos algumas diferenças pontuais, como os sítios +12 e +114 que estão menos metilados em células CD8 do que em células CD4. O CpG -58, um importante sítio para ligação do fator transcricional ATF2/C-jun, torna-se metilado durante a diferenciação no fenótipo T *helper*. Porém, 72 horas após estímulo, este sítio não está mais metilado em células Th1, como observado em toda cinética de células CD4 e CD8. Este sítio localiza-se na região HSI-4, sugerindo que somente em células CD8 e Th1 encontra-se em uma região cuja cromatina está acessível. A análise do padrão de metilação de um *enhancer* de *Irfng* (CNS1) mostrou que nesta região os sítios CpG estão consistentemente metilados em todos os tipos celulares. Por fim, mostramos que uma sequência contida na região HSI-4 regula positivamente o gene *Irfng* e uma análise *in silico* revelou que diversos fatores transcricionais importantes para regulação da expressão de *Irfng* possuem sítios de ligação nessa região. Em conjunto, nossos dados sugerem que a expressão diferencial de IFN- γ por células CD4 e CD8 pode envolver a acessibilidade à região HSI-4, que regula positivamente o gene *Irfng*. Apesar do real papel biológico de alguns sítios CpG dever ser melhor investigado, especialmente os sítios -58; +12 e +114, a expressão diferencial de IFN- γ por linfócitos T não parece estar relacionada à metilação diferencial de dinucleotídeos CpG no promotor do gene *Irfng*, que inclui esta região HSI-4, nem na região CNS1.

ABSTRACT

Title - Analysis of epigenetic modifications in regulatory regions of *Ifng* gene in T lymphocyte subsets.

**Steffi C. H. Hanschke
Patrícia S. Araújo-Souza
João P. B. Viola**

Interferon (IFN)- γ is an essential cytokine for immunity against intracellular pathogens and cancer. While primary CD8 T cells rapidly produce IFN- γ upon activation, a significant increase in IFN- γ expression by CD4 T cells is observed only after Th1 differentiation. This differential production is reflected at the transcriptional level: upon activation, Th1 and CD8 T cells present a fast and increasing expression of *Ifng* mRNA, while CD4 T cells produce very low levels of the transcript hours after activation. Epigenetic changes that occur during Th1 differentiation at the *Ifng* locus are required for expression of this cytokine. To evaluate whether the differential expression of IFN- γ in CD4 and CD8 T cells is also dependent on changes in chromatin, DNase I hypersensitivity assays was performed to identify the presence of regions with differential chromatin accessibility at the *Ifng* locus in naive CD4 and CD8 T cells, Th1 and Th2 cells. Several regions showed a DNase I hypersensitivity pattern independent of IFN- γ production, however a region localized at *Ifng* promoter (HSI-4) was exclusively hypersensitive in Th1 and CD8 T cells, which associates chromatin accessibility to IFN- γ production in these cells. Therefore HSI-4 emerges as an interesting region to analyze possible differential epigenetic modifications. We analyzed the pattern of CpG methylation at the *Ifng* promoter, which includes HSI-4, in naive CD4 and CD8 T cells, Th1 and Th2 cells at 0, 3, and 72 hours after TCR stimulation. Our analyses demonstrate that the promoter is essentially hypomethylated in naive cells. After TCR activation these cells show decreased *Ifng* methylation, as Th1 cells after restimulation. We also identified discrete differences at individual sites. The CpG sites +12 and +114 are less methylated in activated CD8 cells and the CpG -58, an important CREB/ATF2-binding site to regulate *Ifng* expression, becomes methylated during helper T-cell polarization. Conversely, 72 h after stimulus, this site is no longer methylated in Th1 cells as observed in the whole kinetics of CD4 and CD8 cells. CpG -58 is located at HSI-4, suggesting that this site is accessible only in Th1 and CD8 T cells. We also did an analysis of DNA methylation at one distal regulatory element, described as a potential enhancer (CNS1), and all sites are found consistently methylated in all T cell subsets. At last we showed that a sequence contained in the HSI-4 region plays a positive role in regulation of the *Ifng* gene and *in silico* analysis indicated that several transcription factors relevant to *Ifng* expression have binding sites in this region. Taken together, our data suggest that the differential expression of IFN- γ by CD4 and CD8 cells may involve the accessibility to the region HSI-4, which positively regulates *Ifng* gene. Although the real biological role of some CpG sites should be investigated, particularly the sites -58, +12 and +114, this differential expression does not appear to correlate strictly with the methylation status of CpG dinucleotides in the promoter of the *Ifng* gene, which includes the region HSI-4, neither in the region CNS1.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Resposta imune celular	1
1.2 Perfis efetores e regulatórios de linfócitos T CD4.....	2
1.2.1 Diferenciação Th1/Th2.....	5
1.3 Interferon- γ	6
1.4 Regulação transcricional da expressão de Interferon- γ	8
1.5 Regulação da cromatina	10
1.6 Epigenética	11
1.6.1 Modificações de histonas	12
1.6.2 Complexos remodeladores de cromatina.....	14
1.7 Metilação de sítios CpG.....	16
1.8 Epigenética e sistema imune	21
1.9 Regulação epigenética do gene <i>Ifng</i>	25
1.10 Regiões regulatórias distais.....	26
1.10.1 Regiões regulatórias de <i>Ifng</i>	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Purificação de células T CD4 e T CD8.....	32
3.3 Citometria de Fluxo.....	32
3.4 Diferenciação in vitro de linfócitos T CD4 em Th1 e Th2.....	33
3.5 Marcação Intracelular de Citocinas.....	33
3.6 ELISA.....	34
3.7 PCR em Tempo Real (Taqman)	34
3.8 Ensaio de Hipersensibilidade a DNase I.....	35
3.9 Análise do estado de metilação de sítios CpG em regiões regulatórias do gene <i>Ifng</i>	37
3.10 Ensaio de Transativação	39
3.11 Soluções e tampões utilizados	40

4. RESULTADOS.....	42
4.1 Avaliação da expressão e produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8.	42
4.2 Mapeamento de regiões hipersensíveis a DNase I no <i>locus</i> de <i>Ifng</i> em células T CD4 e T CD8.....	51
4.3 Análise do estado de metilação do DNA na região promotora do gene <i>Ifng</i> em células T CD4 e T CD8.....	58
4.4 Análise do estado de metilação do DNA na região não codificadora conservada entre as espécies 1 (CNS1).	64
4.5 Avaliação funcional de regiões regulatórias de <i>Ifng</i>	67
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAR	- Adenosina deaminase RNA específica
AP-1	- Proteína ativadora-1
APC	- Célula apresentadora de antígenos
ATF2	- Fator 2 ativador da transcrição
ATP	- Trifosfato de adenosina
BRG1	- <i>brahma-related gene 1</i>
BSA	- Albumina de soro bovino
CREB	- Proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
CD	- Grupo de Diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	- DNA complementar
CNS	- Sequências não codificadoras conservadas
DO	- Densidade óptica
DMEM	- Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
Dnmt	- DNA metiltransferase
EDTA	- Ácido triacético diamino etileno
Eomes	- Eomesodermina
EZH2	- <i>Enhancer</i> do homólogo 2 de zeste
E2F	- Fator de Ligação ao Promotor de E2
Foxp3	- <i>Forkhead Box P3</i>
GATA-3	- Proteína 3 ligadora de GATA
HAT	- Histona Acetiltransferase
HDAC	- Histona Desacetilase
HEPES	- Ácido etanosulfônico hidroxietil piperazina
Hlx	- H2.0 - <i>like homeobox</i>
HMT	- Histona metiltransferase
HPRT	- Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HuR	- Antígeno humano R
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase Induzível
IPTG	- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

IRF	- Fator regulado pelo Interferon
JAK	- Janus cinase
kb	- kilobases
KIR	- Receptores semelhantes à Imunoglobulina das células <i>Natural Killer</i>
LCMV	- Vírus da Coriomeningite linfocítica
MAPK	- Proteína cinase ativada por mitógeno
MBD	- Domínio de ligação ao DNA metilado
MeCP2	- Proteína 2 de ligação ao metil-CpG
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	- RNA mensageiro
NF κ B	- Fator nuclear κ B
NFAT	- Fator nuclear de células T ativadas
NK	- Células <i>natural killer</i>
NKT	- Células <i>natural killer</i> T
NOS2	- Óxido Nítrico Sintase 2
Oct	- Fator de transcrição octamérico
pb	- pares de bases
PBS	- Tampão fosfato salino
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PKR	- Proteína quinase dependente de dsRNA
PMA	- Forbol Miristato Acetato
RNA	- Ácido ribonucléico
ROR γ t	- Receptor órfão γ relacionado à RAR
RT	- Reação de transcrição reversa
Runx3	- Fator de Transcrição relacionado à Runt 3
SFB	- Soro fetal bovino
STAT	- Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição.
SWI/SNF	- <i>switching defective/ sucrose nonfermenting</i>
T-bet	- <i>T-box</i> expresso em células T
TCR	- Receptor de células T
TGF- β	- Fator de crescimento de transformação- β
Th	- células T auxiliares (<i>T helper</i>)
Treg	- células T regulatórias
VCAM-1	- Molécula de adesão celular-vascular 1
X-Gal	- 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferenciação de células T CD4 <i>naive</i> em subpopulações distintas.....	4
Figura 1.2. Metilação e demetilação de sítios CpG.	18
Figura 1.3. Estrutura da cromatina em promotores ativos e inativos.	22
Figura 1.4. Locus de <i>Ifng</i> com as 8 CNS identificadas.	28
Figura 4.1. Purificação de linfócitos T CD4 e CD8.	43
Figura 4.2. Produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8.	45
Figura 4.3. Modelo experimental de diferenciação Th1/Th2.....	46
Figura 4.4. Produção de IFN- γ por células T.....	48
Figura 4.5. Detecção do mRNA de <i>Ifng</i> em células T CD4, T CD8 e Th1.....	50
Figura 4.6. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no promotor de <i>Ifng</i>	54
Figura 4.7. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no intron 1 de <i>Ifng</i>	55
Figura 4.8. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no intron 3 de <i>Ifng</i>	56
Figura 4.9. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene <i>Ifng</i> em células T não-estimuladas.....	61
Figura 4.10. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene <i>Ifng</i> em células T ativadas por 3 horas.....	62
Figura 4.11. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene <i>Ifng</i> em células T ativadas por 72 horas.....	63
Figura 4.12. Análise do padrão de metilação em sítios CpG na região CNS1.....	66
Figura 4.13. Sítios de fatores de transcrição na região HSI-4.....	68
Figura 4.14. Avaliação da função da região HSI-4 na regulação de <i>Ifng</i>	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resposta imune celular

A resposta imune é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas posteriores da imunidade adaptativa (adquirida). Esta, diferentemente da imunidade inata, é específica e acentuada por repetidas exposições ao antígeno. Existem dois tipos de resposta imune adquirida, a resposta humoral mediada pelos anticorpos produzidos por linfócitos B e a resposta celular. A imunidade celular é a principal envolvida na resposta anti-tumoral, além de ter um papel crucial no combate a microorganismos intracelulares. Os linfócitos T, tanto CD4 como CD8, são células mediadoras desse processo.

A indução de uma resposta imune adaptativa protetora depende da ativação das células T por células apresentadoras de antígenos (APC). Quando ativadas, as APC migram para os órgãos linfóides secundários, onde apresentam aos linfócitos os antígenos capturados na periferia além de fornecerem outros estímulos necessários à ativação linfocitária como citocinas e sinais co-estimulatórios. A fase efetora da resposta imune celular é iniciada pelo reconhecimento do antígeno por células T, apresentado na superfície de células como peptídeos associados a moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Após o reconhecimento do antígeno essas células sofrem expansão clonal e diferenciam-se em células efetoras especializadas em responder rápida e eficientemente quando forem novamente expostas ao antígeno alvo.

Os linfócitos T CD8 reconhecem peptídeos associados a moléculas de MHC de classe I, derivados de antígenos citosólicos e diferenciam-se em células T CD8 citotóxicas capazes de induzir morte celular nas células infectadas pelo contato célula-célula. Células T CD4 reconhecem os antígenos capturados na periferia, associados às moléculas de MHC de classe II. Os linfócitos T CD4, podem assumir diferentes perfis efetores, dependendo dos sinais recebidos pelas APC. Esses diferentes perfis são importantes na ativação de outras células do sistema imune inato e adaptativo, como células B, células T CD8 e macrófagos, desempenhando assim um papel fundamental na resposta imune adaptativa.

1.2 Perfis efetores e regulatórios de linfócitos T CD4

A primeira exposição de células T CD4 ao antígeno, desencadeia um processo de diferenciação dessas células em subpopulações distintas tais como células T *helper*: Th1, Th2 e Th17 e células T regulatórias (Tregs). Estas subpopulações diferenciam-se por produzirem conjuntos diferentes de citocinas em resposta ao estímulo antigênico e, portanto, desempenham funções efetoras distintas (Fig. 1.1).

Descritas há pelo menos 25 anos, inicialmente acreditou-se que a diferenciação de células T CD4 *naive* estava restrita às subpopulações Th1 e Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986). Células Th1 produzem principalmente a citocina interferon- γ (IFN- γ) e sua função está na defesa celular mediada por fagócitos, especialmente contra patógenos intracelulares. Células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5 e IL-13 e sua principal função efetora é nas respostas mediadas por IgE e eosinófilos/mastócitos, na eliminação de patógenos extracelulares, como helmintos.

Por volta de 2005, células T que produziam seletivamente a citocina IL-17 e também IL-22 foram identificadas como uma linhagem de células Th distinta e denominada Th17 (PARK *et al.*, 2005; HARRINGTON *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2006). Estas células medeiam respostas imunes contra bactérias extracelulares e fungos, principalmente nas mucosas.

A quarta subpopulação citada, as Tregs, são células T CD4 com importantes funções imunossupressoras que inibem respostas auto-imunes adaptativas. Células Tregs ditas naturais (nTreg) surgem no timo durante o desenvolvimento (SAKAGUCHI *et al.*, 1995; ITOH *et al.*, 1999). Porém outras Tregs podem ser induzidas a partir de células T CD4 *naive* precursoras na periferia (CHEN *et al.*, 2003; LOHR *et al.*, 2006). Estas células, denominadas Tregs induzidas (iTreg), exercem sua função regulatória através do contato célula-célula com células T efetoras e através da secreção de citocinas como TGF- β e IL-10 (SHEVACH, 2006).

Além de expressarem seletivamente diferentes conjuntos de citocinas, estas diferentes subpopulações silenciam a expressão de citocinas associadas às outras subpopulações. Por exemplo, células Th1 reprimem a expressão de IL-4 (DJURETIC *et al.*, 2007) e IL-17 (LAZAREVIC *et al.*, 2011).

Mais recentemente propuseram a existência de outras linhagens efetoras, como as células T *helper* foliculares (Thf) (NURIEVA *et al.*, 2008; FAZILLEAU *et al.*, 2009) e as células Th9 (DARDALHON *et al.*, 2008; VELDHOEN *et al.*, 2008). No

entanto ainda não está claro se estas subpopulações são linhagens distintas ou apenas estados particulares de células Th1/Th2/Th17/Treg.

O processo de diferenciação de células T CD4 *naive* nestas subpopulações é desencadeado principalmente pelas citocinas presentes no microambiente em que as células T CD4 são expostas ao antígeno. Essas citocinas são produzidas principalmente por células do sistema imune inato e o conjunto de citocinas induzidas por determinado estímulo antigênico direcionam o processo de diferenciação de células T CD4 *naive*. Por exemplo, as citocinas IL-12 e IFN- γ secretadas por células apresentadoras de antígeno ativadas promovem a diferenciação Th1. Por outro lado, a presença de IL-4 durante a ativação da célula T CD4 leva ao desenvolvimento de células Th2 (ZHU; PAUL, 2008).

Estas citocinas ativam diferentes vias de sinalização que culminam na indução de fatores de transcrição específicos para cada subpopulação de célula Th, como por exemplo, os membros da família de fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*), que são ativados por diferentes receptores de citocinas e regulam diretamente a expressão de diversos genes envolvidos na diferenciação de células T CD4 (ZHU; PAUL, 2010).

Outros fatores de transcrição específicos para cada subpopulação também são ativados, e o programa de expressão gênica induzido pela ação conjunta desses fatores de transcrição é passado para as células-filhas, após inúmeros ciclos de divisão celular. Os principais fatores de transcrição que direcionam a diferenciação dessas células já foram identificados: T-bet e STAT-4 para Th1; GATA-3 e STAT6 para Th2; ROR γ t e STAT3 para Th17; Foxp3 e STAT5 para Tregs (ZHU; PAUL, 2010). Processos epigenéticos induzidos por esses fatores de transcrição são essenciais na estabilização do fenótipo destas subpopulações efectoras (KANNO *et al.*, 2011).

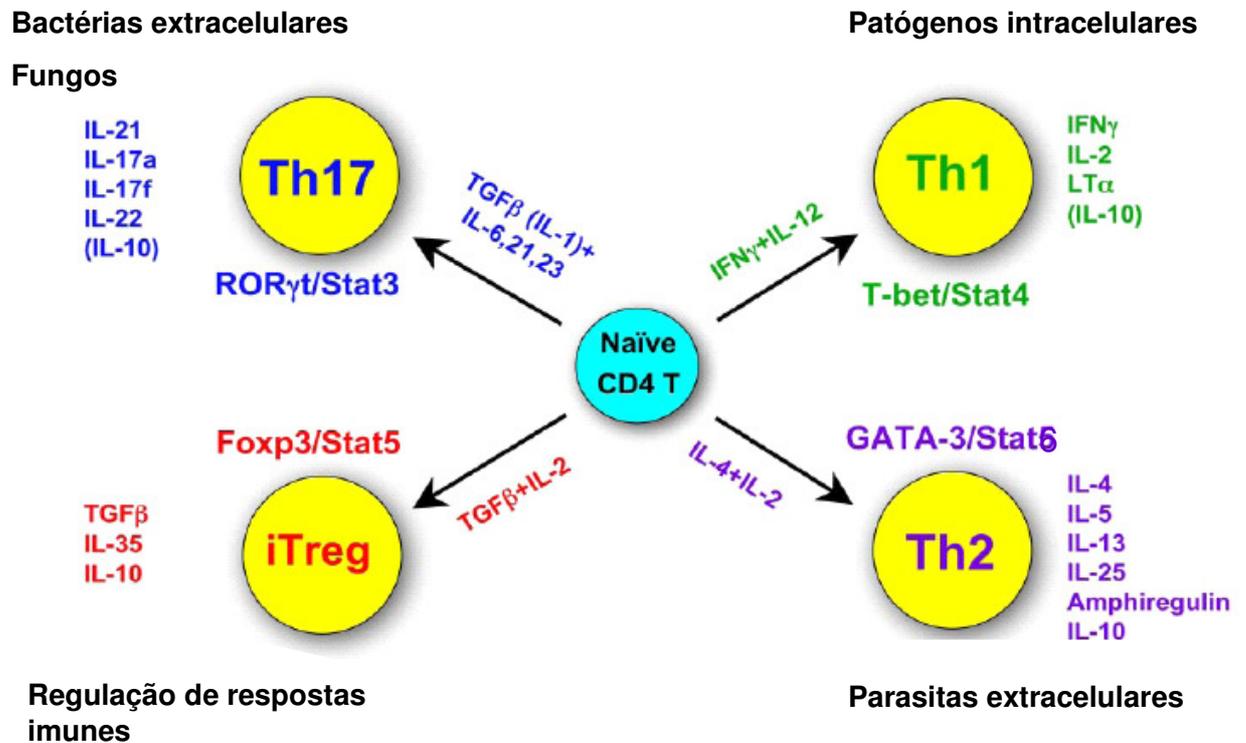


Figura 1.1. Diferenciação de células T CD4 *naive* em subpopulações distintas. Representação das diferentes subpopulações de células T CD4: suas funções, citocinas produzidas, principais fatores de transcrição e as citocinas críticas para seu comprometimento. Mediante o estímulo antigênico, células T CD4 *naive* podem diferenciar-se em 4 subpopulações principais: Th1, Th2, Th17 e Treg. Esta diferenciação é determinada pelas citocinas presentes no microambiente de estímulo das células T CD4 *naive*. Estas citocinas ativam fatores de transcrição específicos que por sua vez regulam a expressão das citocinas apropriadas. Desta forma cada subpopulação produz diferentes conjuntos de citocinas e conseqüentemente exerce funções efetoras distintas. (Adaptado de ZHU; PAUL, 2008).

1.2.1 Diferenciação Th1/Th2

Imediatamente após ativação, células T CD4 *naive* expressam em baixos níveis tanto IFN- γ quanto IL-4, e são necessários alguns ciclos de divisão celular para estabilizar seletivamente a expressão de IFN- γ em células Th1 e IL-4 em células Th2 (GROGAN *et al.*, 2001). Possivelmente este é o tempo necessário para indução dos fatores de transcrição específicos de cada subpopulação e remodelamento da cromatina nos *loci* das citocinas.

A diferenciação Th1 está relacionada à exposição inicial das células T CD4 às citocinas IL-12 e IFN- γ . Vírus e microorganismos que infectam ou ativam macrófagos e células *natural killer* (NK), geram infecções que desencadeiam reações da imunidade inata com a produção de IL-12, crucial para diferenciação Th1.

As principais fontes de IL-12 são células apresentadoras de antígeno, destacando-se as células dendríticas após ativação (TRINCHIERI *et al.*, 2007). Apesar de IL-18 não estar diretamente envolvida na diferenciação de células Th1, esta citocina da mesma forma que IL-27, pode agir em sinergismo com IL-12 na indução de IFN- γ (YANG *et al.*, 2001). A citocina IL-12 produzida por APC ativadas, também age em células NK, levando-as a produzirem IFN- γ .

A sinalização iniciada por IFN- γ leva a ativação de STAT1 em células T CD4 e é STAT1 juntamente com outros fatores de transcrição induzidos pela ativação do TCR (NFAT, NF κ B e AP-1) que leva a expressão do fator transcricional T-bet, o principal regulador da diferenciação Th1 (SZABO *et al.*, 2000). T-bet tem diversos papéis chave na indução de um fenótipo Th1, como a indução da produção de IFN- γ (SZABO *et al.*, 2000) e de outros fatores transcricionais necessários para o comprometimento de células T CD4 em Th1: Hlx (MULLEN *et al.*, 2002) e Runx3 (DJURETIC *et al.*, 2007). T-bet também induz a formação de um receptor funcional de IL-12 em células T CD4 *naive* (AFKARIAN *et al.*, 2002), possibilitando a sinalização intracelular induzida por IL-12. IL-12, por sua vez, ativa STAT4 que estimula a produção de IFN- γ , o que gera um *feedback* positivo essencial para o comprometimento de células T CD4 em Th1 e é a colaboração entre estas duas citocinas, IFN- γ e IL-12, que induz a completa diferenciação em células Th1. Desta forma, STAT4, T-bet, Hlx e Runx3 induzem a expressão de IFN- γ que reforça a diferenciação para um fenótipo Th1 pela ativação de STAT1.

Além de induzir a diferenciação em Th1, T-bet, também inibe o comprometimento em Th2: T-bet juntamente a Runx3 é capaz de ligar-se a um

silencer de *Il4* (DJURETIC *et al.*, 2007), somente em células Th1 e T CD4 *naive* (NAOE *et al.*, 2007). Além disso, T-bet também pode bloquear a ligação de GATA3, o principal regulador do comprometimento Th2, ao *enhancer* de *Il4*: T-bet é capaz de ligar-se a GATA-3, impedindo a ligação deste fator em seus sítios de ligação no *locus* de citocinas Th2 (HWANG *et al.*, 2005).

Por outro lado a diferenciação para um fenótipo Th2, ocorre em resposta à exposição de células T CD4 a citocina IL-4, cuja fonte é ainda incerta. Acredita-se que a diferenciação em um fenótipo Th2 seria uma polarização *default* de células T CD4 na ausência de sinais que induzem um fenótipo Th1, e a própria produção de IL-4 por células T CD4 ativadas já seria suficiente para direcionar para um fenótipo Th2 (JANSON; WINERDAL; WINQVIST, 2009).

A citocina IL-4 leva a ativação de STAT6 nessas células, o que induz a expressão do fator transcricional GATA-3. GATA-3 é o principal fator de transcrição envolvido na diferenciação Th2 (ZHENG *et al.*, 1997; KURATA *et al.*, 1999), sendo essencial na indução de um fenótipo Th2 e inibição de *Ifng* nestas células (ZHU *et al.*, 2004). GATA-3 induz a expressão das citocinas Th2: IL-4, IL-5 e IL-13 (LEE *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2004). Além disso, também induz o fator transcricional c-MAF que por sua vez promove a expressão de IL-4, ligando-se diretamente a seu promotor (KIM *et al.*, 1999; HO *et al.*, 1996). GATA-3 também reprime a diferenciação Th1, reprimindo a expressão de STAT4 (USUI *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar que os fatores transcricionais citados induzem remodelamento de cromatina nos *loci* das citocinas específicas de cada perfil efetor e essas alterações são essenciais no processo de diferenciação. Por exemplo, T-bet induz alterações de cromatina favoráveis à transcrição no *locus* de *Ifng*, enquanto GATA-3 induz modificações permissivas no *locus* de *Il4* (SAWALHA, 2008). Além disso, as citocinas produzidas por essas subpopulações de células T também participam no desenvolvimento e expansão de suas respectivas subpopulações. Por exemplo, o IFN- γ secretado pelas células Th1 promove diferenciação adicional de Th1 e inibe a polarização em Th2.

1.3 Interferon- γ

O IFN- γ é uma citocina pertencente à família dos interferons, que além de estar envolvida com a diferenciação Th1, como já foi mencionado, é essencial na resposta imune inata e adaptativa contra infecções virais e bactérias intracelulares.

Além disso, o IFN- γ também está envolvido na resposta imune anti-tumoral (KAPLAN *et al.*, 1998). O IFN- γ é também chamado IFN imune ou tipo II. Sua forma biologicamente ativa é um homodímero não-covalente (EALICK *et al.*, 1991) e da mesma forma que os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) também apresenta atividade anti-viral, induzindo, por exemplo, a enzima antiviral PKR.

As principais células produtoras de IFN- γ são as células NK e NKT, além de células T CD4 e T CD8. Os linfócitos T são a principal fonte de IFN- γ na resposta imune adaptativa e o principal indutor da produção de IFN- γ nestas células é a ativação do TCR, enquanto em células NK, citocinas produzidas por macrófagos ativadas, tais como IL-12 e IL-18, desempenham papel fundamental (Boehm *et al.*, 1997).

O IFN- γ exerce diversos efeitos imunomodulatórios, atuando tanto em células da imunidade inata, como também do sistema imune adaptativo. O IFN- γ está primeiramente envolvido com a ativação de macrófagos e na indução da produção de imunoglobulinas opsonizantes, eventos que aumentam a eliminação fagocítica de microorganismos patogênicos. Como principal citocina ativadora de macrófagos, promove a atividade apresentadora de antígenos nestas células através do aumento da expressão de subunidades das moléculas MHC de classe I e II e de vários componentes intracelulares importantes para o processamento do antígeno, como TAP1/2. O IFN- γ acentua a atividade microbicida de macrófagos estimulando a síntese de compostos citotóxicos, como o óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio, regulando a transcrição de diversos genes envolvidos na geração desses compostos (revisado por BOEHM *et al.*, 1997). Além de estimular a diferenciação Th1, o IFN- γ também antagoniza a resposta Th2. Por exemplo, inibe a indução do receptor de IgE, Fc ϵ R1I, dependente de IL-4 (ROUSSET *et al.*, 1988).

O IFN- γ também exerce efeitos em outras células do sistema imune. Em células B, por exemplo, ele regula a troca do isotipo da imunoglobulina produzida, principalmente para IgG2a (SNAPPER; PAUL, 1987). Também ativa neutrófilos e estimula a atividade citolítica de células NK (revisado por BILLIAU; MATHYS, 2009).

O IFN- γ exerce suas funções através de sua ligação ao seu receptor específico. O receptor é constituído por duas subunidades associadas a proteínas Janus cinases específicas (Jak1 e Jak2). A ligação da citocina ao seu receptor ativa a via dependente de STAT1 que leva a transcrição de genes responsivos a IFN- γ . Já foram descritos mais de 200 genes regulados por IFN- γ , muitos envolvidos na

apresentação de antígenos (MHC de classe I e II; TAP-1 e -2; subunidades do imunoproteassomo); respostas antivirais (PKR, ADAR); funções microbidas (iNOS/NOS2, subunidades do complexo NADPH oxidase, receptor Fc γ RI) e tráfego de leucócitos (e.g ICAM-1, VCAM-1) (Revisado por SCHRODER *et al.*, 2004) .

Alguns destes genes são regulados diretamente pela ligação do homodímero de STAT1 à sua sequência consenso: TTCN(2-4)GAA (SCHRODER *et al.*, 2004). Por outro lado, muitos dos genes inicialmente induzidos pela sinalização de IFN- γ são fatores de transcrição, como a família de fatores regulados pelo IFN (IRF), que por sua vez, podem regular a transcrição de outros genes (SIMS *et al.*, 1993). Por exemplo, o fator transcricional IRF-1 é essencial para a indução da expressão de iNOS mediada por IFN- γ (KAMIJO *et al.*, 1994).

1.4 Regulação transcricional da expressão de Interferon- γ

Vias de sinalização ativadas no meio extracelular podem resultar em alterações na expressão gênica através da indução da expressão, modificações pós-traducionais ou translocação de fatores de transcrição para o núcleo celular. Estes fatores podem ativar a expressão gênica recrutando a maquinaria de transcrição ou complexos que remodelam a cromatina facilitando a ligação de outros fatores transcricionais. De forma oposta, agem os repressores da transcrição.

O principal regulador transcricional de *Irfng* e do comprometimento de células T CD4 em Th1 é o fator transcricional T-bet (SZABO *et al.*, 2000). T-bet possui diversos sítios de ligação no promotor de *Irfng* e regiões regulatórias distais e atua em conjunto com Runx3 (DJURETIC *et al.*, 2007) e Hlx (MULLEN *et al.*, 2002) para facilitar a expressão de IFN- γ e direcionar a diferenciação Th1. T-bet atua induzindo a expressão desses fatores de transcrição. Runx3 é capaz de ligar-se juntamente a T-bet no promotor de *Irfng* para induzir sua transcrição e Hlx atua de forma sinérgica com T-bet, tanto na indução de IFN- γ , quanto do próprio T-bet.

Apesar de T-bet ser suficiente na indução da expressão de IFN- γ em células T CD4, em linfócitos T CD8 a produção da citocina depende também do fator transcricional parálogo de T-bet, Eomesodermina (Eomes) (PEARCE *et al.*, 2003). A principal consequência disto é que a produção de IFN- γ em células T CD8, em resposta a ativação do TCR *in vitro*, é normal mesmo em células deficientes em T-bet (SZABO *et al.*, 2002). Porém na infecção de animais com LCMV, *in vivo*, há comprometimento na produção de IFN- γ por células T CD8 deficientes em T-bet

(SULLIVAN *et al.*, 2003). Por outro lado, na ausência de Eomes a expressão de IFN- γ é deficiente o que é ainda mais exacerbado quando T-bet também está ausente (INTLEKOFER *et al.*, 2005). Estes estudos sugerem papéis independentes, mas sobrepostos destes fatores de transcrição na regulação da expressão de IFN- γ em células T CD8.

Além de T-bet e Eomes, outros fatores de transcrição também estão envolvidos na regulação da expressão de IFN- γ : membros da família NFAT, NF κ B, AP-1, STAT, entre outros. Sugere-se que o papel desses fatores na transcrição de *Ifng* é diferenciado em células T e células NK, uma vez que enquanto células T necessitam do estímulo antigênico para expressar *Ifng*, células NK e NKT expressam níveis desse transcrito constitutivamente e há uma rápida produção desta citocina logo após ativação (STETSON *et al.*, 2003). Nestas células, T-bet e Eomes são expressos constitutivamente (PEARCE *et al.*, 2003) e a cromatina na região do gene *Ifng* já está permissiva à transcrição (TATO *et al.*, 2004; CHANG; AUNE, 2005).

O importante papel dos fatores de transcrição induzidos pela ativação do TCR, CD28 e receptores de células NK na produção de IFN- γ já está bem demonstrado. Por exemplo, alguns estudos apontam para a importância da família de fatores de transcrição NF κ B. Além das vias de sinalização induzidas pelo estímulo do TCR e CD28, a ativação do receptor de IL-18 também induz membros da família NF κ B. Células T CD4 incapazes de ativar membros da família NF κ B tanto via TCR, quanto pela sinalização via IL-18, apresentam uma menor resposta Th1 e produção de IFN- γ (CORN *et al.*, 2003; TATO *et al.*, 2003; BALASUBRAMANI *et al.*, 2010). Em contraste sugere-se que um membro desta família, p50 (NF κ B1), possa funcionar como um repressor transcricional de *Ifng* em células NK (TATO *et al.*, 2006).

Além da indução de NF κ B, a ativação do TCR e da molécula co-estimulatória CD28 em células T também induz uma cascata de sinalização que leva a formação de AP-1 e do heterodímero c-jun/ATF2. A ligação desses heterodímeros ao promotor de *Ifng* contribui na ativação transcricional desta citocina (PENIX *et al.*, 1996). Também já foram identificados sítios para ligação da proteína NFAT no promotor e outras regiões regulatórias do gene *Ifng* (SWEETSER *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2004). Sabe-se que membros da família NFAT também regulam a produção de IFN- γ em células T CD8 (TEIXEIRA *et al.*, 2005) e células NK (ARAMBURU *et al.*, 1995).

O fator transcricional Ets-1 é importante para a diferenciação Th1, uma vez que aumenta a expressão de STAT4 e do receptor de alta afinidade de IL-12, e também é recrutado para o promotor de *Ifng*, onde funciona como um co-ativador de T-bet na indução da expressão de IFN- γ (GRENNINGLOH *et al.*, 2005).

Os fatores de transcrição da família STAT também estão envolvidos na regulação transcricional de *Ifng* e os principais membros dessa família envolvidos na produção de IFN- γ em células T são STAT1 e STAT4. STAT1 é o único membro da família ativado por IFN- γ , e influencia de forma indireta a produção de IFN- γ , potencializando a expressão de T-bet (AFKARIAN *et al.*, 2002; LIGHVANI *et al.*, 2001). Por outro lado, STAT4 é crítico para o comprometimento de células T CD4 na linhagem Th1, sendo mais importante em amplificar do que iniciar a produção de *Ifng* nestas células e é importante também para a produção de IFN- γ não dependente de estímulo antigênico (CARTER & MURPHY, 1999).

Por outro lado, fatores de transcrição como CREB e GATA-3 funcionam reprimindo a transcrição de *Ifng*. GATA-3 é capaz de interagir e inibir a função de STAT4 e T-bet, além de recrutar a metiltransferase da lisina 27 da histona H3 (H3K27) ao gene *Ifng* (CHANG & AUNE, 2007). A citocina TGF- β também inibe a expressão de IFN- γ diretamente, reprimindo a transcrição ao se ligar no promotor de *Ifng* (YU *et al.*, 2006) e indiretamente ao inibir a expressão de T-bet, o que é importante para a repressão de IFN- γ durante a diferenciação Th17, induzida por TGF- β (GORELIK, CONSTANT & FLAVELL, 2002).

Apesar dos principais reguladores da expressão gênica serem os fatores de transcrição, ao longo dos últimos anos, uma série de evidências mostrou que mecanismos reguladores da cromatina também possuem um importante papel no estabelecimento e manutenção de programas de expressão gênica. Estes mecanismos compõem o que se pode chamar de epigenética. A habilidade da ligação de fatores de transcrição às sequências regulatórias no DNA é então afetada por sua concentração, modificações pós-traducionais, localização subcelular e também pelo estado da cromatina em seus sítios de ligação.

1.5 Regulação da cromatina

A cromatina é um complexo nucleoproteico no qual o DNA é empacotado nos limites do núcleo celular. Sua unidade fundamental é o nucleossomo (KORNBERG, 1974) que consiste em aproximadamente 147 pb de DNA em volta de um cerne

constituído por um octâmero de proteínas histonas canônicas: dímeros das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (revisado por KHORASANIZADESH, 2004). Nucleossomos vizinhos são conectados por pequenos segmentos de DNA e essa organização forma uma fibra de aproximadamente 11 nm cuja estrutura micrográfica assemelha-se a um “colar de contas” (PIATTI; ZEILNER; LUSSER, 2011).

As histonas apresentam um domínio C-terminal globular e sua porção N-terminal projeta-se para fora da superfície do nucleossomo, constituindo um importante sítio para modificações pós-traducionais. São proteínas básicas, e seus resíduos positivamente carregados de lisinas e argininas contactam o DNA cerca de 14 vezes, formando uma estrutura bastante estável em condições fisiológicas (CLAPIER & CAIRNS, 2009). Além dessas proteínas histonas, existe também a histona H1 que não faz parte do cerne do nucleossomo, mas associa-se ao DNA de ligação entre os nucleossomos estreitando ainda mais a associação do DNA com o nucleossomo e formando estruturas de cromatina de aproximadamente 30 nm de diâmetro (THOMA; KOLLER; KLUG, 1979).

A cromatina é então uma complexa estrutura, que se por um lado permite a compactação do material genético no núcleo celular, por outro, dificulta o reconhecimento por proteínas ligadoras do DNA de forma que esta estrutura deve ser modificada para permitir a atividade transcricional. Desta forma, a organização da cromatina e sua modulação constituem um importante mecanismo regulatório da expressão gênica e alterações no acesso da maquinaria de transcrição ao DNA funcionam como mecanismos adicionais de regulação transcricional. A biologia do cromossomo envolve então um balanço dinâmico entre empacotamento e acesso ao genoma.

A estrutura da cromatina pode ser alterada por diferentes mecanismos epigenéticos que incluem modificações covalentes nas histonas, metilação do DNA e modificações não-covalentes mediadas por complexos remodeladores de cromatina.

1.6 Epigenética

Modificações epigenéticas referem-se a alterações herdáveis nos genes que ocorrem sem nenhuma alteração na sequência do DNA (WOLFFE; MATZKE, 1999). Muitas destas alterações ocorrem durante processos de diferenciação celular e estabilizam-se após inúmeros ciclos de divisão celular. Dessa forma, apesar de compartilharem o mesmo material genético, existem células com características tão

distintas. Mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações de histonas e RNA de interferência (revisado por EGGER, 2004) e são importantes para diversos processos vitais tais como a inativação do cromossomo X (MOHANDAS *et al.*, 1981). Falhas na manutenção dessas modificações podem resultar em ativação ou inibição inapropriada de várias vias de sinalização e levar a doenças como o câncer (SHARMA, KELLY & JONES, 2009).

As modificações epigenéticas da cromatina influenciam a acessibilidade de fatores de transcrição e da própria maquinaria de transcrição ao DNA, afetando o início e progressão da transcrição. Isto associado à quantidade de fatores de transcrição específicos e sua atividade determina a expressão de um determinado gene em determinada célula. A informação epigenética, diferentemente da codificada pela sequência de DNA, é potencialmente plástica, pois pode ser modificada em resposta a sinais extracelulares. Mas é também herdável, podendo ser passada da célula parental para as células-filhas, garantindo então a transmissão de um programa de expressão gênica específico para aquele tipo celular (WILSON *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos da propagação da informação epigenética só estão bem elucidados para a metilação do DNA.

1.6.1 Modificações de histonas

A cauda N-terminal das histonas pode sofrer várias modificações covalentes pós-traducionais que incluem metilação de resíduos de arginina e lisina, acetilação, ubiquitinação, ribosilação e sumoilação de lisinas e fosforilação de serinas e treoninas (KOUZARIDES, 2007). Modificações amino-terminais nas histonas são sinais para ligação de complexos proteicos associados com ativação/silenciamento transcricional (revisado por MUNSHI, 2009). Essas modificações podem alterar a estrutura da cromatina, desestabilizando os contatos entre os nucleossomos, inibindo a ligação de um determinado fator ao DNA ou criando sítios para ligação de outras proteínas, afetando assim a organização da cromatina e a regulação da expressão gênica.

As primeiras modificações covalentes de histonas descritas foram a acetilação e metilação das histonas H3 e H4, que foram associadas à ativação e repressão gênica respectivamente (ALLFREY *et al.*, 1964). Desde então, já foram descritas diversas outras modificações ocorrendo em resíduos distintos e catalizadas por complexos enzimáticos específicos que adicionam e removem esses grupos. Diferentemente da metilação do DNA, modificações pós-traducionais de

histonas podem levar tanto a repressão quanto à ativação gênica, dependendo dos resíduos modificados e do tipo de modificação.

Tipicamente, a acetilação de histonas ocorre em múltiplos resíduos de lisina das histonas H3 e H4, está correlacionada à transcrição gênica (KOUZARIDES, 2007) e é catalizada por complexos de histona acetiltransferase (HAT) (STERNER; BERGER *et al.*, 2000). Por outro lado, enzimas deacetilases (HDAC) removem o grupo acetil dos resíduos de lisina das histonas, restabelecendo a carga positiva dessas proteínas, (TAUNTON *et al.*, 1996; YANG; SETO, 2003) e tornando a acetilação de histonas um processo dinâmico.

A acetilação neutraliza as cargas positivas dos resíduos de lisina, reduzindo a interação das histonas básicas com o DNA negativamente carregado, o que facilita o acesso dos fatores de transcrição a suas sequências alvo (VETTESE-DADEY *et al.*, 1996). Conseqüentemente, a acetilação leva a uma descompactação dos nucleossomos e cria sítios de ligação para outras proteínas também envolvidas no estabelecimento de uma estrutura de cromatina mais relaxada e permissiva à transcrição. Diversos co-ativadores e co-repressores da transcrição possuem atividade HAT ou HDAC que são críticas para suas funções na regulação gênica (STERNER; BERGER, 2000).

A metilação é a modificação covalente de histonas com significado mais complexo, podendo ocorrer tanto em resíduos de lisina como de arginina, e dependendo do resíduo metilado a consequência pode ser a ativação ou repressão da transcrição. Lisinas podem ser mono/di/tri-metiladas enquanto argininas podem ser mono ou di-metiladas (revisado por LI; CAREY; WORKMAN, 2007). Promotores de genes transcricionalmente ativos são enriquecidos em histonas H3 metiladas (um, dois ou três grupos metil) na lisina 4 (H3K4). Estas modificações não existem em genes silenciados, onde a dimetilação ou trimetilação da lisina 9 e 27 (H3K9 e H3K27) da histona H3 (H3K9 e H3K27) podem estar presentes (revisado por KOUZARIDES, 2007).

Existem diversas histonas metiltransferases (HMT), como a Set1/MLL que cataliza a metilação de H3K4 (ROGUEV *et al.*, 2001; MILNE *et al.*, 2002) e a EZH2 que medeia a metilação de H3K27 (CAO *et al.*, 2002). Da mesma forma também foram descritas demetilases de histonas, como a enzima LSD1, que ao remover a metilação de H3K4 está envolvida na repressão gênica (SHI *et al.*, 2004). É importante ressaltar que esses resíduos metilados também são alvos de outros complexos remodeladores de cromatina que atuam conjuntamente com essas

modificações de histonas na estruturação da cromatina. Os mecanismos que regulam essas enzimas modificadoras de histonas e o direcionamento de seus sítios alvo ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que muitas vezes essas enzimas são parte de complexos maiores, como os complexos remodeladores de cromatina.

1.6.2 Complexos remodeladores de cromatina

Os complexos remodeladores de cromatina são complexos proteicos formados por diversas subunidades, que utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para remodelar os nucleossomos (CLAPIER & CAIRNS, 2009). A ação desses complexos é essencial na organização da cromatina, ou seja, na manutenção do espaçamento constante entre os nucleossomos. Além disso, também participam em diversos processos biológicos tais como a replicação do DNA, progressão da RNA polimerase durante a transcrição e reparo do DNA (LI, CAREY & WORKMAN, 2007). Esses complexos desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica, tornando a cromatina mais acessível aos fatores de transcrição ou empacotando ainda mais os nucleossomos em regiões transcricionalmente inativas. Eles atuam movendo, ejetando ou até mesmo reestruturando a composição dos nucleossomos pela adição de variantes de histonas (revisado por HARGREAVES & CRABTREE, 2011).

Existem quatro famílias diferentes de complexos remodeladores de cromatina que utilizam a hidrólise de ATP para alterar os contatos DNA-histona: SWI/SNF; ISWI; CHD e INO80. Esses complexos compartilham um domínio ATPase bem conservado, mas reconhecem diferentes modificações pós-traducionais de histonas e possuem diferentes domínios ou proteínas adicionais que medeiam a interação com outros fatores de transcrição e modificadores de cromatina (revisado por CLAPIER & CAIRNS, 2009). Por exemplo, membros da família SWI/SNF possuem bromodomínios que reconhecem resíduos acetilados em histonas (DHALLUIN *et al.*, 1999). Por outro lado, resíduos de lisina metilados são reconhecidos por cromodomínios presentes em membros da família CHD (EISSENBERG, 2001). Além disso, esses complexos estão muitas vezes associados às enzimas modificadoras de histonas, como por exemplo, histonas deacetilases (TONG *et al.*, 1998). Desta forma, os diferentes complexos podem ser direcionados para regiões específicas da cromatina e atuar em contextos biológicos distintos.

Os complexos apresentam diferentes mecanismos de ação. Sabe-se que a família SWI/SNF atua movimentando e deslocando nucleossomos (PIATTI, ZEILNER & LUSSER, 2011) enquanto membros da família ISWI também desempenham um importante papel no espaçamento dos nucleossomos para promover a estruturação da cromatina e silenciamento gênico (YANG *et al.*, 2006; FYODOROV *et al.*, 2004).

Os complexos mais bem estudados são da família SWI/SNF, que são frequentemente direcionados para diversos promotores gênicos (COSMA *et al.*, 1999; NEELY *et al.*, 2002) e parecem ser reguladores cruciais da ativação gênica, podendo ejetar e mover nucleossomos, expondo sítios de ligação para fatores de transcrição (LOGIE; PETERSON, 1997; FAN *et al.*, 2003). Uma vez que os nucleossomos atuam como barreiras à transcrição, afetando desde a ligação dos ativadores e a formação do complexo de pré-iniciação até a alongação, os promotores de genes transcricionalmente competentes apresentam frequentemente uma redução na densidade de nucleossomos, e o complexo SWI/SNF é capaz de gerar essas regiões (PIATTI, ZEILNER & LUSSER, 2011).

Além disso, outra atividade de complexos remodeladores de cromatina é a substituição das proteínas histonas convencionais por proteínas histonas variantes. Diferentemente das histonas canônicas que só são sintetizadas durante a fase S do ciclo celular, essas proteínas variantes podem ser incorporadas aos nucleossomos por mecanismos independentes da replicação, que envolvem tanto complexos remodeladores de cromatina como chaperonas de histonas (LI; CAREY; WORKMAN, 2007). A presença dessas histonas nos nucleossomos correlaciona-se com propriedades funcionais da cromatina. Por exemplo, genes transcricionalmente ativos caracterizam-se pela presença das histonas variantes H3.3 e H2A.Z (JIN *et al.*, 2009). O complexo SWR1 desempenha a troca de dímeros H2A/H2B por H2A.Z/H2B (MIZUGUCHI *et al.*, 2004) e esses nucleossomos parecem ser menos estáveis que os nucleossomos canônicos, facilitando a exposição do DNA e ativação gênica.

Complexos remodeladores de cromatina podem também mediar a repressão gênica, modificando o espaçamento dos nucleossomos de forma a restringir o acesso a cromatina e recrutando modificadores de cromatina que reforçam a repressão gênica. Um exemplo é o complexo Mi2-NuRD o qual contém histonas deacetilases e uma proteína (MBD3) que reconhece o DNA metilado, modificação associada ao silenciamento gênico (DENSLOW & WADE, 2007).

1.7 Metilação de sítios CpG

A metilação do DNA é um eficiente mecanismo epigenético de repressão e foi proposta como tal pela primeira vez em 1975 (RIGGS *et al.*, 1975; HOLLIDAY; PUGH, 1975). As moléculas alvo de metilação no DNA de mamíferos são as citosinas em dinucleotídeos CpG. O grupo metil proveniente de S-adenosilmetionina é adicionado covalentemente ao carbono 5 do anel pirimidínico da citosina e este processo é catalisado por enzimas denominadas DNA metiltransferases (ROTTACH *et al.*, 2009). Sabe-se que a metilação de CpG é essencial em alguns processos vitais tais como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico. Além disso, padrões anormais de metilação estão associados a diversos cânceres, através da inativação de genes supressores de tumor, como por exemplo, *P16* (LUO *et al.*, 2006).

DNA metiltransferases (Dnmt) estabelecem e mantêm o padrão de metilação no genoma. Dentre elas destaca-se a Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b. A Dnmt1 é ubiquitariamente expressa e regulada positivamente durante a fase S do ciclo celular, e seu substrato preferencial são fitas de DNA hemimetiladas (FITZPATRICK; WILSON, 2003). Em 1978 já havia evidências de que o padrão de metilação era herdado e que sítios CpG em fitas complementares do DNA estavam ambos metilados ou ambos não-metilados (BIRD, 1978). De fato, durante a replicação do DNA, a enzima Dnmt1 liga-se e metila sítios CpG na fita filha recém sintetizada mantendo o padrão de metilação complementar ao da fita mãe, de forma a propagar a informação epigenética.

As enzimas Dnmt3a e Dnmt3b estão envolvidas em estabelecer novos padrões de metilação (principalmente durante o desenvolvimento embrionário, quando todo DNA está demetilado) modificando dinucleotídeos CpG não metilados específicos (OKANO *et al.*, 1999). Uma vez que esses novos padrões de metilação sejam estabelecidos, eles podem ser propagados através da replicação do DNA pela Dnmt1. Já foram descritas outras DNA metiltransferases (Dnmt), como a Dnmt3L que apesar de não possuir atividade catalítica intrínseca, pode ligar-se a Dnmt3a e Dnmt3b, aumentando a atividade dessas enzimas (HATA *et al.*, 2002; SUETAKE *et al.*, 2004).

Por outro lado, a atividade de demetilação ainda permanece incerta. Existem dois possíveis processos para remoção de grupos metil de um DNA metilado: um mecanismo passivo, pelo qual a metilação simplesmente não é mantida durante a

replicação do DNA (ex: níveis de Dnmt1 limitantes) e outro ativo, catalizado por possíveis DNA demetilases. A ligação de fatores de transcrição também pode levar a demetilação passivamente. Um exemplo é o fator de transcrição Sp1. Este pode ligar-se a seu sítio consenso no DNA, mesmo se os sítios CpG estiverem metilados. A sua ligação nestas sequências exclui DNA metiltransferases e induz um estado de cromatina acessível, transcricionalmente constitutivo (BRANDEIS *et al.*, 1994).

A demetilação do promotor de IL-2 induz a expressão desta citocina em células T e experimentos *in vivo* mostraram que esta demetilação ocorre 20 minutos após o estímulo (BRUNIQUEL; SCHWARTZ, 2003). A rapidez com que ocorre esse processo, independente do ciclo celular, é um importante indício da existência de enzimas com função de DNA demetilase.

Alguns estudos apontam para um possível papel de enzimas que catalizariam a desaminação de citosinas metiladas para timinas, e esse processo seria seguido por um reparo de erro de pareamento G/T, o que ao final culminaria com a substituição por uma citosina não-metilada. Dois estudos propuseram que eventos de metilação e demetilação cíclicos, em um curto espaço de tempo (2 h), ocorrem em promotores de genes transcricionalmente ativos em células de mamíferos. Surpreendentemente os estudos apontam que a atividade demetilase é iniciada pelas enzimas Dnmt3a e Dnmt3b, que estariam envolvidas na desaminação de metil-CpG (MÉTIVIER *et al.*, 2008). Recentemente foi proposto que uma enzima denominada Tet1 pudesse funcionar como uma DNA demetilase (GUO *et al.*, 2011). Esta enzima possui um sítio de ligação relacionado a sítios CpG (TAHILIANI *et al.*, 2009), está preferencialmente localizada em ilhas CpG e sua depleção resultou no aumento da metilação em ilhas CpG (WU *et al.*, 2011). Tet1 atua hidroxilando 5metil-CpG (TAHILIANI *et al.*, 2009; WU & ZHANG, 2011) em 5hmC, e este seria o intermediário no processo de demetilação ativa. Tet1 pode também mediar passivamente o processo de demetilação, uma vez que Dnmt1 é incapaz de reconhecer 5hmC (WU & ZHANG, 2011), inviabilizando a manutenção do padrão de metilação. No entanto estas descobertas ainda são muito recentes e devem ser melhores elucidadas. Na Fig. 1.2 está esquematizada a dinâmica da metilação de sítios CpG em mamíferos.

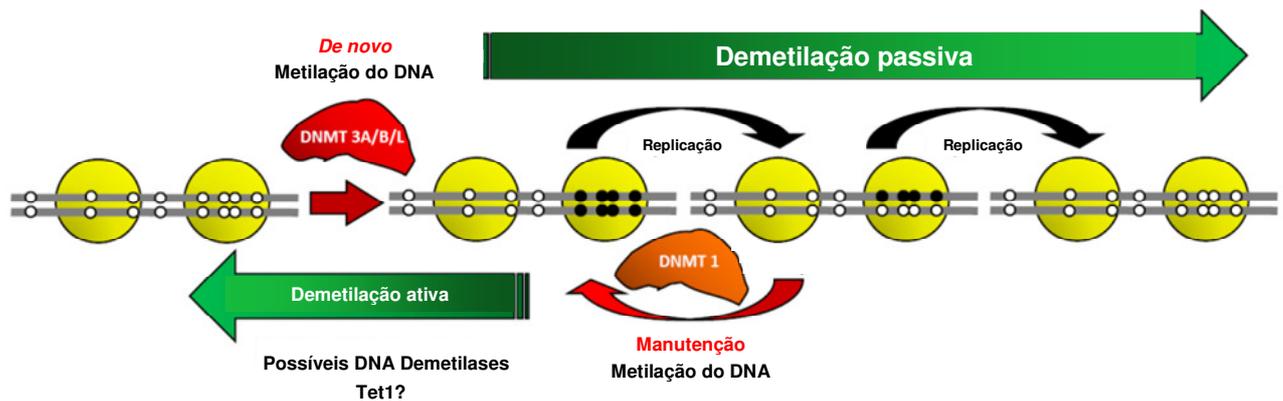


Figura 1.2. Metilação e demetilação de sítios CpG. Durante a replicação celular os padrões de metilação do DNA são mantidos pela ação da DNA metiltransferase Dnmt1 e novos padrões de metilação podem ser estabelecidos pela atividade catalítica das DNA metiltransferases Dnmt3A e Dnmt3B. Esse processo pode ser aumentado na presença da Dnmt3L. Os padrões de metilação do DNA também podem ser modificados por mecanismos de demetilação. A demetilação passiva ocorre após ciclos de divisão celular quando a atividade da Dnmt1 é perdida. Por outro lado a demetilação ativa ocorre pela substituição enzimática de uma citosina metilada por uma citosina não-metilada. Enzimas como a Tet1 surgem como possíveis enzimas de atividade DNA demetilase. Círculos fechados representam sítios CpG metilados e círculos abertos representam sítios CpG não-metilados. (Adaptado de DE CARVALHO; YOU; JONES, 2010).

Durante a evolução, a desaminação espontânea de metil-citosinas para timinas levou a uma perda significativa de dinucleotídeos CpG no genoma de espécies ricas em sequências CpG metiladas. No entanto permaneceram no genoma algumas regiões com alta densidade de sítios CpG, denominadas ilhas CpG. Em 2002, Takai e Jones redefiniram o conceito de ilhas CpG como sequências de DNA associadas com a região 5' de genes, acima de 500 pb, com conteúdo de GC acima de 55% e frequência de CpG acima de 0,65.

Aproximadamente 60-70% dos sítios CpG do genoma de mamíferos são metilados (ROTTACH *et al.*, 2009) e essas regiões incluem DNA satélite e transposons. Novamente, as ilhas CpG são exceções dessa metilação global de sítios CpG. Aproximadamente 60% de todos os promotores gênicos de mamíferos são ricos em sítios CpG (ANTEQUERA; BIRD, 1993) e a maior parte das ilhas CpG são localizadas justamente nestas regiões 5' e no primeiro exon de genes. As ilhas CpG constituem o promotor mais comum em genomas de vertebrados e são regiões cujo estado da cromatina está permissivo à transcrição pela presença, por exemplo, de acetilação de histonas H3 e H4 e metilação de H3K4 (DEATON; BIRD, 2011). Além disso, diversos estudos indicam que ilhas CpG são também importantes reguladores da função de sequências reguladoras distais, tais como *enhancers* e *insulators* (TANAY *et al.*, 2007). Então as ilhas CpG destacam-se tanto pela alta densidade de sítios CpG, quanto pela ausência de metilação nesses sítios. No entanto, existem diversos exemplos de ilhas CpG em promotores gênicos que tornam-se diferencialmente metilados em determinados tipos celulares, culminando com o silenciamento gênico.

O estudo de Métivier (2008), citado anteriormente, mostrou que ocorrem modificações cíclicas no padrão de metilação de dinucleotídeos CpG presentes no promotor ativo do gene *pS2/TFF1*. Isto sugere que a metilação de CpG parece não ser somente uma marca epigenética estável mas também um componente dinâmico da regulação da transcrição.

A metilação do DNA está associada com a repressão e silenciamento gênico através de mecanismos diretos e indiretos. Diretamente, através da inibição da ligação de fatores de transcrição que não reconhecem sítios CpG metilados, como por exemplo o fator transcricional E2F (CAMPANERO; ARMSTRONG; FLEMINGTON *et al.*, 2000). Mecanismos indiretos incluem a ligação de proteínas às citosinas metiladas. Essas proteínas impedem a ligação de fatores de transcrição ao DNA e podem recrutar histonas desacetilases, histonas metiltransferases e outros

fatores que tornam a cromatina compacta e conseqüentemente menos acessível à maquinaria de transcrição.

Diversas proteínas de ligação específica a citosinas metiladas (MBD) já foram descritas, entre elas MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4, Kaiso (ROTTACH *et al.*, 2009). Essas proteínas são capazes de recrutar diferentes complexos associados à repressão gênica e apresentam algumas particularidades, como por exemplo, a proteína Kaiso, que diferentemente das demais reconhece dois sítios CpG metilados adjacentes (PROKHORTCHOUK *et al.*, 2001). Dentre estas, as mais importantes na regulação de genes de mamíferos são: MeCP2, MBD1 e MBD2. MeCP2 reprime a transcrição ligando-se às citosinas metiladas, através da interação com complexos correpressores como mSin3a e recrutamento de histonas deacetilases (JONES *et al.*, 1998; NAN *et al.*, 1998). A proteína MBD1 é capaz de associar-se durante a replicação celular, à lisina metil-transferase de histona, SETDB1, que metila H3K9 reforçando o silenciamento gênico (SARRAF; STANCHEVA, 2004). A proteína MBD2 é um componente do complexo repressor MeCP1, que inclui também o complexo remodelador de cromatina, NuRD (WADE *et al.*, 1999). MBDs podem mediar então a associação entre importantes maquinarias epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações de histonas. As proteínas MBD também podem reprimir a transcrição de promotores metilados, competindo ou deslocando outras proteínas que se ligam ao DNA.

Dnmts também são capazes de recrutar HDAC, HMT, componentes do complexo repressivo Polycomb, além de interagirem com o domínio ATPase de diversos remodeladores de cromatina (revisado por ROTTACH *et al.*, 2009). Por outro lado, modificações de histona permissivas à transcrição, como a metilação de H3K4, inibem a ligação de Dnmt3L à cromatina (OOI *et al.*, 2007).

É o conjunto das modificações epigenéticas em determinado *locus* e toda a interação da maquinaria de remodelamento de cromossomo com a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica e na organização da cromatina. Modificações epigenéticas estabelecem diferentes “estruturas” na cromatina, que podem ser permissivas ou restritivas à transcrição (Fig. 1.3). Um estado de cromatina ativa, descondensada, também referido como “aberto”, é caracterizado pela hiperacetilação de resíduos de histonas, e metilação de H3K4, além de maior disponibilidade de acesso aos fatores de transcrição. A metilação de citosinas em

dinucleotídeos CpG está frequentemente relacionada ao estado de cromatina denominado inativo ou “fechado”, juntamente com a metilação de H3K9 e H3K27.

1.8 Epigenética e sistema imune

Durante o desenvolvimento e diferenciação, linfócitos T estão sujeitos a diferentes escolhas que condicionam seu destino celular: comprometimento com determinada linhagem de TCR; no caso de células com TCR $\alpha\beta$, comprometimento com linhagem CD4 ou CD8; e finalmente diferenciação das células CD4 em células T efectoras. Como os mecanismos epigenéticos estão associados com todos esses eventos, estudos sobre a regulação da cromatina nas células do sistema imune tornam-se cada vez mais importantes (WILSON *et al.*, 2005).

As primeiras evidências que o estado epigenético de genes do sistema imune regula sua competência transcricional vieram com estudos nos quais o tratamento com 5-azacitidina (inibidor da metilação do DNA) resultou na produção de IL-2 (BALLAS, 1984) e IFN- γ (YOUNG *et al.*, 1994) por células T incapazes de produzir tais citocinas previamente. Da mesma forma, o tratamento de células T CD4 com inibidores de histonas desacetilases aumentou a expressão de IFN- γ e IL-4 em células T (BIRD *et al.*, 1998). A remoção condicional de Dnmt1 e MBD2, que induzem um estado de cromatina inativo, também levou ao aumento da expressão de IFN- γ em células Th2 e citocinas Th2 em células Th1 e CD8 (LEE *et al.*, 2001; HUTCHINS *et al.*, 2002; MAKAR; WILSON, 2004). Estes trabalhos apontaram para o importante papel da metilação do DNA, MBDs e a desacetilação de histonas na restrição da expressão de citocinas específicas à subpopulação de células T apropriada.

Animais deficientes em diversos componentes envolvidos na regulação da cromatina também resultaram em alterações de fenótipo em células T, evidenciando ainda mais a importância desses mecanismos epigenéticos no desenvolvimento e função de células T (revisado por KANNO *et al.*, 2011). Por exemplo, quando a proteína BAF57, componente do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF, é mutada, há uma desregulação no silenciamento de CD4, durante o desenvolvimento tímico (CHI *et al.*, 2002).

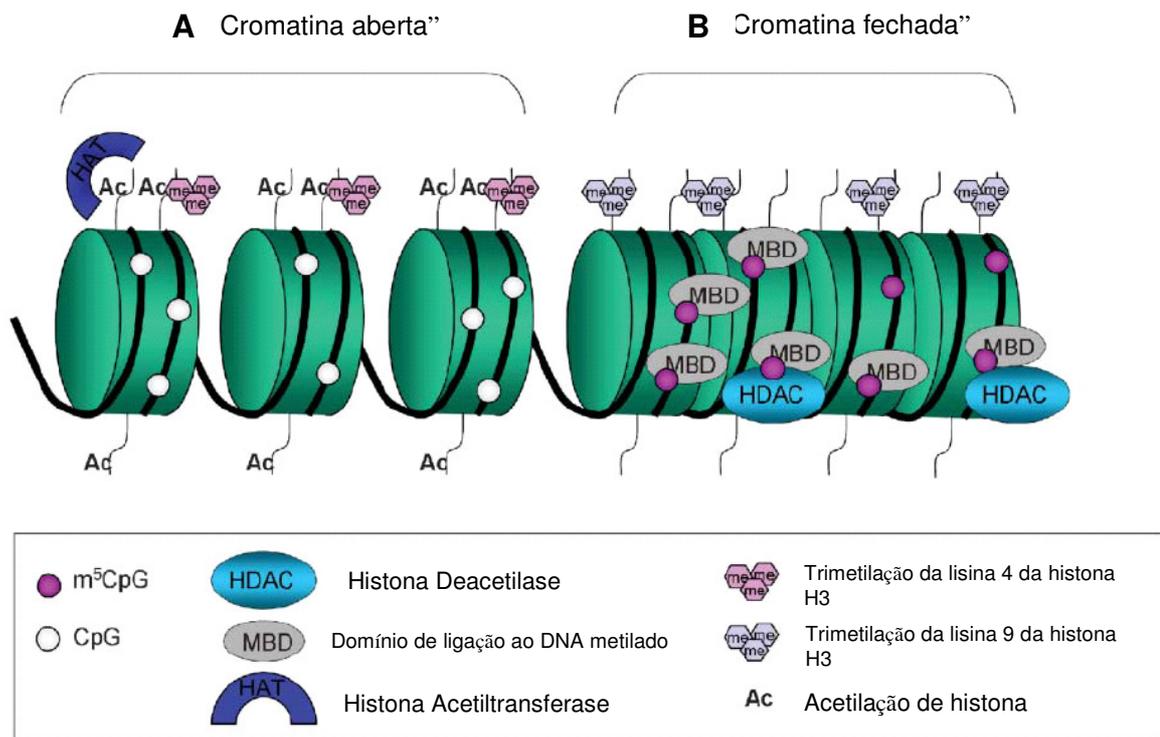


Figura 1.3. Estrutura da cromatina em promotores ativos e inativos. A) A cromatina transcricionalmente ativa é caracterizada por citosinas não-metiladas, e histonas acetiladas. A lisina 4 da cauda N-terminal da histona H3 pode estar trimetilada **B)** A cromatina em promotores inativos apresenta entre outras características, metilação de citosinas o que pode recrutar histona desacetilases (HDAC) e trimetilação da lisina 9 da histona H3. (Adaptado de GRONBAEK; HOTHER; JONES, 2007).

Diversos estudos também evidenciam a importância da metilação de sítios CpG na expressão de genes associados ao sistema imune: a demetilação dos genes CD8 α e CD8 β é associada à transição de timócitos duplo-negativos para CD4⁺CD8⁺ e a metilação do DNA e outros mecanismos de regulação da cromatina são também importantes na regulação da expressão de receptores KIR e Ly49 em células NK (revisado por WILSON *et al.*, 2005).

Outros trabalhos também evidenciaram a importância da metilação de CpG, como um mecanismo de regulação da produção de citocinas pelas células T. Os 15 sítios CpG encontrados na região -2,2 kb a +98 pb do gene que codifica a citocina IL-2, aparecem metilados em células T CD4 *naive*, cuja expressão de IL-2 é silenciada. Porém 7 horas após ativação cinco sítios CpG já estão demetilados (BRUNIQUEL; SCHWARTZ, 2003) e *in vivo* essa demetilação é ainda mais evidente, acontecendo em apenas 20 minutos após estímulo. Makar & Wilson (2004) também mostraram que modificações na manutenção do padrão de metilação levam à reversão do silenciamento dos genes IL4, IL-5, IL-13 e IL-10 em células T CD8. Da mesma forma, Winders, Schwartz & Bruniquel (2004), demonstraram que a metilação do promotor do gene do IFN- γ inibe sua atividade transcricional.

Mas a importância da regulação epigenética no sistema imune é especialmente clara no que diz respeito à diferenciação de células T CD4 em células T *helper*, onde diversas evidências mostraram que mecanismos epigenéticos são determinantes no processo de diferenciação e estabilização desses diferentes fenótipos. A capacidade de produção de citocinas Th1 e Th2 é relacionada a diferenças na estrutura da cromatina destas células (AGARWAL, RAO, 1998; AGARWAL, AVNI & RAO, 2000; AVNI *et al.*, 2002; WILSON, ROWELL, SEKIMATA, 2009) e modificações na cromatina do gene *Ifng* e nos *loci* de citocinas Th2 estão associadas com este comprometimento em Th1 ou Th2. Em células T CD4 *naive* os genes *Ifng* e *Il4/Il5* não estão localizados em regiões de cromatina silenciada. No entanto, após a diferenciação para o fenótipo efetor, os genes associados ao fenótipo oposto passam a ser mais frequentemente associados a regiões de heterocromatina (GROGAN *et al.*, 2001).

Sabe-se que a diferenciação Th1/Th2 é acompanhada por alterações na acessibilidade da enzima DNase I à cromatina nos genes das citocinas transcritas pela respectiva subpopulação de células T. Estes sítios hipersensíveis coincidem com regiões de acetilação de histonas e demetilação do DNA, ou seja, regiões transcricionalmente ativas. Os fatores transcricionais linhagem-específicos

anteriormente comentados regulam esta diferenciação Th1/Th2, em parte através de mecanismos epigenéticos. A acetilação de histonas H3 e H4 é aumentada no *locus* de IFN- γ e IL4 após a diferenciação em células Th1 e Th2 respectivamente, e estas alterações são dependentes de T-bet e GATA3 (FIELDS, KIM & FLAVELL, 2002; AVNI *et al.*, 2002). Em seu trabalho, Avni e colaboradores (2002) mostraram que o estímulo inicial de células T CD4 leva a uma hiperacetilação de histonas dos genes *Ifng* e *Ii4*, não dependente das citocinas polarizantes. Porém quando diferenciadas em condições polarizantes (Th1 ou Th2) a hiperacetilação fica restrita às regiões regulatórias dos genes de citocinas específicos de cada subpopulação. Este processo depende tanto destas citocinas polarizantes (IL-4 e IL-12) como dos fatores de transcrição linhagem-específicos (STAT6 e T-bet).

Evidências recentes mostraram que mecanismos epigenéticos estão também associados à diferenciação Th17, na qual foram observadas modificações de histonas permissivas à transcrição (acetilação de H3 e metilação de H3K4) no promotor e regiões regulatórias distais do gene IL-17, após diferenciação (AKIMZHANOV, YANG & DONG, 2007). Estudos acerca da regulação epigenética em células Treg são muito recentes, mas a metilação do DNA parece ter um importante papel na regulação de Foxp3, o principal fator transcricional envolvido na diferenciação em Tregs. Em Tregs naturais, a expressão de FoxP3 está associada com a demetilação do DNA em importantes elementos regulatórios deste *locus* (KIM; LEONARD, 2007; LAL *et al.*, 2009). A metilação de CpGs nesta região reprime a expressão de Foxp3 e a completa demetilação é necessária para sua expressão estável.

Um trabalho recente fez o mapeamento de modificações de histonas permissivas (metilação de H3K4) e restritivas (metilação de H3K27) à transcrição em todo o genoma de células T CD4 *naïve*, e células Th1, Th2, Th17 e Tregs. Como esperado, os promotores das citocinas apresentaram modificações permissivas à transcrição em sua subpopulação específica, e restritivas por todo o *locus* nas outras subpopulações. Por outro lado, os promotores dos genes codificantes dos fatores de transcrição específicos para cada linhagem efetora, como T-bet e GATA-3, apresentaram tanto metilação de H3K4 quanto de H3K27 nas subpopulações em que não são expressos, sugerindo uma flexibilidade em sua expressão. De fato este achado pode explicar a existência de linhagens efetoras plásticas, como células Th17 que são capazes de expressar T-bet e produzir IFN- γ em certas condições (WEI *et al.*, 2009).

1.9 Regulação epigenética do gene *Ifng*

A produção de IFN- γ está também relacionada à acessibilidade da cromatina ao *locus* de *Ifng* nestas células. A produção rápida de IFN- γ por células NK e NKT após estímulo está associada à expressão constitutiva de T-bet e o fato dos elementos regulatórios que contém sítios para este fator de transcrição estarem contidos em uma cromatina dita “ativa”, acessível (STETSON *et al.*, 2003). Regiões ao longo do gene *Ifng* apresentam domínios de hiperacetilação em células NK e células Th1 (CHANG & AUNE, 2005) e o íntron 1 de *Ifng* encontra-se demetilado em células NK (TATO *et al.*, 2004). Também foram descritos três sítios hipersensíveis à DNase I no promotor, íntron 1 e íntron 3 do gene *Ifng* (AGARWAL; RAO, 1998). Estes sítios estão mais acessíveis após a diferenciação Th1, quando comparados a células Th2. Da mesma forma estes sítios também podem ser identificados mesmo em células NK não estimuladas (TATO *et al.*, 2004).

Como já citado anteriormente, fatores de transcrição como T-bet e STAT4 induzem modificações permissivas à transcrição no gene *Ifng* em células Th1. Além de transativar diretamente a expressão de IFN- γ e induzir a expressão de Hlx e Runx3, um trabalho recente mostrou que T-bet também recruta a histona demetilase JMJD3, que remove a trimetilação repressiva na H3K27, e a histona metiltransferase SET7 que metila a H3K4. O resultado é um estado de cromatina permissivo à transcrição (MILLER *et al.*, 2008). Por outro lado, STAT4 recruta BRG1 ao promotor de *Ifng* induzindo à aquisição de modificações de nucleossomos favoráveis à transcrição, e este processo é dependente também da ativação da calcineurina (ZHANG; BOOTHBY, 2006).

Em relação à metilação, evidências da sua importância na regulação deste gene foram confirmadas em um estudo que mostrou que células T *Dnmt1*^{-/-} apresentaram produção de IFN- γ 5-10 vezes maior após ativação *in vitro* do que células T *Dnmt1*^{+/+} (MAKAR; WILSON, 2004). Células incapazes de produzirem IFN- γ , como fibroblastos e hepatócitos, também apresentam o promotor do gene *Ifng* hipermetilado (WINDERS *et al.*, 2004; SHOENBORN *et al.*, 2007).

Também em 2007, Chang e Aune mostraram que o padrão de metilação de histonas no *locus Ifng* correlaciona-se com a diferenciação de células T: a metilação inicial de H3K9 é dependente de ativação e é mantida em células Th1 e não em células Th2. Por outro lado, durante a diferenciação Th2, GATA-3 é capaz de ligar-

se ao promotor e intron 1 de *Irfng*, e recrutar a enzima metiltransferase de H3K27, EZH2, que contribui no silenciamento da expressão de IFN- γ nessas células.

1.10 Regiões regulatórias distais

Os mecanismos regulatórios de expressão gênica em mamíferos podem ser divididos em três categorias principais: (1) regulação da transcrição *in cis*, mediada por promotores, *enhancers* e *silencers*; (2) regulação *in trans* mediada pela ligação de fatores de transcrição aos sítios *cis*, RNA de interferência e microRNAs; (3) regulação através da modificação da estrutura da cromatina (ADAMS *et al.*, 2005).

Os promotores gênicos são suficientes para regular a expressão gênica em procariotos. No entanto em células de mamíferos, elementos regulatórios distais agem de forma conjunta com esses promotores para garantir a expressão gênica correta. Estas regiões regulatórias possuem diversos sítios para ligação de fatores de transcrição (6-15 pb) e são altamente conservadas nos vertebrados (HARDISON, 2000). Esses elementos regulatórios podem estar imediatamente *upstream* ao promotor, em íntrons ou até mesmo a kilobases de distâncias dos genes que regulam. Dentre estes elementos regulatórios podemos citar os *enhancers* que aumentam a transcrição de determinado gene, ativamente ou promovendo modificações epigenéticas permissivas; e os *silencers* que silenciam a expressão gênica.

O avanço de ferramentas de bioinformática permitiu prever potenciais elementos regulatórios. Esses algoritmos assumem que essas regiões devem ser evolutivamente conservadas, podendo ser identificadas através do alinhamento da sequência de DNA de diferentes espécies. Essas regiões são denominadas sequências não codificadoras evolutivamente conservadas (CNS) e são definidas como regiões não-codificantes de pelo menos 100 pb e 70% de identidade de sequência entre espécies (HATTON *et al.*, 2006). É importante ressaltar que essas CNS podem estar relacionadas a diversas funções envolvidas na regulação gênica e também na estrutura da cromatina. Com isso, esses elementos podem funcionar *in cis*, como *enhancer*, *silencers* e *insulators*, modulando a transcrição de um gene adjacente, mas podem também contribuir no estabelecimento da estrutura da cromatina local e em interações à distância com outros elementos regulatórios.

1.10.1 Regiões regulatórias de *Ifng*

O gene *Ifng* é formado por 4 éxons e 3 íntrons, tanto em humanos quanto em roedores e seu promotor possui aproximadamente 600 pb (SCHOENBORN & WILSON, 2007). No trabalho de Zhu e colaboradores, 2001, foi sugerido que a regulação fisiológica do promotor de *Ifng* necessitava de elementos *in cis* que reprimissem a atividade constitutiva, independente de estímulo e tipo celular, de uma região 3,4 kb *upstream* ao gene *Ifng*.

Mas a complexidade da regulação da expressão de IFN- γ ficou evidenciada em um estudo que mostrou que um transgene contendo o gene *IFNG* humano e sequências flanqueadoras com aproximadamente 90 kb, *upstream* e *downstream*, eram necessários para a expressão elevada de IFN- γ e específica em células Th1 (SOUTTO *et al.*, 2002). Este foi um indício que elementos regulatórios distais provavelmente possuem um importante papel na regulação da expressão de IFN- γ . Esta região genômica de 190 kb é rica em sequências CNS entre o genoma humano e de camundongo. A partir de então diversos trabalhos da literatura vêm identificando e caracterizando funcionalmente algumas destas possíveis sequências. Este mesmo estudo também demonstrou que os íntrons 1 e 3 de *IFNG* contêm atividade de *enhancer*.

Em 2004, Shnyreva e colaboradores identificaram duas CNS localizadas 5,27kb *upstream* (CNS1 ou CNS-6) e 17,36kb *downstream* (CNS2 ou CNS+18-20) em relação ao sítio de início de transcrição do gene *Ifng*. Nestas regiões eles identificaram um aumento na acetilação de H3 em células Th1, semelhantemente ao observado no promotor e intron 3. Essas regiões também apresentaram sítios hipersensíveis a DNase I, exclusivamente em células Th1. (LEE *et al.*, 2004; SHNYREVA *et al.*, 2004). A cromatina na região CNS1 apresenta outras características de acessibilidade em células Th1, como a metilação de H3K4. Além disso, fatores de transcrição como NFAT e T-bet ligam a essa região em linhagens de células Th1 estimuladas, aumentando a atividade de *enhancer* desta região (Lee *et al.*, 2004). Foi mostrado que esta região regula positivamente a expressão de IFN- γ (SHNYREVA *et al.*, 2004) e aparece completamente metilada em células T CD4 *naive* e células Th2, mas demetilada em células Th1 (SCHOENBORN *et al.*, 2007).

Sabe-se que a estrutura tridimensional dos cromossomos pode ser alterada durante os processos de diferenciação celular, levando a formação de *loopings* que aproximam regiões regulatórias distais dos promotores gênicos, facilitando assim a transcrição gênica. Os *locus* de *Ifng* e *Il4* estabelecem ligações intercromossomos

em células T CD4 *naive*, que diminuem após a diferenciação em células efetoras. Interessantemente, a CNS1 também interage com *Irfng* e, durante a diferenciação para um fenótipo Th1, a CNS2 aproxima-se do promotor de *Irfng*, evidenciando ainda mais a importância regulatória dessas regiões (SPILIANAKIS *et al.*, 2005).

Com o avanço das ferramentas de bioinformática, outros estudos identificaram novas CNS, como a CNS-22. Essa região apresentou-se essencial para a produção de IFN- γ em células Th1 e T CD8, no entanto não apresentou diferença no padrão de acetilação em células T CD4 *naive*, Th1 e Th2 (HATTON *et al.*, 2006), estando acetilada de forma semelhante em todas as células.

Mais recentemente um estudo identificou um total de 8 CNS localizadas em uma região flanqueadora do gene *Irfng* de aproximadamente 100 kb. Dentre estas, estão a CNS1, CNS2 e CNS-22 anteriormente identificadas (SCHOENBORN *et al.*, 2007). Estas regiões foram denominadas de acordo com sua distância (em kb) em relação ao início de transcrição de *Irfng* (Fig. 1.4). Destas regiões as CNS-34; CNS-22; CNS-6 (CNS1); CNS+18-20 (CNS2) e CNS+29 apresentaram características *in vitro* de *enhancers*, dependendo do estímulo e tipo celular. Sugere-se que a CNS+46 seja um *insulator*.

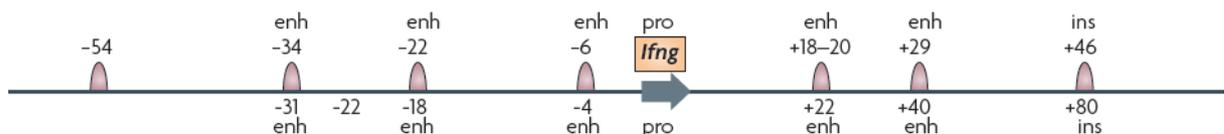


Figura 1.4. Locus de *Irfng* com as 8 CNS identificadas. As CNS são denominadas de acordo com sua distância ao início de transcrição de *Irfng* e suas funções regulatórias estão evidenciadas: *pro* (promotor); *enh* (*enhancer*); *ins* (*insulator*). Adaptado de WILSON; ROWELL; SEKIMATA, 2009.

Este mesmo estudo fez uma análise abrangente desta região de 100 kb a fim de comparar o padrão epigenético encontrado em células T CD4 *naive*, Th1 e Th2. Foram analisados os sítios de hipersensibilidade a DNase I, padrão de metilação e modificação de histonas no promotor do *Ifng* e em todas as 8 CNS identificadas, confirmando alguns achados anteriores e identificando novos. Eles observaram que a diferenciação Th1 induz a demetilação no *Ifng*CNS1, intron 1 e *Ifng*CNS2, juntamente com o notável aumento da dimetilação de H3K4 em todas as regiões analisadas. Os sítios hipersensíveis a DNase denominados HS I, II e III, localizados no promotor de *Ifng*, intron 1 e intron 3 respectivamente, que já haviam sido identificados (AGARWAL & RAO, 1998), foram confirmados e outros sítios foram identificados. Por outro lado a diferenciação Th2 leva à metilação do promotor de *Ifng*, e aumento da trimetilação de H3K27 por todo o *locus*. Estas diferenças epigenéticas sugerem que a expressão de IFN- γ em células T CD4 *naive*, Th1 e Th2 é regulada em parte por elementos distais e também por mecanismos epigenéticos.

Dados anteriores mostraram que células T CD8 *naive* são capazes de produzir IFN- γ , sem necessitar do processo de diferenciação (TEIXEIRA *et al.*, 2005) enquanto uma produção significativa desta citocina pelas células T CD4 só ocorre após sua diferenciação em Th1. Em 1999, Carter e colaboradores mostraram que enquanto células T CD4 *naive* necessitavam da sinalização via STAT4 associada ao estímulo do TCR para produzirem IFN- γ , células T CD8 só precisavam do estímulo via TCR, independente de STAT4, sugerindo uma regulação da expressão de *Ifng* diferencial entre células T CD4 e T CD8. Como mecanismos epigenéticos são os principais reguladores da expressão de citocinas, supomos que esta regulação diferencial da expressão do IFN- γ em linfócitos T CD4 e T CD8 seja realizada, ao menos em parte, através da regulação da cromatina do gene *Ifng*.

Os estudos atuais sobre essa questão abordam principalmente o papel deste *locus* nas células T CD4, Th1 e Th2. Por isso, pretendemos utilizar alguns destes achados para elucidar os mecanismos epigenéticos que regulam a produção de IFN- γ pelos linfócitos T, comparando a regulação desta região entre as células T CD4 e T CD8. Tal conhecimento poderá contribuir de forma fundamental para a compreensão de mecanismos moleculares associados à diferenciação e produção de citocinas por estas células.

Dada a importância do IFN- γ para a imunidade contra patógenos intracelulares e para o controle do desenvolvimento tumoral, e o fato de sua expressão aberrante estar associada a diversas doenças auto-imunes e

inflamatórias, o conhecimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da sua expressão pelas células T contribuirá para uma melhor compreensão destas vias. O que por sua vez permitirá o planejamento de intervenções e novas terapias para o tratamento tanto de doenças relacionadas a respostas Th2, quanto relacionadas à Th1. Apesar de muito ser conhecido sobre a estrutura, funções e vias de sinalização induzidas pelo receptor de IFN- γ , o controle de sua expressão em células do sistema imune é ainda pouco esclarecido e só vem recebendo mais atenção recentemente e este projeto se propôs a colaborar com isso.

2. OBJETIVOS

Devido ao papel fundamental do IFN- γ em diferentes aspectos da regulação da resposta imune e a importante função de mecanismos epigenéticos na regulação da expressão de citocinas, este projeto tem como objetivo principal avaliar os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão diferencial de IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8. Para tanto, nossos objetivos específicos foram:

- 2.1.** Avaliar a expressão e produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8;
- 2.2.** Verificar a existência de regiões com diferente acesso à cromatina no *locus* de *Ifng* em linfócitos T CD4 e CD8;
- 2.3.** Analisar o estado de metilação do DNA em regiões regulatórias de *Ifng* em linfócitos T CD4 e CD8;
- 2.4.** Avaliar a função das regiões com diferente acesso à cromatina previamente identificadas, na regulação de *Ifng*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Todos os animais utilizados foram mantidos no biotério do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e tratados de acordo com as normas de tratamento de animais do Council for International Organizations of Medical Sciences.

3.2 Purificação de células T CD4 e T CD8.

As células T CD4 e T CD8 utilizadas neste projeto foram isoladas de linfonodos cervicais superficiais, braquiais, axilares e inguinais de camundongos C57BL/6 com kits de imunopurificação negativa (Dyna). A suspensão celular final possuiu no mínimo 95% de pureza, visto através de citometria de fluxo. Após a purificação, as células foram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (1 mM), estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (100.000 U), solução de aminoácidos MEM não-essenciais e essenciais 1x, piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), solução de vitaminas MEM 1x, HEPES (10 mM) e β-mercaptoetanol (55 μM) (todos fornecidos pela Invitrogen).

3.3 Citometria de Fluxo.

As células foram marcadas com anticorpos associados a fluorocromos específicos e posteriormente, lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 2%. Foram utilizados os anticorpos monoclonais marcados: -CD4, -CD8, -CD62L, -CD44 (eBioscience). As células marcadas foram analisadas com o auxílio de um citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan.

3.4 Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4 em Th1 e Th2.

Para obtenção de células diferenciadas nas populações Th1 e Th2, 2×10^6 células T CD4 recém isoladas foram ativadas *in vitro* com anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) e anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) fixados à placa, na presença de citocinas e anticorpos bloqueadores que promovam condições polarizantes para cada um destes perfis. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa úmida a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO_2 . Para fixação do anti-CD3 (2C11) e anti-CD28 (Pharmingen), pré-tratamos as placas de cultura com 0,3 mg/ml de anti-IgG (CAPPEL) durante 1 hora a 37°C . Para a diferenciação Th1, utilizamos 5 ng/ml de IFN- γ , 50 ng/ml de IL-12 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-IL-4. Para a diferenciação Th2, utilizamos 50 ng/ml de IL-4 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-IFN- γ . Todas as citocinas recombinantes foram obtidas da PeproTech, e os anticorpos de bloqueio foram purificados a partir dos hibridomas XMG1.2, para o anticorpo anti-IFN- γ e 11B11 para o anticorpo anti-IL-4. Após 48 horas, as culturas celulares foram suplementadas com 20 U/ml de IL-2 (PeproTech), e a partir de então a cada 24 horas, o volume do meio foi dobrado com meio fresco suplementado com IL-2 (20 U/ml). No sexto dia de diferenciação, as células foram recolhidas, lavadas, e re-estimuladas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) para realização dos experimentos. A confirmação da polarização das culturas foi realizada por marcação intracelular para as citocinas específicas de cada um destes perfis e por ELISA.

3.5 Marcação Intracelular de Citocinas

Para a marcação intracelular de citocinas, 3×10^6 células foram lavadas e ressuspendidas em 3 ml de meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, e estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μM), por 6 horas a 37°C . Após as 4 horas iniciais do estímulo, foi adicionada às culturas 10 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina para promover a estocagem das citocinas produzidas no citoplasma da célula. Após o estímulo, as células foram lavadas e fixadas em 2% de paraformaldeído. Após a fixação, as células foram permeabilizadas em tampão de permeabilização (PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de saponina), por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a permeabilização, foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para a marcação de IFN- γ e IL-4, ou somente IFN- γ (eBioscience), e

incubação por 1 hora a temperatura ambiente no escuro. As marcações foram realizadas em um volume final de 100 µl de tampão de permeabilização e as concentrações finais utilizadas de cada anticorpo foram as sugeridas pelo fabricante. Após as marcações, as células foram lavadas uma vez em tampão de permeabilização e mais uma vez em tampão de FACS (PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de azida sódica), e então ressuspensas em tampão de FACS para análise em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan.

3.6 ELISA

Kits de ELISA comerciais (Pharmingen) foram utilizados para avaliar os níveis proteicos de IFN- γ e IL-4 no sobrenadante das culturas de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 coletados em diferentes tempos após ativação com anti-CD3 (1 µg/ml) fixado à placa. Para essas análises, foram cultivadas 1×10^6 células/poço de placas de 24 poços de fundo chato (TPP) em 1 ml de DMEM 10% SFB e o sobrenadante livre de células foi recolhido para análise.

3.7 PCR em Tempo Real (Taqman)

As células T CD4, T CD8 e Th1 com diferentes tempos após o estímulo com anti-CD3 (1 µg/ml) foram utilizadas para extração de RNA total, com uso do reagente *TRIzol*[®] (Invitrogen). A extração foi feita conforme as instruções do fabricante. A integridade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%, onde observamos bandas equivalentes aos RNA ribossomais 28S, 18S e 5S. Para a reação de transcrição reversa, utilizamos 0,5-1 µg das amostras de RNA total. A síntese de cDNA procedeu-se conforme protocolo descrito pelo fabricante, utilizando-se o oligonucleotídeo OligodT e a enzima *ImpromII*[™] *Reverse Transcriptase* (Promega). A detecção dos transcritos dos genes analisados foi feita, então, através da técnica de PCR em Tempo Real, com o uso do kit *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems). A expressão do mRNA de IFN- γ foi estimada através do método de quantificação relativa. Utilizamos 3,125 ng do cDNA sintetizado para cada reação. Nestes ensaios, foram utilizados os oligonucleotídeos e sondas específicas para os genes *Iifng* e *Hprt* (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase). Este último foi

utilizado como normalizador de nossas reações. As sondas específicas estavam conjugadas aos fluoróforos FAM.

As análises dos resultados foram realizadas a partir da média das duplicatas dos C(t) pelo método de $2^{-\Delta\Delta C(t)}$. C(t) é o ciclo no qual a fluorescência detectada atinge o limiar (do inglês: *threshold*) onde todas as amostras estão em fase de crescimento exponencial. O C(t) de cada amostra é inversamente proporcional quantidade de cDNA molde na reação. Em todos os resultados utilizamos como amostra referência, células T CD4 não-estimuladas.

3.8 Ensaio de Hipersensibilidade a DNase I.

3.8.1 Extração e digestão dos núcleos das células.

Os núcleos de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não-estimuladas, foram utilizados para o ensaio de hipersensibilidade a DNase I. Para tanto, 100×10^6 células foram lavadas com 35 ml de PBS contendo 0,1% de BSA e posteriormente ressuspensas em um tampão de lise (LB+) contendo 0,1% de NP40 e os inibidores de protease Leupeptina (10 μ M) e Aprotinina (1 μ M). Após a lise, as células foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (4°C) por 5 minutos a 1500 rpm e os núcleos ressuspensos em 600 μ l do tampão LB-. A concentração de núcleos foi então estimada através de um espectrofotômetro, avaliando a absorvância da amostra a 260 nm. Os núcleos foram então diluídos para uma concentração final de 0,3 mg/ml e então alíquotas desta diluição (100 μ l) foram submetidas à digestão com concentrações crescentes (0, 5, 10 e 20 U/ml) da enzima DNase I (Worthington) por 6 minutos a temperatura ambiente. Passados os 6 minutos a digestão foi interrompida e as amostras foram então submetidas à digestão com proteinase K (100 μ g/ μ l) a 55°C *overnight*.

3.8.2 Extração do DNA

Para purificação do DNA das amostras de núcleos submetidos ou não a digestão com DNase I, adicionou-se 650 μ l de uma solução 25:24:1 de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico e então a amostra foi centrifugada em centrífuga refrigerada (4°C) a 14000 rpm por 5 minutos. À fase aquosa superior obtida, foi adicionada uma solução 24:1 de Clorofórmio:Álcool Isoamílico e a amostra foi novamente centrifugada conforme descrito anteriormente. Para precipitação do DNA

adicionou-se à fase aquosa superior obtida após a centrifugação, 1 ml de etanol absoluto. A amostra foi então centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o *pellet* obtido foi lavado com uma solução de etanol 70%. Posteriormente o *pellet* foi ressuscitado em 100 µl de Tris 10 mM e EDTA 1 mM. Por fim, as amostras de DNA foram digeridas por completo pela enzima *Bgl*II que não apresenta sítios de clivagem nas regiões analisadas.

3.8.3 PCR em Tempo Real (SYBR Green)

A detecção das regiões de interesse foi feita através de PCR em Tempo Real, como descrito por MCARTHUR *et al.*, 2001. Foi analisado um total de nove regiões compreendidas no promotor (denominadas HSI-1; HSI-3; HSI-4 e HSI-5), intron 1 (HSII-1; HSII-2 e HSII-3) e intron 3 (HSIII-1 e HSIII-2) de *Ihng*. Para tanto, foram sintetizados oligonucleotídeos que flanqueassem cada uma dessas regiões. Foi comparada a detecção da amplificação dessas regiões nas amostras dos núcleos não-digeridos e digeridos com concentrações crescentes de DNase I para cada tipo celular. Para tanto, utilizamos o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) e comparamos os C(t) obtidos a partir de 50 ng iniciais das amostras digeridas com 5, 10 e 20 U/ml de DNase I, com o C(t) obtido a partir de 50 ng do DNA das amostras não-digeridas com DNase I. As análises dos resultados foram realizadas a partir da média das duplicatas dos C(t).

3.8.4 Sequências analisadas

As regiões analisadas eram preferencialmente localizadas sequencialmente no genoma de forma que os *primers* utilizados apresentam sobreposições. Dessa forma nossas análises puderam abranger grandes distâncias do promotor, intron 1 e intron 3 de *Ihng*. Na Tabela 3.1, estão as sequências dos oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 3.1

	Primers	Forward	Reverse
Ensaio de DNase I	HSI-1	<i>ATCCTTATTTGGGACAAGTGTGTG</i>	<i>GTATTTCACTCAACACACCCCAAGG</i>
	HSI-3	<i>CTGGTCATTTGCAAGAAAAGTTG</i>	<i>ATTCTTGTGGGATTCTCTGAAAGC</i>
	HSI-4	<i>CTTCAGAGAATCCCACAAGAATG</i>	<i>CACCTCTCTGGCTTCCAGTTTTAT</i>
	HSI-5	<i>TAAAACTGGAAGCCAGAGAGGTG</i>	<i>TTTCTAGGCTTTCAATGACTGTGC</i>
	HSII-1	<i>CGAAGTTGTTTTACCCTGAGGAG</i>	<i>CCGTAGATGCTTGAACATTATGCTA</i>
	HSII-2	<i>ATCTACGGTCAATCCTCTCCTCAC</i>	<i>AAAGCTGACGAGGTTTCAAGTACC</i>
	HSII-3	<i>GTACTTCAAACCTCGTCAGCTTTG</i>	<i>TAATTATTTACCAATTGCCCTGA</i>
	HSIII-1	<i>GCTGATAAAGCTAGGAGGTGAAGC</i>	<i>CTCCCAGCCTAAGCAAGAGTTTC</i>
HSIII-2	<i>GGAGGTTGTGTGTTAGTGGAAAGA</i>	<i>CTCAGAGCCTGATTCCTTTCCTT</i>	
Análise de Metilação	Promotor de <i>lfng</i>	<i>GTAGAAATAGTTATGAGGAAGAGTG TAAAGTT</i>	<i>ACAAAACT CCCTATACTATA CTCTATAAATAA A</i>
	CNS1	<i>TGAGAAAATGTTTTAATTTATGGGA</i>	<i>AAATACTATCACCCCAATAACACATC</i>

3.9 Análise do estado de metilação de sítios CpG em regiões regulatórias do gene *lfng*.

3.9.1 Extração do DNA

O DNA de células T CD4 e T CD8 não-estimuladas ou estimuladas por 3 e 72 horas com anti-CD3 (1 µg/ml) fixado a placa, foi isolado a partir de um dos protocolos recomendados pelo fabricante de *TRIzol*[®]. À fase orgânica obtida após adição do clorofórmio, foi adicionado 0,5 ml do tampão BEB (*Back Extraction Buffer*), sob agitação por pelo menos 30 minutos. Então, a amostra foi centrifugada em centrífuga refrigerada (4°C) a 12000 g por 15 minutos. À fase aquosa obtida após centrifugação adicionou-se 1 µl de glicogênio (20 µg/µl) e 0,4 ml de isopropanol para precipitação do DNA. A amostra foi novamente centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4°C, e o precipitado obtido foi submetido a sucessivas lavagens (3x) com 1,2 ml de etanol 75%. Por fim, o DNA precipitado foi ressuspendido em H₂O miliQ.

3.9.2 Tratamento com bissulfito de sódio

O DNA isolado foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, como descrito por COSTA *et al.*, (2004), que converte citosinas não metiladas em uracilas. Inicialmente, 1 µg do DNA foi desnaturado com 2 µl de NaOH 3 M e aquecimento por 20 min a 50°C em banho seco. O DNA foi, então, tratado com 550 µl de uma solução de bissulfito de sódio (Sigma) 2 M: Hidroquinona (Sigma) 150 mM durante 3 horas a 70°C. Posteriormente o DNA foi purificado e precipitado com 75 µl de acetato de amônio 5 M, 350 µl de etanol 100% gelado e 1 µl de glicogênio (20 µg/µl) a

-20°C. Após 16 horas, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 14000 rpm e o precipitado obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada como anteriormente e o DNA precipitado foi então ressuspendido em Tris 10 mM e EDTA 1mM.

3.9.3 Sequenciamento

Após o tratamento, o DNA foi submetido a uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para as regiões de interesse: o promotor do gene *Irfng* e a região regulatória CNS1 murinos. Então os *amplicons* resultantes foram clonados em plasmídeos pGEM utilizando o *pGEM[®]-T Easy Vector Systems* (Promega) conforme as instruções do fabricante. Após a ligação, os vetores contendo a região de interesse foram eletroporados em bactérias *E. coli* competentes da linhagem XL1-Blue (2,5 Kv, 200Ω Low range/500Ω High range, 25 µF), e pelo menos 10 colônias foram selecionadas em placas de meio LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina (100 µg/ml), X-Gal e IPTG. Os plasmídeos foram purificados de culturas de 3 ml das bactérias transformadas, utilizando kit de mini-prep (*GFX[™] Micro Plasmid Prep Kit*, GE Healthcare). A presença do inserto foi confirmada por digestão com enzimas de restrição específicas (enzima *EcoRI*). O sequenciamento dos clones foi feito com o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

3.9.4 Sequências analisadas

As sequências analisadas estão representadas abaixo e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão na Tabela 3.1.

1) Promotor de IFN-γ

```
CCTTGCTTTTCTGGTCATTTGCAAGAAAAGTTTGAAAAGGCTTCCCCCATTTGCATGGTTTGAGAAGCCCA  
AGAGTTTCCTCATGGTTTGAGAAGCCCAAGAGTTTCTTTTATTTCAGCCGTCCCCAACCACAAAACAAAGG  
CTCCCTGTGCTGTGCTCTGTGGATGAGAAATTCACATTACAAGGGCAAAAAGGGGAGACGTA AAAAGCAA  
TTTCCAGCCCCACCCCAAATGGTGTGAAGTAAAAGTGCTTTTCAGAGAATCCCACAAGAATGGCACAGGT  
GGGCACAGCGGGGCTGTCTCATCGTCAGAGAGCCCAAGGAGTCAAAGGAAACTCTAACATGCCACAAAA  
CCATAGCTGTAATGCAAAGTAACTTAGCTCCCCCACCTATCTGTCACCATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAC  
CAAAAAAAAAACTTGTGAAAATACGTAATCCCGAGGAGCCTTCGATCAGGTATAAACTGGAAGCCAGAGA  
GGTGCAGGCTATAGCTGCCATCGGCTGACCTAGAGAAGACACATCAGCTGATCCTTTGGACCCTCTGACT  
TGAGACAGAAGTTCTGGGCTTCTCCTCCTGCGCCTAGCTCTGAGACAATGAACTACACACTGCATCT
```

2) Região regulatória CNS1

TTTTAATTTATGGGATAAATGAGTTA **CG**TGG **CG**GGGAAAGTTTGAGTT **CG**TGTGGATTTTTATTTTTTAC **CG**TT
ATGATTTTTTT **CG**TAGGTTTAGTTTTTATGATGTTAGGAGTTTTAGGAGTTTAATTA **CG**TGGGGGGTTTGGAT
TTAGTATTTATTTATATTGAGTGGAAAGAAATTTGTTTGAA **CG**GGTGGAGGAGGTAATA **CGCG****CG**GGTTGTTGA
TGTAGGGGAAAAG **CG**TAATTAGGATGTAGTTTTTGTTTTATAGAGGAT **CG**ATTTGTTTAGAGT **CG**GGTTTATA
GAGATATTGTTGAAATTTTTTTGTTATATTTATTATTAGTTTTTAGAAAAGAAATTTTGAATTGAAAGGAAAA
AGAAAGTT **CG**TAGTTTTTTTTTTTTTTAGTAATGTAATTATATTTTTGGTTTTTGGTGGTTTTGTTA **CG**GGTTT
TGAAGGATATTATGGTGG **CG**ATTGATTTTGTAGTTTTATTATTGGTTAGATTAG **CG**AGGTGTGAAATTTTTAG
TTTGTATGTATAATAGAAAGTGTTTTATAGGTAG **CG**TATAGAGAGATTTTTTTGTGATATTAATGAGATAGGA
AAAGTTTAGAAAAGGATGTGTTATTGGGGTGATAGTATTTTAAATTAGAGATTTTGTGTTTTTTAAGAGGAAAT
TTAAGATGGTTTTT

Nestas sequências os sítios CpG estão realçados em amarelo. A sequência em vermelho representa o início da região transcrita do gene *lfng*.

3.10 Ensaio de Transativação

Para a transfecção de células Jurkat com os plasmídeos de interesse, 6×10^6 células foram eletroporadas (950 μ F e 250 mV) em cubetas de 0,4 cm (Gene Pulser Cuvette, Bio-Rad) em um volume final de 600 μ l de meio DMEM sem soro fetal bovino, com 2 μ g de cada um dos vetores indicados fusionados ao gene repórter de firefly luciferase: pGL3-IFN γ 108 e pGL3-IFN γ 39 (cedidos pelo Dr. Christopher Wilson) (SWEETSER *et al.*, 1998); e 0,2 μ g do plasmídeo de renilla (pRL-TK, Promega) para normalização. Após a eletroporação, as células foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e depois avolumadas para 8 ml de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e plaqueadas em placas de 6 poços. Passadas 24 horas, as células foram estimuladas ou não com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS 1x e lisadas com 50 μ l do tampão de lise *Passive lysis buffer* (Promega), por 15 minutos a temperatura ambiente. 20 μ l deste extrato foram utilizados para leitura de luciferase (luminômetro VeritasTM Microplate Luminometer, Turner Biosystems) utilizando o *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) como recomendado pelo fabricante. A atividade de luciferase foi expressa em unidade relativas de luz (RLU) e normalizada pela expressão de luciferase de Renilla.

3.11 Soluções e tampões utilizados

3.11.1 DMEM suplementado

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO_3 (40 mM), NaH_2PO_4 (1 mM), estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (100.000 U), solução de aminoácidos MEM não-essenciais e essenciais 1x, piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), solução de vitaminas MEM 1x, HEPES (10 mM) e β -mercaptoetanol (55 μM) (todos fornecidos pela Invitrogen).

3.11.2 Soluções para ELISA

- “Coating buffer” – Carbonato 0,1 M. Essa solução foi utilizada para ligação do anticorpo primário à placa. Para preparação utilizou-se 0,42 g de NaHCO_3 e 0,178 g de Na_2CO_3 . Avolumou-se com água miliQ para 50 ml e o pH foi ajustado para 9,5.
- “Assay diluent” – PBS 1x 10% SFB. Esta solução foi utilizada para bloqueio após ligação do anticorpo primário à placa; nas diluições das amostras e do anticorpo secundário.
- “Wash Buffer” – PBS 1x 0,5% Tween[®] 20. Esta solução foi utilizada para as lavagens.

3.11.3 Soluções para Ensaio de Hipersensibilidade a DNase I

- LB- (Tampão de ressuspensão): 50 ml final contendo, 3 ml KCl 1 M; 150 μl NaCl 5 M; 250 μl MgCl_2 1 M; 0,5 ml Tris 1 M pH7,4; 6,80 ml sacarose 2,2 M; 50 μl EGTA 0,1 M;
- LB+ (Tampão de lise): LB- contendo 0.1% NP-40.
- “Stop Solution”: 10 ml final contendo 450 μl de SDS 10%; 90 μl de EDTA 0,5 M; 900 μl de Acetato de Sódio 3 M pH7,2; proteinase K (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.11.4 Back Extraction Buffer (BEB)

Este tampão foi utilizado para extração de DNA e foi preparado com: tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 50 mM e Tris 1 M pH 8.

3.11.5 Anticorpos

- Anticorpos monoclonais -CD4 (GK1.5) , -CD8 (53-6.7), -CD62L (MEL-14), -CD44 (IM7); -IFN- γ (XMG1.2) ; -IL-4 (11B11) (eBioscience) foram utilizados na citometria.
- Anticorpo Anti-CD28 (37.51) (Pharmigen) foi utilizado nas culturas celulares.
- Anticorpo Anti-CD3 (2C11) foi obtido a partir do hibridoma 2C11 e utilizado nas culturas celulares.
- Anticorpo Anti-IFN- γ foi obtido a partir do hibridoma XMG1.2 e utilizado na diferenciação de células T CD4 em células Th1.
- Anticorpo Anti-IL-4 foi obtido a partir do hibridoma 11B11 e utilizado na diferenciação de células T CD4 em células Th2.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão e produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8.

Os linfócitos T utilizados em todos os experimentos deste trabalho foram isolados de linfonodos de camundongos C57BL/6 entre 8 a 12 semanas de idade através de imunopurificação negativa para obtenção de populações CD4⁺ ou CD8⁺. A análise da pureza das populações obtidas foi feita através de citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 4.1, após a purificação, há um enriquecimento da população de linfócitos T CD4 ou T CD8 de forma que obtivemos em todos os experimentos, ao menos 95% de células CD4⁺ ou CD8⁺ após a purificação.

Para caracterização do perfil de ativação das populações obtidas, avaliamos também o perfil de expressão das moléculas de superfície CD62L (L-selectina) e CD44. O tráfego de linfócitos T pelos linfonodos e sítios de infecção é dependente da expressão diferencial de moléculas de adesão. A molécula CD62L medeia a adesão dos linfócitos T as células endoteliais das vênulas de endotélio alto, localizadas nos linfonodos e placas de Peyer, sendo um importante receptor de *homing* que direciona os linfócitos T primários para os linfonodos periféricos, onde as respostas imunes adaptativas são iniciadas.

Em nossas análises, podemos observar que a maioria da população, tanto em células CD4⁺ como em CD8⁺, é CD62L^{hi}/CD44^{lo}, perfil característico de células T não-ativadas (Figura 4.1B).

Após ativação, linfócitos T apresentam uma redução na expressão de CD62L e um aumento na expressão da glicoproteína CD44. Essa alteração na expressão de moléculas de adesão é essencial para a migração das células T ativadas dos linfonodos, para os tecidos periféricos infectados. Em nossas análises a população CD62L^{lo}/CD44^{hi} é muito reduzida, sugerindo que as células T não estão ativadas nos animais. Dessa forma as populações de células T CD4 e T CD8 purificadas, utilizadas neste projeto, estão semelhantemente enriquecidas em células T *naive*.

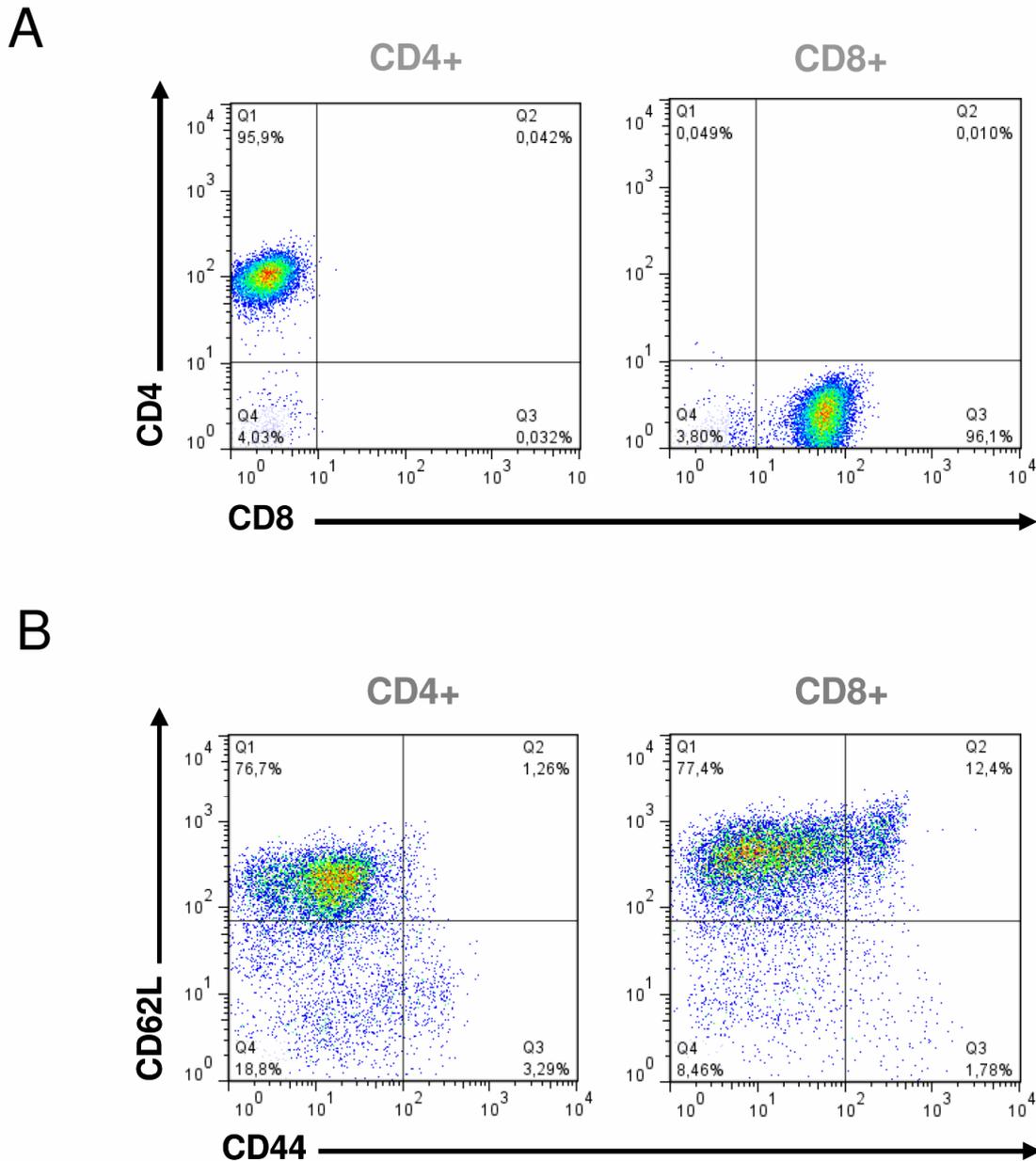


Figura 4.1. Purificação de linfócitos T CD4 e CD8. As células T CD4 e T CD8 foram obtidas a partir dos linfonodos cervicais superficiais, braquiais, axilares, e inguinais de camundongos C57/BL6, com 8-12 semanas de idade, através de imunopurificação negativa. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da purificação. Os percentuais obtidos para cada uma das marcações estão indicados no interior dos quadrantes. **B.** As células T CD4 e T CD8 foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD62L e anti-CD44 e analisadas quanto ao perfil de ativação por citometria de fluxo. Os percentuais obtidos para cada uma das marcações estão indicados no interior dos quadrantes.

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que após o estímulo primário, as principais células que produzem IFN- γ são as T CD8 e não as T CD4 (TEIXEIRA *et al*, 2005). A fim de corroborarmos estes achados, comparamos a produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8 submetidas a um estímulo de PMA e ionomicina por 6 horas. De fato, quando células T CD4 e T CD8 recém isoladas são submetidas a um mesmo estímulo, observamos através da marcação intracelular para IFN- γ , que a população de células T CD8 IFN- γ^+ representa 16,3% da população total, enquanto em células T CD4 a população produtora desta citocina não chega a 1% (Figura 4.2).

Células T CD4 podem diferenciar-se em células Th1, produtoras de altos níveis de IFN- γ , e também em células Th2, que pouco produzem esta citocina. Com isso, resolvemos comparar a produção de IFN- γ observada em células T CD4 e CD8 recém isoladas com essas células T CD4 efectoras, frente a um mesmo estímulo.

As células Th1 e Th2 utilizadas neste trabalho foram obtidas através da diferenciação *in vitro* de células T CD4 *naive*, na presença de citocinas polarizantes e anticorpos bloqueadores específicos para cada subpopulação. O esquema de diferenciação está representado na Figura 4.3A. Inicialmente as células T CD4, obtidas como descrito anteriormente, foram ativadas *in vitro* com um estímulo policlonal de anti-CD3 e anti-CD28 em condições polarizantes para Th1 ou Th2. Após 48 horas da ativação inicial, as células foram expandidas por seis dias, na presença de IL-2. A confirmação da polarização das culturas foi realizada através de citometria de fluxo pela marcação intracelular das citocinas IFN- γ e IL-4 produzidas por estas células. Conforme esperado, a polarização para um fenótipo Th1 levou a uma maior porcentagem de células produtoras de IFN- γ (37,2%), e pouquíssimas células produzindo IL-4 (0,14%). Por outro lado, as células polarizadas para um fenótipo Th2 produziam principalmente IL-4 (31,7%), e uma pequena população produzia IFN- γ (1,02%) (Figura 4.3B).

Também avaliamos a quantidade de IFN- γ e IL-4 produzidas por células Th1 e Th2 através de ELISA. O resultado de um dos experimentos pode ser visualizado na Figura 4.3C. Mais uma vez, as células Th1 produzem altos níveis de IFN- γ de forma crescente após 24 e 48 horas de re-estímulo com anti-CD3. Além disso, os níveis de IL-4 produzidos são baixíssimos. De forma oposta, células Th2 apresentaram uma produção de altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ .

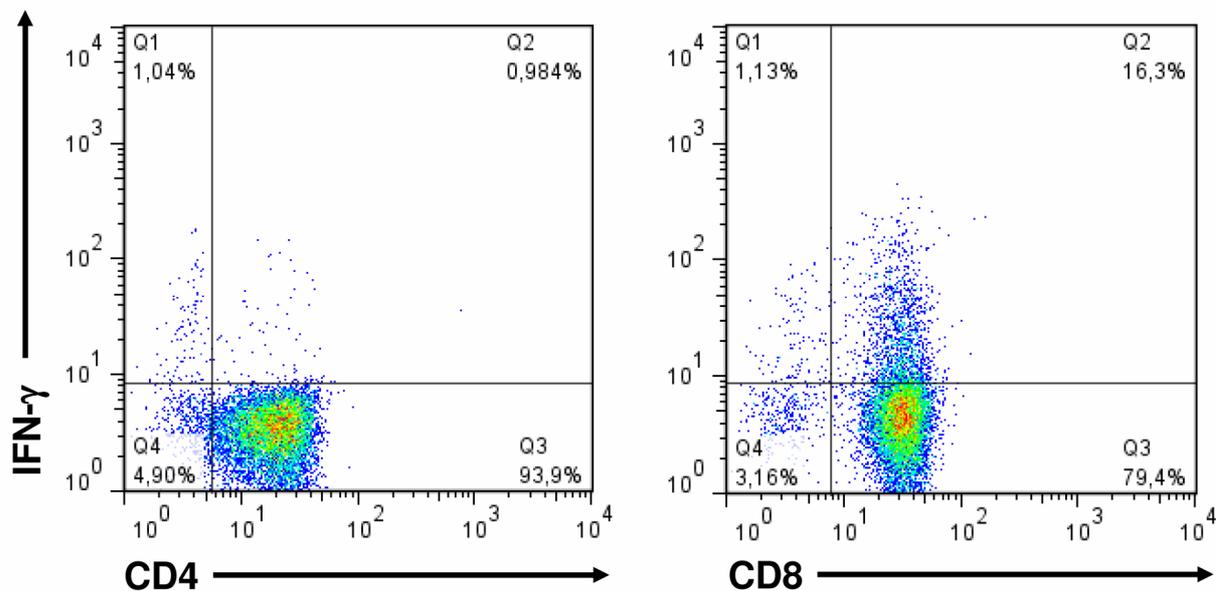


Figura 4.2. Produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8. A. As células T CD4 e T CD8 foram obtidas como descrito na Figura 4.1. e então estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 horas, na presença de Brefeldina nas 2 horas finais. Após ativação as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 ou anti-CD8 e a produção de IFN- γ foi avaliada por marcação intracelular com anti-IFN- γ . Os percentuais obtidos para cada uma das marcações estão indicados no interior dos quadrantes. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

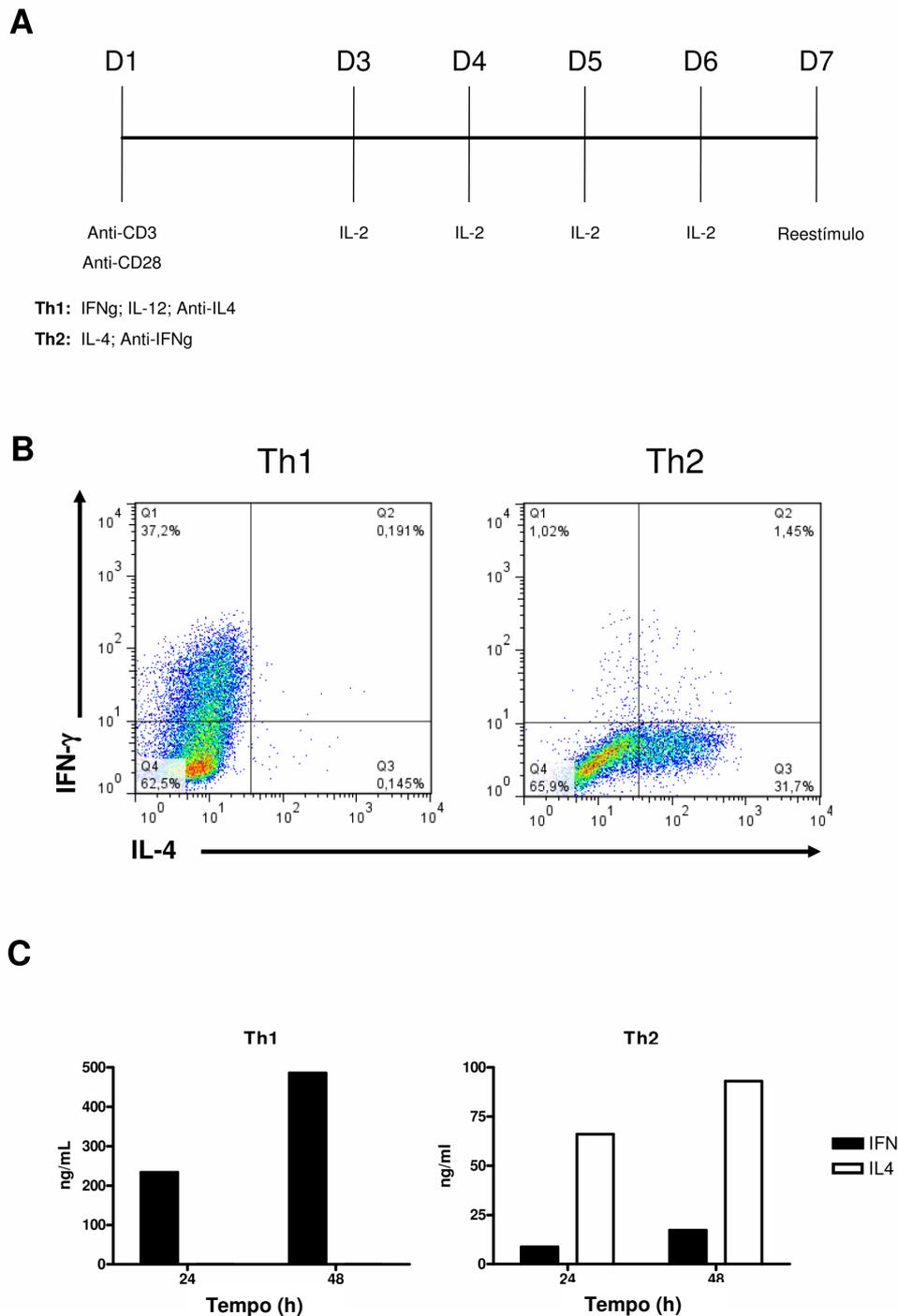


Figura 4.3. Modelo experimental de diferenciação Th1/Th2. **A.** Esquema do modelo experimental de diferenciação Th1/Th2 *in vitro*. As células T CD4 foram obtidas conforme descrito na Figura 4.1 Células T CD4 recém-isoladas foram diferenciadas em Th1/Th2 durante seis dias, na presença das citocinas polarizantes e anticorpo bloqueador específicos para cada perfil efetor. Essas células foram estimuladas no primeiro dia com anti-CD3 e anti-CD28 e após 48 horas as células foram expandidas com adição de IL-2 recombinante a cada 24 horas. **B.** Para confirmar a polarização, as células Th1/Th2 obtidas ao final da diferenciação foram estimuladas com PMA e ionomicina por 6 horas, na presença de Brefeldina nas 2 horas finais. Após ativação a produção de IFN- γ e IL-4 foi avaliada por marcação intracelular. Os percentuais obtidos para cada uma das marcações estão indicados no interior dos quadrantes. **C.** Os níveis proteicos de IFN- γ e IL-4 também foram avaliados através de ELISA do sobrenadante livre de células, de culturas de células Th1 e Th2, estimuladas com anti-CD3 por 24 e 48 horas. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Juntos nossos dados mostram que os perfis efetores Th1 e Th2 estão produzindo suas citocinas específicas, IFN- γ e IL-4 respectivamente, o que confirma nosso modelo de diferenciação. É importante ressaltar que, além disso, as células Th1 assim obtidas produzem baixíssimos níveis de IL-4, enquanto células Th2 pouco produzem IFN- γ quando comparadas às células Th1, o que corrobora ainda mais nosso modelo uma vez que linfócitos Th1 e Th2 reprimem a diferenciação do fenótipo oposto através de mecanismos de *feedback* negativo.

Estas células diferenciadas, juntamente às células T CD4 e T CD8 recém isoladas foram usadas em todos os experimentos que se seguem. Para caracterizarmos a expressão de IFN- γ por linfócitos T CD4, T CD8 e T CD4 diferenciados em Th1 e Th2 em nosso modelo, comparamos a produção desta citocina por esses diferentes tipos celulares através de ELISA.

Nossa análise da proteína IFN- γ nos sobrenadantes de culturas dessas células, 24, 48 e 72 horas após ativação com anti-CD3, mostrou que os linfócitos T CD4 só produzem quantidades significativas desta citocina após a diferenciação para um perfil Th1. Por outro lado, células Th2 produzem níveis baixíssimo de IFN- γ , comparáveis ao observado em células T CD4 *naive*. Corroborando os dados obtidos na marcação intracelular, células T CD8 produzem níveis maiores de IFN- γ do que células T CD4, e de forma semelhante ao observado em células Th1, essa produção é crescente ao longo do tempo de ativação (Figura 4.4), apesar dos níveis produzidos serem bastante inferiores ao observado em células Th1: 72 horas após o estímulo com anti-CD3 a produção de IFN- γ por células Th1 chega a 500 ng/ml, enquanto células T CD8 não alcançam 200 ng/ml.

Se por um lado somente o estímulo via TCR já é suficiente para induzir a produção de IFN- γ por células T CD8, o mesmo não acontece em células T CD4, onde a diferenciação para Th1, é necessária para tornar essas células competentes para produção de IFN- γ frente ao mesmo estímulo.

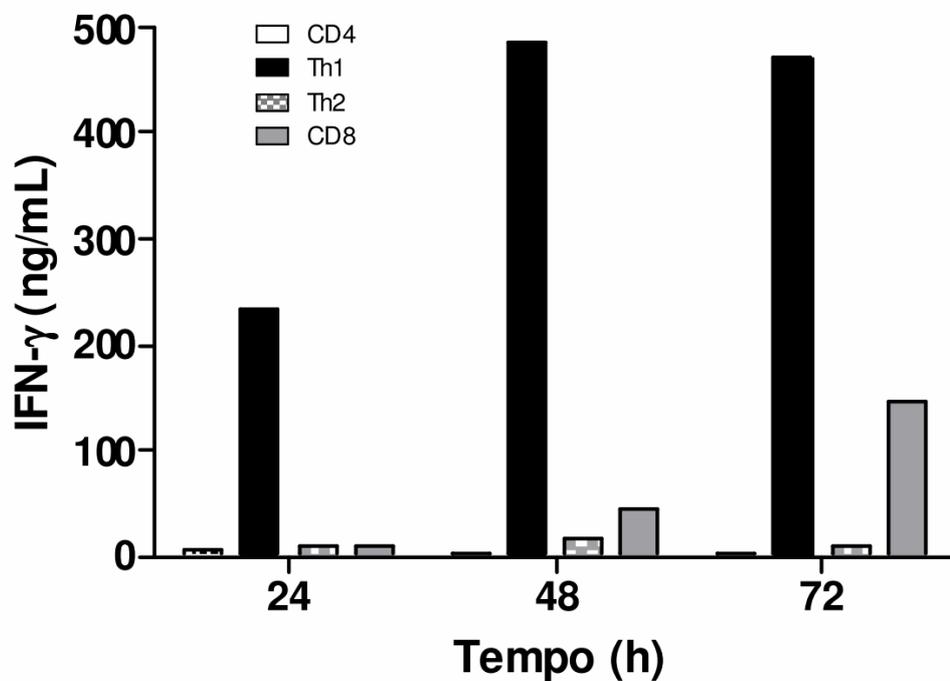


Figura 4.4. Produção de IFN- γ por células T. As células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 obtidas conforme descrito nas Figura 4.1 e 4.3 foram estimuladas com anti-CD3 e após 24 e 48 horas, o sobrenadante das culturas celulares foi coletado e utilizado para detecção de IFN- γ por ELISA. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

A fim de avaliarmos a dinâmica desta produção diferencial de IFN- γ por linfócitos T CD4 e T CD8, comparamos a cinética da transcrição do gene *Irfng* entre as células T CD4, T CD8 e Th1 utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real. Para tanto analisamos uma cinética com diferentes tempos (0, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas) após a ativação das células com anti-CD3. Os valores obtidos foram normalizados com a detecção do transcrito do gene constitutivo *Hprt* e comparados ao valor obtido em células T CD4 não-estimuladas, pelo método de $2^{-\Delta\Delta C(t)}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.5.

Analisando a estimativa do mRNA de *Irfng* nestes tipos celulares podemos observar uma semelhança entre a cinética de células T CD8 e Th1. Estas apresentam uma produção mais rápida (por volta de 3 horas pós-ativação com anti-CD3) e crescente durante os tempos analisados. Porém a produção por células Th1 é muito maior quando comparada às células T CD8: quando analisamos o pico máximo de detecção em células T CD8 (3h) podemos observar que a produção destas células é aumentada cerca de 18 vezes em relação a T CD4 não-estimuladas, enquanto o aumento observado no mesmo tempo em células Th1 é de cerca de 260 vezes. Já as células T CD4 *naive* pouco produzem o transcrito em tempos de ativação curtos, sem aumento significativo mesmo após 8 horas de ativação. Resultados complementares do nosso grupo mostraram que a detecção do transcrito de *Irfng* nestas células só é observada após dias de ativação. Como a transcrição de *Irfng* é refletida nos níveis protéicos avaliados anteriormente, sugere-se que a regulação da expressão de IFN- γ por linfócitos T ocorra, ao menos em parte, ao nível transcricional.

Sabe-se que a expressão célula-específica de genes envolve não somente a ação de diferentes fatores de transcrição, como também alterações na estrutura da cromatina de regiões regulatórias do gene em questão, o que torna o DNA acessível à transcrição. Uma vez que frente ao mesmo estímulo, que culmina com a ativação das mesmas vias de sinalização e fatores de transcrição (tais como NFAT, AP-1 e NF κ B), células T CD4 e T CD8 apresentam uma produção de *Irfng* tão diferente, sugere-se que o *locus* de *Irfng* em células T CD4 esteja inicialmente inacessível para a maquinaria de transcrição, semelhantemente ao observado em células Th2, e modificações na cromatina são necessárias para haver um aumento significativo na transcrição de *Irfng* nestas células. Por outro lado, a transcrição rápida por células T CD8 e Th1 pode indicar que nestes tipos celulares a cromatina no *locus Irfng* está “aberta”, acessível aos fatores de transcrição.

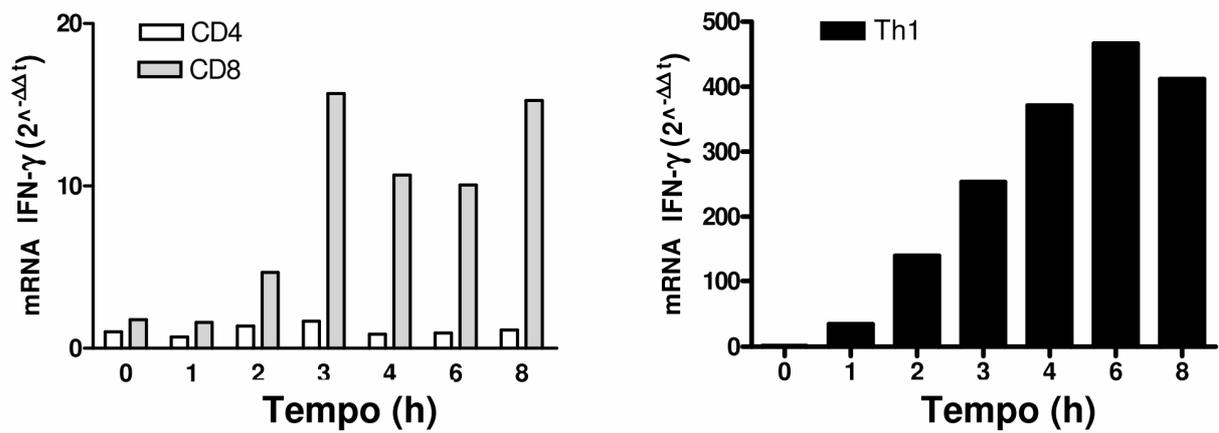


Figura 4.5. Detecção do mRNA de *Irfg* em células T CD4, T CD8 e Th1. Células T CD4, T CD8 e Th1 foram obtidas conforme descrito nas Figuras 4.1 e 4.3. Estas células foram estimuladas ou não, com anti-CD3 por 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas e então o mRNA dos diferentes tempos após estímulo foi extraído, submetido a síntese de cDNA e este foi utilizado na PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes *Irfg* e *Hprt*. O gene *Hprt* foi utilizado como normalizador. Todos os valores foram comparados ao valor obtido com células T CD4 não-estimuladas. Dado representativo de 3 experimentos independentes.

4.2 Mapeamento de regiões hipersensíveis a DNase I no locus de *Ifng* em células T CD4 e T CD8.

O contexto epigenético no qual os fatores de transcrição atuam é dependente do posicionamento e compactação de nucleossomos, incorporação de variantes de histonas no nucleossomo, modificações pós-traducionais de histonas e o estado de metilação do DNA.

A ativação de genes com expressão restrita a tecidos ou tipos celulares durante a diferenciação celular ocorre primariamente em relação ao acesso à cromatina, resultando na formação de regiões transcricionalmente competentes, caracterizadas por um aumento de sensibilidade à digestão pela enzima DNase I, e assim denominadas regiões hipersensíveis a DNase I. Esses sítios hipersensíveis a DNase I geralmente localizam-se em sequências regulatórias, como os promotores gênicos e *enhancers* (BELL *et al.*, 2011) e caracterizam-se por uma menor ocupação de nucleossomos (MITO; HENIKOFF; HENIKOFF, 2007). A técnica de DNase I baseia-se na premissa que interações DNA-proteína, como o empacotamento em nucleossomos, protegem o DNA da clivagem por nucleases.

Em 1998, Agarwal e Rao, demonstraram pela primeira vez a existência de sítios hipersensíveis a DNase I no promotor e gene de *Ifng* em células D5 (Th1). Trabalhos posteriores contribuíram no mapeamento desses sítios e hoje sabe-se que essas regiões localizam-se no promotor proximal, intron 1 e intron 3 de *Ifng* e foram denominadas HSI, HSII e HSIII respectivamente. Em células D10 (Th2), que são incapazes de produzir IFN- γ após estímulo, o locus de *Ifng* apresentou-se inacessível e nenhum dos sítios hipersensíveis foi identificado.

Para avaliarmos a presença dessas regiões em nosso modelo, comparamos células T CD4 e T CD8 recém isoladas e células Th1 e Th2 utilizando uma metodologia descrita por MCARTHUR *et al* (2001). Neste trabalho eles descrevem uma alternativa para identificação de regiões hipersensíveis ao tratamento com DNase I, diferente da técnica mais usual na qual a região de estudo é hibridizada a uma sonda radioativa flanqueadora e observa-se por eletroforese, a geração de fragmentos marcados de menor tamanho conforme há a digestão com DNase I.

Esta nova abordagem envolve a detecção das regiões de interesse através de PCR em tempo real, utilizando oligonucleotídeos específicos que flanqueiem essas regiões. Quando a cromatina da região de interesse está aberta e acessível, há a clivagem pela enzima DNase I e conseqüentemente não haverá a amplificação

dessa região na PCR. Ou seja, se a região de interesse for sensível à digestão, haverá uma menor detecção do *amplicon* conforme a concentração da enzima aumente.

Utilizamos essa abordagem para identificar regiões de diferente acesso à cromatina no gene *Ifng* em nosso modelo, optando em analisar não somente as regiões descritas no trabalho de Agarwal e Rao (1998), mas também as regiões flangeadoras, imediatamente *upstream* e *downstream*. Para tanto, os núcleos de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram extraídos e submetidos ou não à digestão com concentrações crescentes de DNase I (0-20 U/ml). Foram analisadas nove regiões, cada uma possuindo entre 225 e 250 pb: quatro regiões localizadas no promotor (HSI-1; HSI-3; HSI-4 e HSI-5); três no primeiro intron (HSII-1; HSII-2; HSII-3) e duas no intron 3 (HSIII-1; HSIII-2). Os resultados de nossas análises estão representados nas Figuras 4.6; 4.7 e 4.8. Observamos que em regiões já descritas como hipersensíveis (HSI-4; HSII-2; HSIII-2) a detecção destas regiões em células Th1 diminui conforme se aumenta a concentração de DNase I, chegando a uma diminuição de cerca de 35-45% nas maiores concentrações utilizadas.

Inicialmente analisamos regiões compreendidas no promotor de *Ifng* (Figura 4.6). A região identificada no trabalho de Agarwal e Rao (1998) foi aqui denominada de HSI-4. Interessantemente, esta região parece estar acessível tanto em células Th1 como também em células T CD8 *naive*. Como é possível observar, conforme os núcleos dessas células são submetidos a maiores concentrações de DNase I, há uma menor detecção da região amplificada, sugerindo que da mesma forma que células Th1, células T CD8 também apresentem a cromatina nessa região acessível. Por outro lado, em células T CD4 *naive* e células Th2 esta região aparenta estar inacessível: maiores concentrações de digestão com DNase I pouco alteram a detecção da região de interesse no PCR em Tempo Real, comparado ao observado em células T CD8 e Th1. Estes resultados mostram que esta região associa o acesso à cromatina à expressão de IFN- γ , sugerindo que possa desempenhar um importante papel funcional na expressão diferencial de *Ifng* em células T CD4 e T CD8. A região HSI-4 localiza-se no promotor proximal de *Ifng* e inclui a sequência até aproximadamente -250 pb.

A análise das regiões flangeadoras desta região HSI-4, mostrou que de maneira geral essas regiões apresentam a cromatina aberta tanto em células Th1 como também em células Th2 (Figura 4.6). A região HSI-3 está localizada

imediatamente *upstream* a HSI-4, e a 200 pb *upstream* de HSI-3, localiza-se a região HSI-1.

A região HSI-5 está imediatamente *downstream* a HSI-4. Particularmente as regiões HSI-3 e HSI-5, parecem estar mais sensíveis também em células T CD4, mas de forma menos intensa quando comparado ao observado em células T efetoras. Em células T CD8 *naive* a cromatina nessas regiões parece estar inacessível, semelhantemente ao observado na região HSI-1 tanto em células T CD4 como T CD8. Esses dados sugerem que essas regiões não estejam envolvidas na expressão diferencial de *Ifng*, uma vez que estão acessíveis tanto em células Th1 como também em células Th2. Essa maior acessibilidade independentemente da transcrição de *Ifng*, pode sugerir que as regiões HSI-3 e HSI-5 possam estar envolvidas na organização estrutural do *locus Ifng* em células T CD4, da mesma forma que a região HSI-1 pode ser importante na estruturação de *Ifng* após a diferenciação de células T CD4 para um fenótipo efector.

Analizamos também a presença de regiões hipersensíveis a DNase I nos introns 1 e 3 de *Ifng*. Sabe-se que estes introns apresentam funções regulatórias na expressão de *Ifng*, atuando como *enhancer* da expressão desta citocina *in vitro* (SOUTTO *et al.*, 2002).

Conforme é possível observar na Figura 4.7, a região hipersensível HSII-2, anteriormente identificada por Agarwal e Rao (1998), também se encontra sensível a digestão com DNase I em células Th2 e não em células T CD4 e T CD8. A sequência imediatamente *upstream* (HSII-1) a esta parece estar acessível de maneira semelhante e geral em células T CD4 e a sequência imediatamente *downstream* a HSII-2 (HSII-3) apresentou-se sensível à digestão em células Th1 e Th2, enquanto em células T CD4 e T CD8 há apenas uma pequena diminuição na detecção da região. É importante ressaltar que a acessibilidade em células Th1 nestas duas regiões parece ser menor do que o observado na região hipersensível HSII-2 e nas regiões do promotor.

A análise das regiões compreendidas no intron 3 de *Ifng*, evidenciou a presença da região hipersensível a DNase I (HSIII-2) também em células T *naive*, CD8 e CD4, além do observado anteriormente em células Th1 (Figura 4.8). Em células Th2 maiores concentrações de digestão com DNase I pouco alteram a detecção da região de interesse no PCR em tempo real. A região *upstream* a esta (HSIII-1) parece estar acessível em células T, tanto T CD4 *naive* como T CD4 efetoras, mas de forma menos intensa em células T CD4 *naive*.

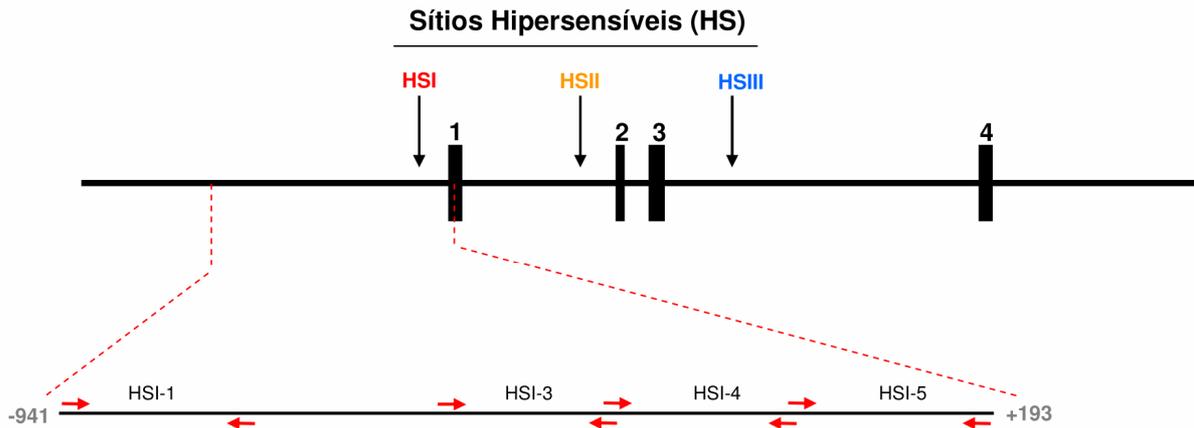
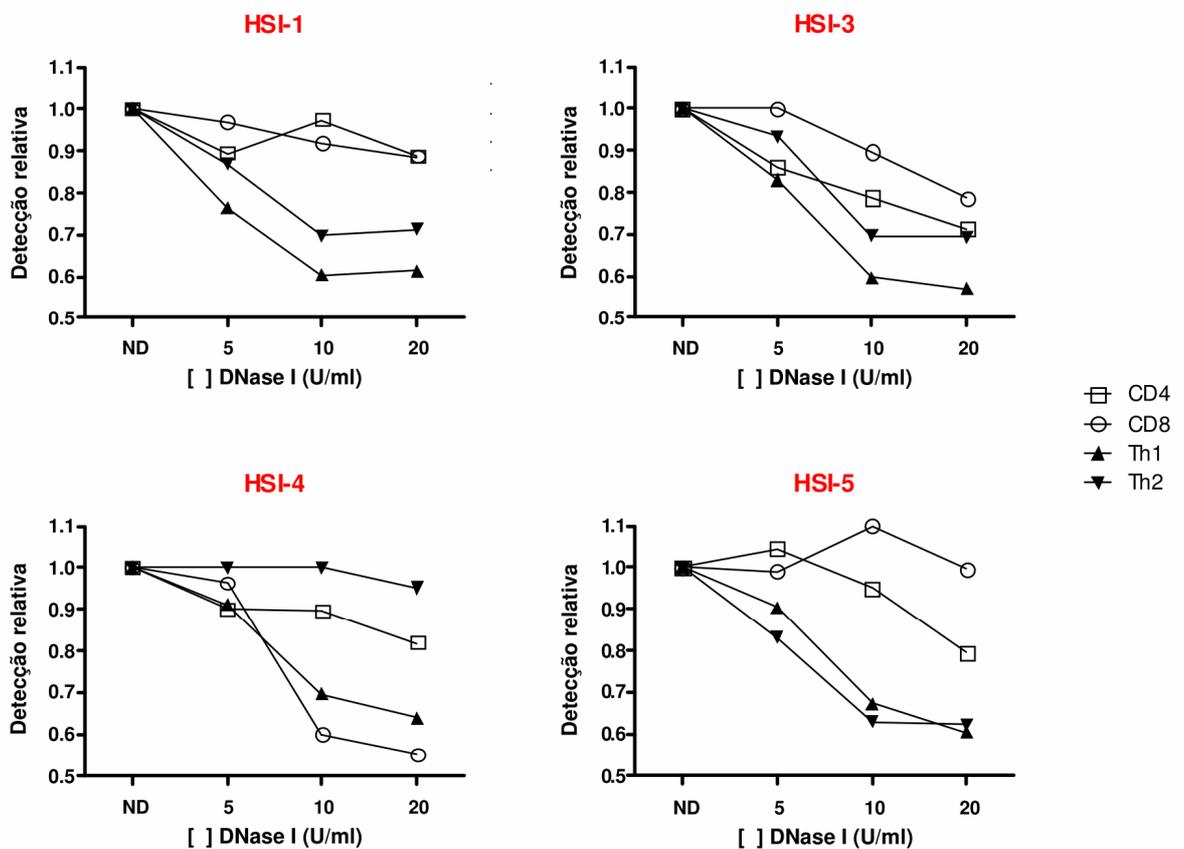
A**B**

Figura 4.6. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no promotor de *Ifng*. Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas conforme descrito nas Figuras 4.1 e 4.3. **A.** Esquema do locus do gene *Ifng* murino. Os quatro exons estão representados como caixas pretas e destacamos as regiões do promotor analisadas: HSI-1; HSI-3; HSI-4 e HSI-5. **B.** Os núcleos de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não estimuladas, foram extraídos e incubados com concentrações crescentes de DNase I (0-20 U/ml). O DNA genômico foi então extraído e digerido por completo com *Bgl*II e a análise das regiões de interesse através de PCR em Tempo Real pode ser visualizada nos gráficos. A detecção na amostra não-digerida foi considerada como 1 e os valores obtidos nas amostras digeridas com DNase I foram comparados com o valor obtido na amostra não-digerida de cada região. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

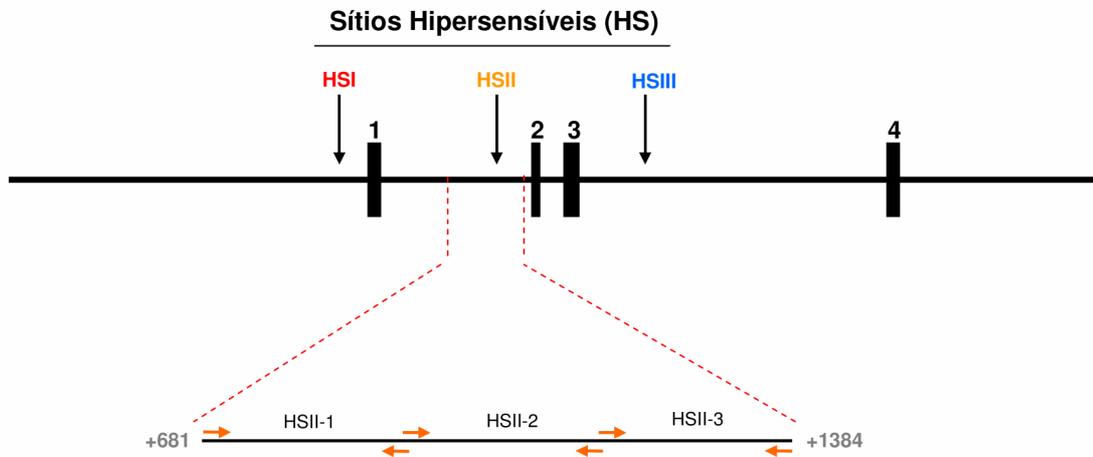
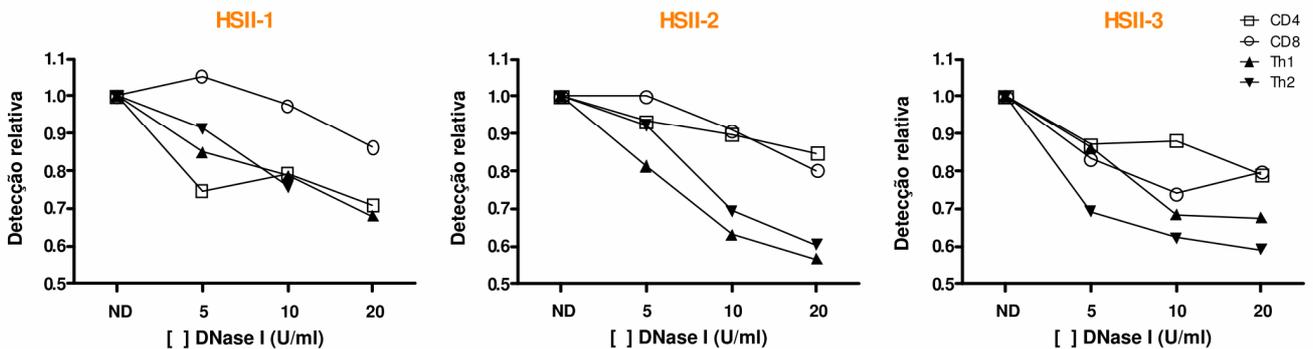
A**B**

Figura 4.7. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no intron 1 de *Ifng*. Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas conforme descrito nas Figuras 4.1 e 4.3. **A.** Esquema do locus do gene *Ifng* murino. Os quatro exons estão representados como caixas pretas e destacamos as regiões do intron 1 analisadas: HSII-1; HSII-2 e HSII-3. **B.** Os núcleos de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não estimuladas, foram extraídos e incubados com concentrações crescentes de DNase I (0-20 U/ml). O DNA genômico foi então extraído e digerido por completo com *Bgl*II e a análise das regiões de interesse através de PCR em Tempo Real pode ser visualizada nos gráficos. A detecção na amostra não-digerida foi considerada como 1 e os valores obtidos nas amostras digeridas com DNase I foram comparados com o valor obtido na amostra não-digerida de cada região. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

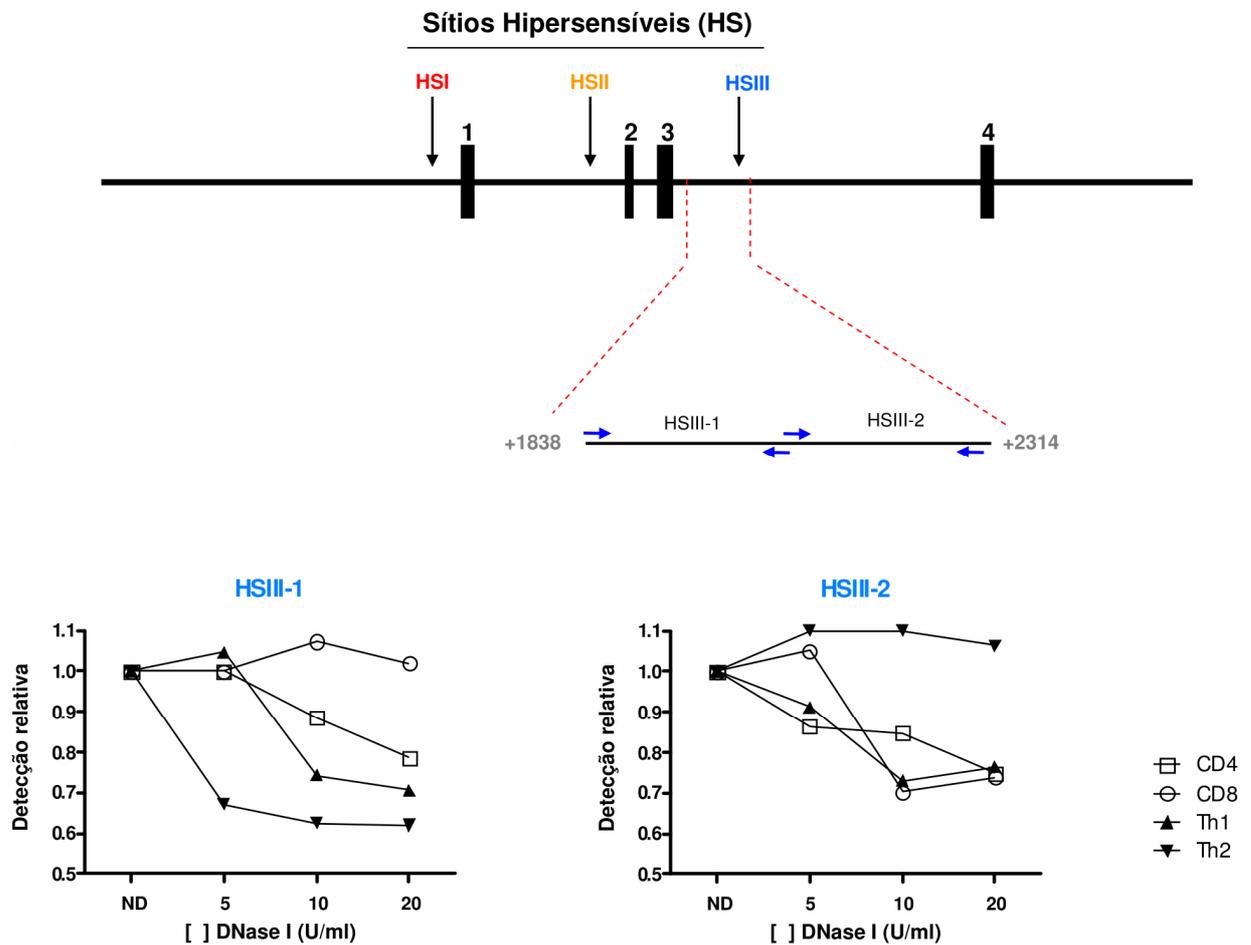
A

Figura 4.8. Análise de regiões hipersensíveis a DNase I no intron 3 de *Ifng*. Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas conforme descrito nas Figuras 4.1 e 4.3. **A.** Esquema do locus do gene *Ifng* murino. Os quatro exons estão representados como caixas pretas e destacamos as regiões do intron 3 analisadas: HSIII-1 e HSIII-2. **B.** Os núcleos de células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não estimuladas, foram extraídos e incubados com concentrações crescentes de DNase I (0-20 U/ml). O DNA genômico foi então extraído e digerido por completo com *Bgl*II e a análise das regiões de interesse através de PCR em Tempo Real pode ser visualizada nos gráficos. A detecção na amostra não-digerida foi considerada como 1 e os valores obtidos nas amostras digeridas com DNase I foram comparados com o valor obtido na amostra não-digerida de cada região. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Esses dados sugerem que estas regiões compreendidas no primeiro e terceiro intron do gene *Ifng* não parecem estar envolvidas na expressão diferencial de *Ifng* por estas células e mais uma vez, podem estar envolvidas na organização do *locus Ifng*, sendo importantes para estabelecerem estruturas que permitam a interação do *locus Ifng* com outros *loci*, por exemplo.

Nossos resultados confirmaram a presença das regiões hipersensíveis descritas por Agarwal e Rao (1998) em células Th1: HSI-4 (promotor); HSII-2 (intron 1) e HSIII-2 (intron 3). Esses dados confirmam a hipótese que em células Th1, produtoras de grandes níveis de IFN- γ , o *locus* de *Ifng* esteja acessível à maquinaria de transcrição. No entanto diferentemente do observado por eles, em células Th2 também observamos uma hipersensibilidade a DNase I na região HSII-2. Nossas análises também mostraram diversos sítios hipersensíveis a DNase I presentes no *locus Ifng*, independente do tipo celular e produção de IFN- γ . O real papel dessas regiões na organização do gene *Ifng* deve ser mais bem investigado.

Além dessas regiões, uma região em particular mostrou-se bastante interessante para nossa hipótese. A região HSI-4 foi à única região analisada que associou o acesso à cromatina à produção de IFN- γ , apresentando-se hipersensível a digestão com DNase I somente em células Th1 e T CD8, produtoras de altos níveis de IFN- γ . Diferentes fatores influenciam o posicionamento de nucleossomos *in vivo*, incluindo a própria sequência do DNA, a metilação do DNA, variantes de histona e modificações pós-traducionais de histonas além da ação de complexos remodeladores de cromatina (SEGAL; WIDOM, 2009). Nossos resultados sugerem que a cromatina na região HSI-4 esteja “aberta” em células Th1 e T CD8, o que pode ser responsável pela rápida produção de IFN- γ por essas células, diferentemente do observado em células T CD4 e células Th2.

A região HSI-4 destaca-se, então, como uma interessante região para a análise de possíveis modificações epigenéticas diferenciais entre células Th1 e T CD8 de células T CD4 e Th2. Além disso, também torna-se interessante investigar um possível papel funcional desta região na regulação da expressão de *Ifng*. Os próximos passos de nosso trabalho abordam estas questões.

4.3 Análise do estado de metilação do DNA na região promotora do gene *Ifng* em células T CD4 e T CD8.

A fim de avaliarmos se a expressão diferencial de IFN- γ é dependente de modificações epigenéticas, nós analisamos o padrão de metilação dos sítios CpG localizados no promotor de *Ifng*, que compreende a região hipersensível do promotor proximal (HSI-4), e também no primeiro éxon de *Ifng*, em células T CD4, T CD8, Th1 e Th2. A cromatina não metilada é frequentemente associada à cromatina ativa, acessível à transcrição. Dessa forma, seria esperado que a região promotora do gene *Ifng* estivesse metilada em células T CD4 e Th2, e o contrário em células Th1 e T CD8. A região analisada compreende 10 sítios CpG, denominados de acordo com sua distância em relação ao sítio de início de transcrição do gene *Ifng*. Dentre estes sítios, os CpG -212; -198; -178; -58, -50 e -39 estão localizados na região HSI-4.

Além de identificarmos que em células Th1 e T CD8 não estimuladas a cromatina da região promotora (HSI-4) do gene *Ifng* já está aberta e possivelmente acessível para a maquinaria de transcrição, nossos dados de PCR em tempo real mostraram que o primeiro aumento significativo na detecção do transcrito de *Ifng* em células T CD8 acontece em 3 horas após o estímulo primário (Fig 4.5). No mesmo tempo também observamos aumento na detecção do transcrito em células Th1 e nenhuma diferença em células T CD4. Como possivelmente poderíamos encontrar alterações epigenéticas em *Ifng*, diferenciais em células T CD8 e T CD4, optamos por analisar o padrão de metilação do promotor de *Ifng* neste tempo e também em células não-estimuladas. Por outro lado, como em células T CD4 *naive* só observamos um aumento significativo da produção de IFN- γ em tempos bem mais tardios, optamos analisar também a metilação do promotor no tempo de 72 horas após estímulo com anti-CD3. Além disso, também é interessante avaliarmos a metilação em tempos mais tardios porque as modificações epigenéticas devem estar estabilizadas e o fenótipo das células consolidado.

Analisamos o padrão de metilação dos sítios CpG através do sequenciamento do DNA das células após tratamento com bissulfito de sódio, que converte citosinas não-metiladas em uracilas. A frequência de conversão de citosinas em timinas, após o tratamento, foi maior que 98% em sítios não-CpG o que valida nosso sistema. Em dados preliminares, não identificamos diferenças no estado de metilação entre a fita

codificante, que é molde para a transcrição, e a não-codificante, então nos ensaios que seguem, optamos por analisar apenas a fita não-codificante.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.9; 4.10 e 4.11.

Analisando inicialmente o padrão de metilação em células T não-estimuladas (Fig 4.9), podemos observar que o padrão de metilação observado em todos os tipos celulares é semelhante especialmente em células T CD4 e T CD8 *naive*. De maneira geral o promotor do gene *Irfng* está essencialmente hipometilado e os sítios metilados são em sua maioria os localizados na região do gene *Irfng* que é transcrita (sítios +12, +91 e +114). Esses sítios estão metilados de forma consistente em células T CD4, Th1 e Th2. Já em células T CD8 os CpG +12 e +114 apresentaram-se menos metilados: cerca de 46% dos clones não estão metilados no sítio +12 e 55% no sítio +114. Os sítios da região promotora também se apresentaram mais consistentemente não-metilados somente em células T CD8, onde não observamos praticamente nenhum sítio metilado em nenhum clone analisado. Dentre os CpG localizados na região HSI-4, destaco o sítio -58 que apresentou-se metilado em células Th2 e não-metilado em células T CD4 e CD8. Em células Th1 observamos cerca de 45% dos clones não-metilados neste sítio.

Após a ativação destas células com anti-CD3, tanto 3 (Fig 4.10) quanto 72 horas (Fig 4.11), o padrão manteve-se de maneira geral bastante semelhante ao observado no tempo de 0 horas, especialmente em células T CD4 e T CD8 *naive*. Particularmente o CpG -58 já encontra-se demetilado em células Th1 72 horas após estímulo, enquanto mantém-se metilado em células Th2. A demetilação do CpG +114 é ainda mais evidente em células T CD8 estimuladas 72 horas com anti-CD3, onde encontramos cerca de 85% dos clones não-metilados neste sítio.

Analisando o perfil de metilação total dos sítios analisados, é evidente que o percentual de demetilação em células T CD8 é o maior dos tipos celulares analisados, por volta de 80% em todos os tempos, o que reflete a menor metilação dos sítios +12 e +114 nestas células. É importante ressaltar que após o reestímulo podemos observar um aumento nos sítios CpG metilados, somente em células Th2, corroborando o fato de *Irfng* estar silenciado nessas células. Da mesma forma há uma diminuição de sítios CpG metilados em células Th1 após o reestímulo, e em células T CD4 *naive*, a demetilação dos sítios CpG da região promotora é mais consistente 72 horas após ativação.

Em nossos resultados, identificamos então, algumas diferenças discretas no padrão de metilação de sítios individuais, dentre os quais destaco alguns sítios. O

CpG -58, por exemplo, está localizado na região HSI-4 e não está metilado em células T CD4 *naive* e células T CD8 *naive* mesmo em diferentes tempos após estímulo. Durante a diferenciação de células T CD4 para um fenótipo efetor, este sítio torna-se metilado e após o re-estímulo ele permanece metilado somente em células Th2, que não produzem IFN- γ . Além do sítio CpG -58, dois sítios localizados na região transcrita, os sítios CpG +12 e +114, encontram-se consistentemente metilados em células T CD4, mas o mesmo não se pode afirmar quando observamos células T CD8, sugerindo que estes sítios possam estar envolvidos na produção diferencial de IFN- γ por essas células. Ainda é difícil discernir se a metilação em poucos sítios no promotor de um gene ou um padrão de metilação mais extenso medeiam o silenciamento transcricional. Existem alguns trabalhos mostrando que a metilação em um ou poucos sítios é capaz de afetar a transcrição (ROBERTSON *et al.*, 1995). Por outro lado, existe uma grande discussão na literatura se a metilação em sítios CpG na região transcrita também afeta a transcrição ou se este efeito é restrito a metilação no promotor 5'.

De qualquer forma o padrão de metilação observado no promotor de *Irfng* não parece correlacionar-se estritamente com a expressão diferencial de IFN- γ por linfócitos T. Além disso, a diferença na acessibilidade da região HSI-4, entre células T CD8 e Th1 e células T CD4 e Th2 também não reflete o padrão de metilação observado. Uma vez que sítios hipersensíveis a DNase I são tipicamente associados a modificações de histonas permissivas a transcrição, esse outro tipo de alteração epigenética pode explicar a expressão diferencial de *Irfng* por células T e a acessibilidade à região HSI-4.

Mas não podemos ignorar a hipótese que a metilação dos sítios +12 e +114 tenha um papel importante na regulação transcricional de IFN- γ visto que estes sítios já se encontram menos metilados em células T CD8 não ativadas quando comparado ao observado em células T CD4. Outros mecanismos epigenéticos podem estar associados à regulação por metilação dos CpG -58, +12 e +114 e de forma conjunta possam explicar a expressão diferencial de *Irfng* por essas células.

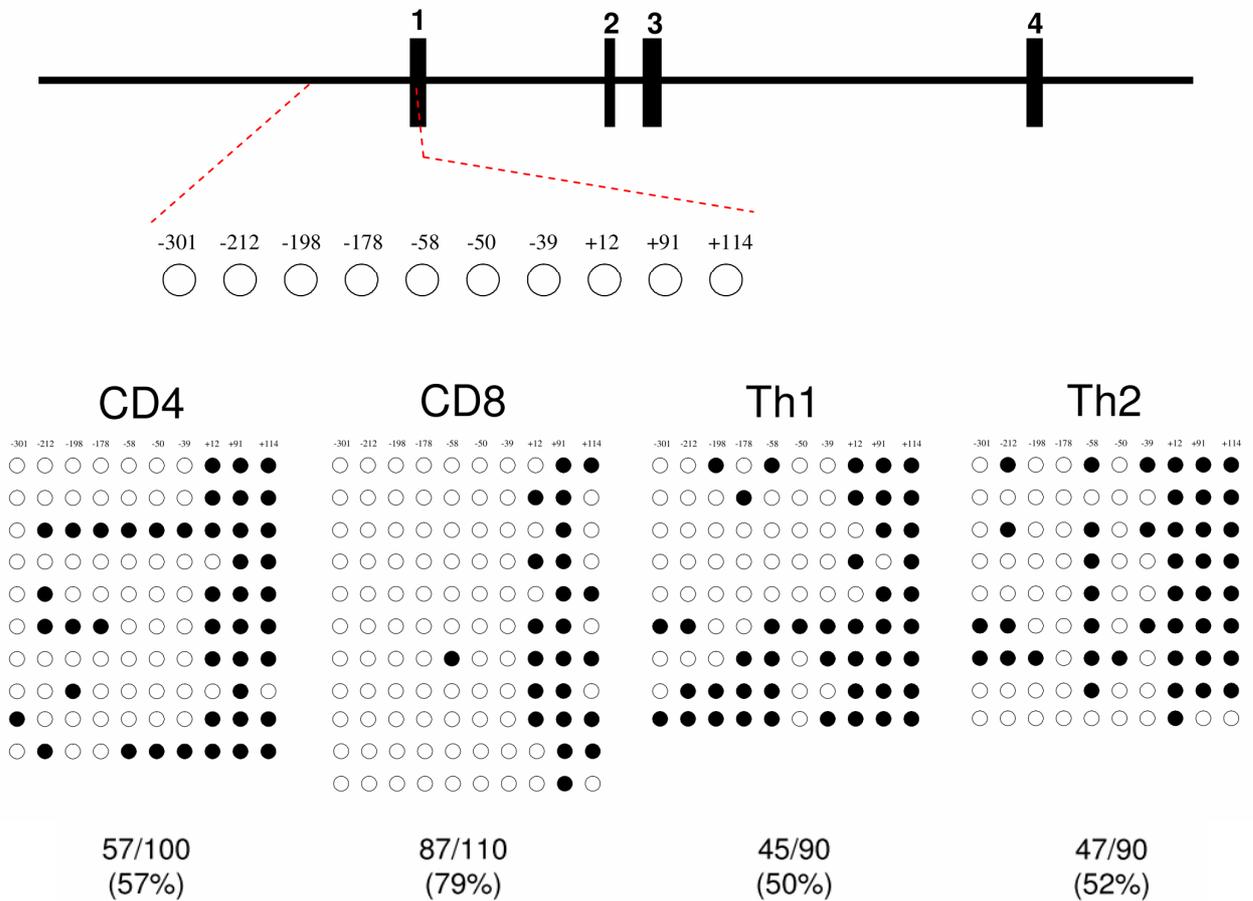


Figura 4.9. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene *Ifng* em células T não-estimuladas. A posição dos CpG da sequência do promotor do gene *Ifng* é indicada e os números equivalem as posições relativas ao início de transcrição (+1) Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas como descrito nas Figuras 4.1 e 4.3 e o estado de metilação na região promotora do gene *Ifng* foi analisado. Cada linha representa um clone sequenciado. ○ (círculo aberto) CpG não metilado; ● (círculo fechado): CpG metilado. A porcentagem de sítios não metilados de toda a região analisada está indicada abaixo dos resultados dos clones analisados. Resultado representativo de no mínimo 2 experimentos independentes.

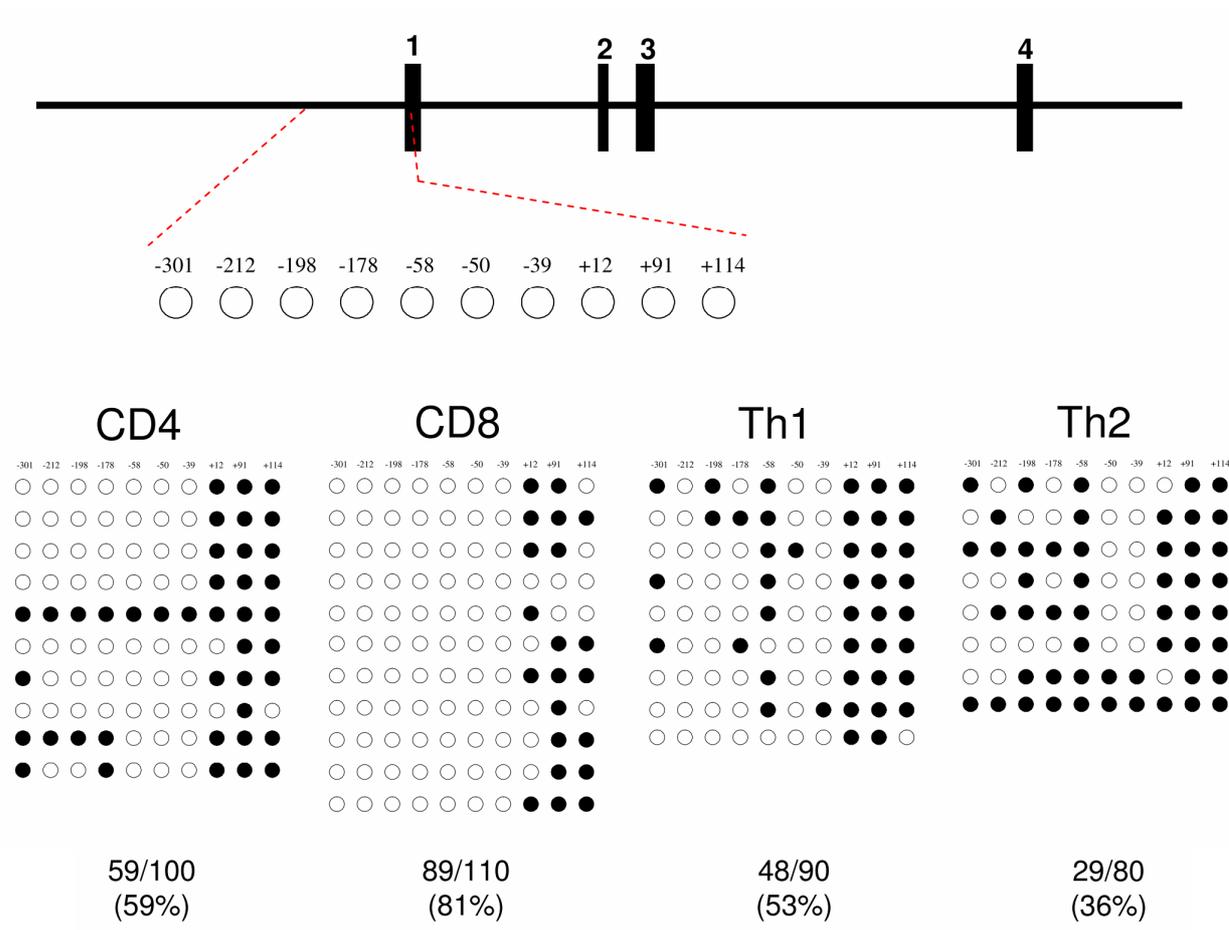


Figura 4.10. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene *lfn3* em células T ativadas por 3 horas. A posição dos CpG da sequência do promotor do gene *lfn3* é indicada e os números equivalem as posições relativas ao início de transcrição (+1). Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas como descrito nas Figuras 4.1 e 4.3 e então estimuladas com anti-CD3 por 3 horas. O estado de metilação na região promotora do gene *lfn3* foi analisado. Cada linha representa um clone sequenciado. ○ (círculo aberto) CpG não metilado; ● (círculo fechado): CpG metilado. A porcentagem de sítios não metilados de toda a região analisada está indicada abaixo dos resultados dos clones analisados. Resultado representativo de no mínimo 2 experimentos independentes.

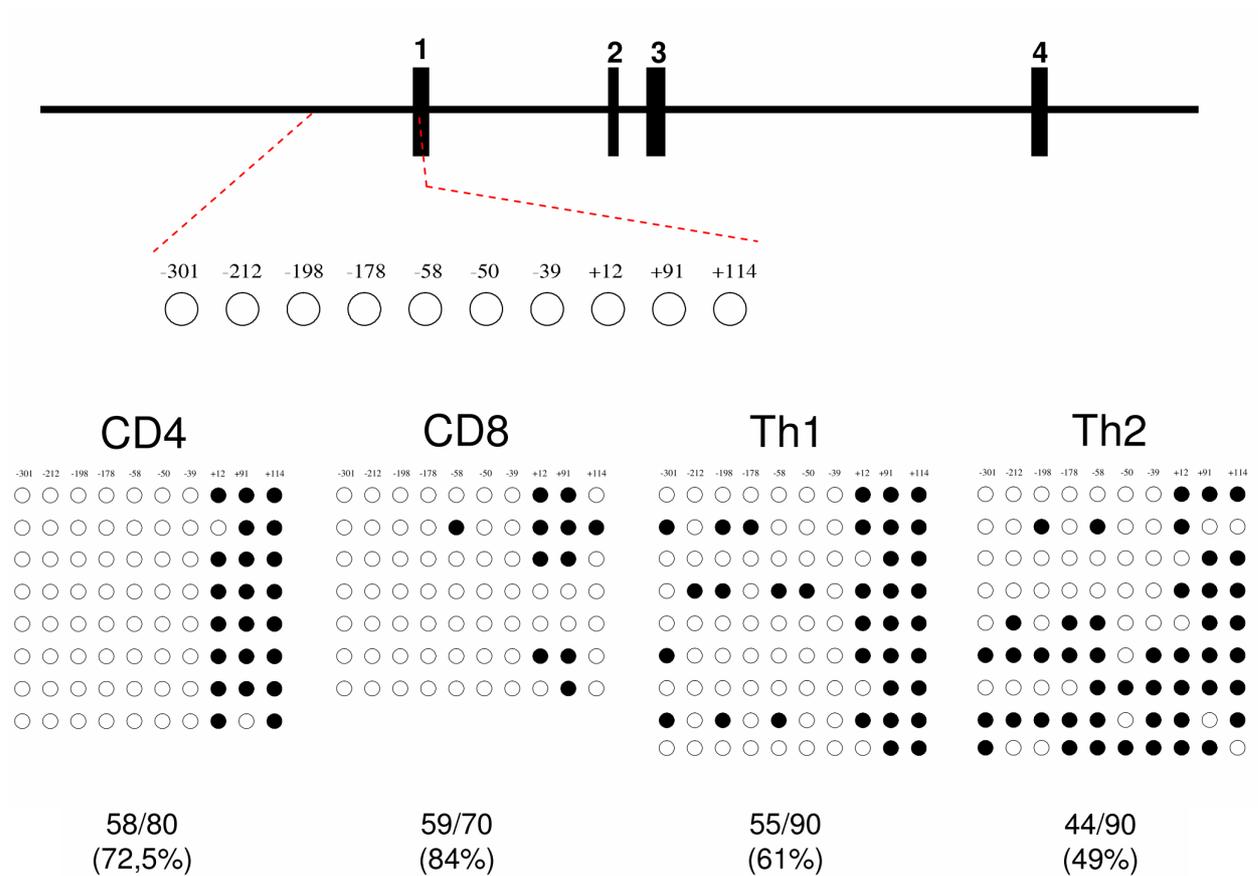


Figura 4.11. Análise do padrão de metilação em sítios CpG no promotor do gene *Ifng* em células T ativadas por 72 horas. A posição dos CpG da sequência do promotor do gene *Ifng* é indicada e os números equivalem as posições relativas ao início de transcrição (+1). Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas como descrito nas Figuras 4.1 e 4.3 e então estimuladas com anti-CD3 por 72 horas. O estado de metilação na região promotora do gene *Ifng* foi analisado. Cada linha representa um clone sequenciado. ○ (círculo aberto) CpG não metilado; ● (círculo fechado): CpG metilado. A porcentagem de sítios não metilados de toda a região analisada está indicada abaixo dos resultados dos clones analisados. Resultado representativo de no mínimo 2 experimentos independentes.

4.4 Análise do estado de metilação do DNA na região não codificadora conservada entre as espécies 1 (CNS1).

Nossas análises mostraram que o padrão de metilação na região promotora do gene *Ifng* é bastante semelhante tanto em células *naive*, T CD4 e T CD8, como em células Th1 e Th2. Apesar de algumas diferenças na metilação em alguns sítios pontuais, essas análises sugerem que a metilação de sítios CpG no promotor de *Ifng* não tenha papel preponderante na regulação da expressão desta citocina. Como já citado anteriormente, elementos regulatórios distais, tais como *enhancers* e *silencers*, auxiliam no remodelamento da cromatina a fim de manter mecanismos de expressão gênica estáveis. Estes elementos são altamente conservados entre as espécies e já foram descritas tais CNS na regulação do gene *Ifng*.

Dentre estas, destaca-se a região CNS1 (localizada 5,27 kb *upstream* do sítio de início da transcrição do *Ifng*), identificada por LEE *et al.*, (2004) que além de possuir modificações epigenéticas favoráveis à expressão de IFN- γ em células T, regula positivamente a expressão de IFN- γ (SHNYREVA *et al.*, 2004) através da ligação de fatores de transcrição como NFAT e T-bet (LEE *et al.*, 2004). Há indícios que essa região também seja um *enhancer* da expressão de *Ifng* em células T CD8 (SCHOENBORN *et al.*, 2007).

Já foram realizadas algumas análises do padrão de metilação desta região em células T: ela aparece completamente metilada em células T CD4 *naive* e células Th2, mas demetilada em células Th1 (SCHOENBORN *et al.*, 2007). No entanto, nenhum estudo fez a análise em células T CD8 e mesmo em células T CD4 após ativação. Desta forma, para verificarmos um possível papel desta região na regulação da expressão do gene *Ifng*, analisamos o estado de metilação desta região também em células T CD8, além de T CD4, Th1 e Th2.

A região analisada possui 634 pb e compreende 18 sítios CpG. Optamos por analisar o estado de metilação do promotor em células não estimuladas ou estimuladas por 3 horas com anti-CD3. Nossas análises de metilação foram feitas exatamente como descrito na seção anterior e mostraram que a CNS1 está completamente metilada em todos os sítios e em todos os tipos celulares analisados (Fig 4.12). Nossos dados sugerem então, que a metilação desta região não está envolvida na regulação da expressão diferencial de *Ifng* em linfócitos T, uma vez que o mesmo padrão de metilação é observado em todos os tipos celulares analisados, independentemente da produção de IFN- γ por essas células. Diferentemente do que

foi mostrado na literatura, esta região não se apresentou não-metilada em células Th1 e isso pode ser explicado por diferenças no modelo de diferenciação utilizado nos dois trabalhos. Por exemplo, no trabalho de SCHOENBORN e colaboradores (2007), a diferenciação é feita durante oito dias com adição de citocinas polarizantes a cada dois dias, enquanto em nosso trabalho as células são diferenciadas por seis dias e só recebem as citocinas polarizantes no primeiro dia.

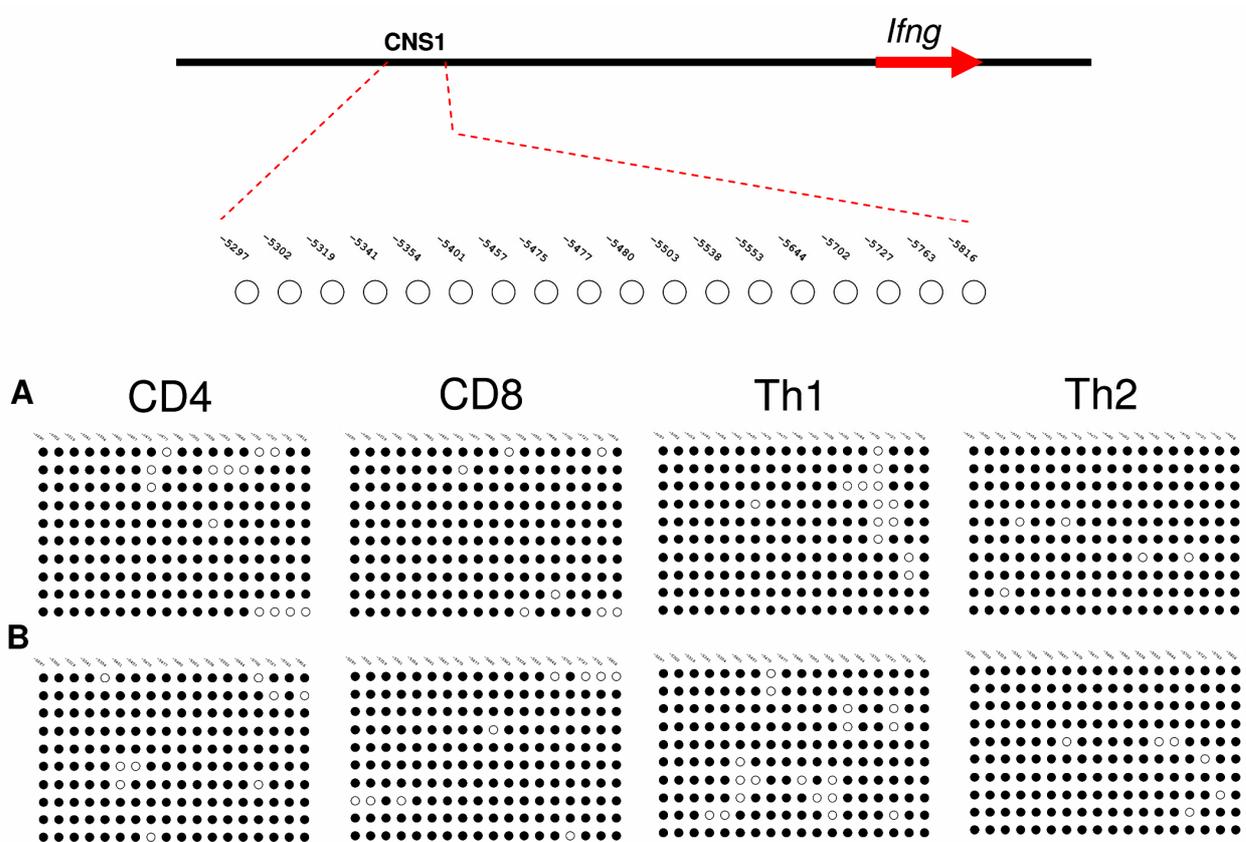


Figura 4.12. Análise do padrão de metilação em sítios CpG na região CNS1. A. A posição dos CpG da sequência da região CNS1 é indicada e os números equivalem as posições relativas ao início de transcrição (+1). Células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 foram obtidas como descrito nas Figuras 4.1 e 4.3 e o estado de metilação na região CNS1 foi analisado. Cada linha representa um clone sequenciado. ○ (círculo aberto) CpG não metilado, ● (círculo fechado): CpG metilado. Os resultados são referentes ao padrão de metilação em células não estimuladas (A) e estimuladas 3 horas com anti-CD3 (B). Resultado representativo de no mínimo 2 experimentos independentes.

4.5 Avaliação funcional de regiões regulatórias de *Irfng*.

A fim de avaliarmos o papel da região HSI-4 na regulação da expressão de IFN- γ avaliamos através de ferramentas de bioinformática a presença de sítios putativos para a ligação de fatores de transcrição nessa região. Utilizamos o programa MatInspector do Genomatix (CARTHARIUS *et al.*, 2005). O resultado está representado na Figura 4.13. Observa-se que há sítios para importantes fatores de transcrição cuja função regulatória na expressão de IFN- γ já foi descrita: STAT, AP-1, NFAT, CREB, Ets1, ATF2. A ligação desses fatores em muitos desses sítios já foi identificada em ensaios *in vitro* e até mesmo *in vivo*. Além disso, há sítios de ligação para fatores envolvidos em processos epigenéticos, como Jarid1b, que apresenta atividade de demetilase de H3K4 (SEWARD *et al.*, 2007). Este resultado ilustra a importância que a região HSI-4 pode ter na regulação da expressão de *Irfng*.

Para avaliarmos a função da região HSI-4 na regulação de *Irfng*, parte desta região foi clonada em um plasmídeo conjugado a luciferase (pGL3-Luc) e a transativação mediada por essa sequência foi avaliada. Para isto as construções de interesse foram eletroporadas em uma linhagem de células T CD4, Jurkat. Apesar de compreender apenas uma pequena sequência do promotor de *Irfng*, esta região é capaz de induzir claramente a expressão do repórter após estímulo com PMA e ionomicina, evidenciando que esta região exerça uma função regulatória positiva na expressão de *Irfng* (Fig 4.14). Além disso, quando 69 pb desta região são deletados há uma drástica redução na expressão da luciferase, demonstrando que a sequência compreendida entre -108 e -39 pb do promotor de *Irfng* tenha de fato uma importante função regulatória (Fig 4.14). Esta deleção leva a perda da importante sequência regulatória contida entre -54 e -63 pb, que inclui sítios de ligação para os fatores transcripcionais T-bet, NFAT, ATF2 e c-jun.

Esta sequência está compreendida na região HSI-4 e como mostrado em nosso ensaio de hipersensibilidade a DNase I (Fig 4.6), sugere-se que esta região esteja acessível em células Th1 e T CD8, podendo induzir a expressão de *Irfng* nestas células, e inacessível em células T CD4 naive e Th2, de forma que nessas células a expressão de *Irfng* é reduzida. Como nossas análises de bioinformática mostraram, diversos fatores transcripcionais importantes na regulação da expressão de *Irfng* e no remodelamento da cromatina apresentam sítios de ligação nessa região, corroborando a hipótese da importância desta pequena região na regulação de *Irfng*.

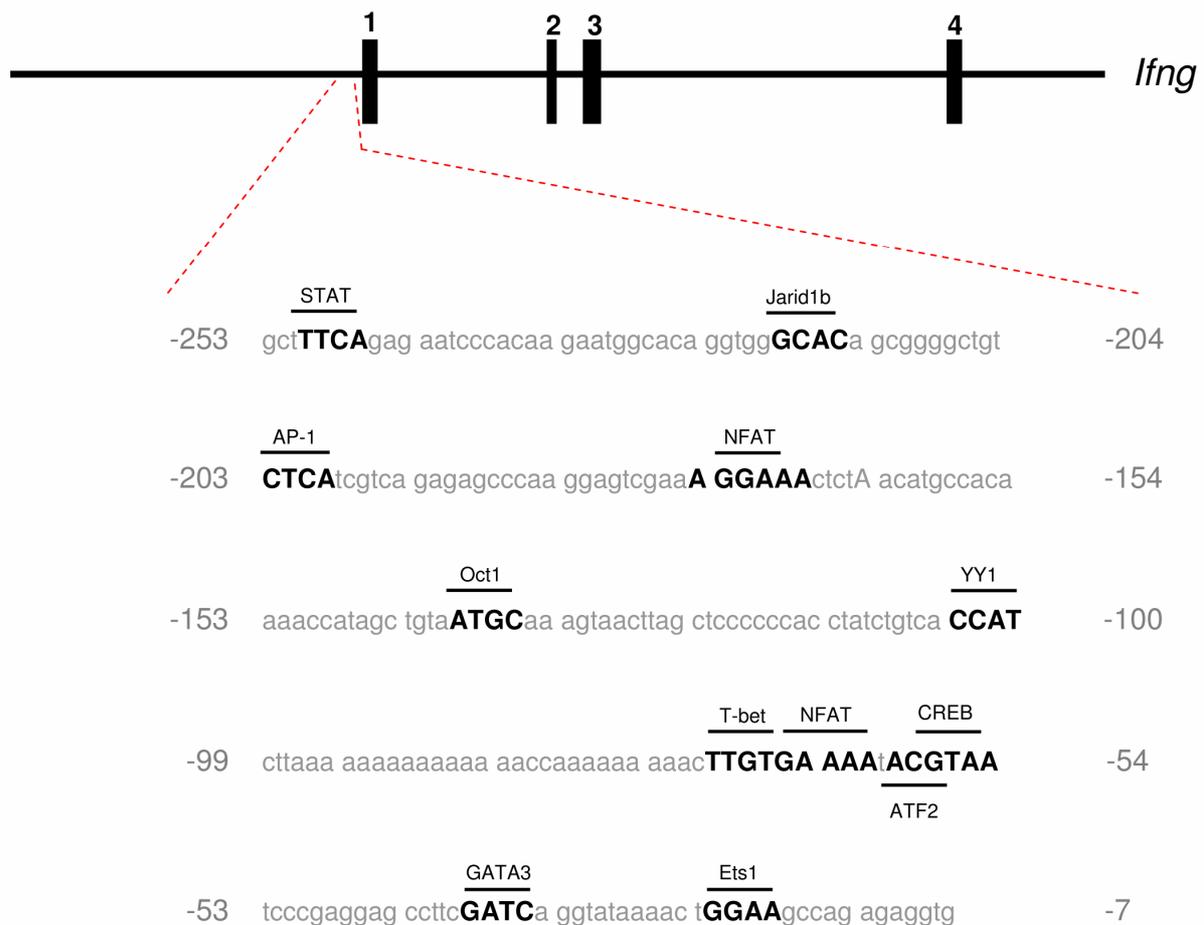


Figura 4.13. Sítios de fatores de transcrição na região HSI-4. A sequência da região HSI-4 foi submetida a uma análise para busca de sítios putativos de ligação de fatores transcripcionais. Os fatores transcripcionais mais relevantes na regulação da expressão de *Ifng* estão destacados. Esta análise foi feita pelo programa MatInspector do *software* Genomatix.

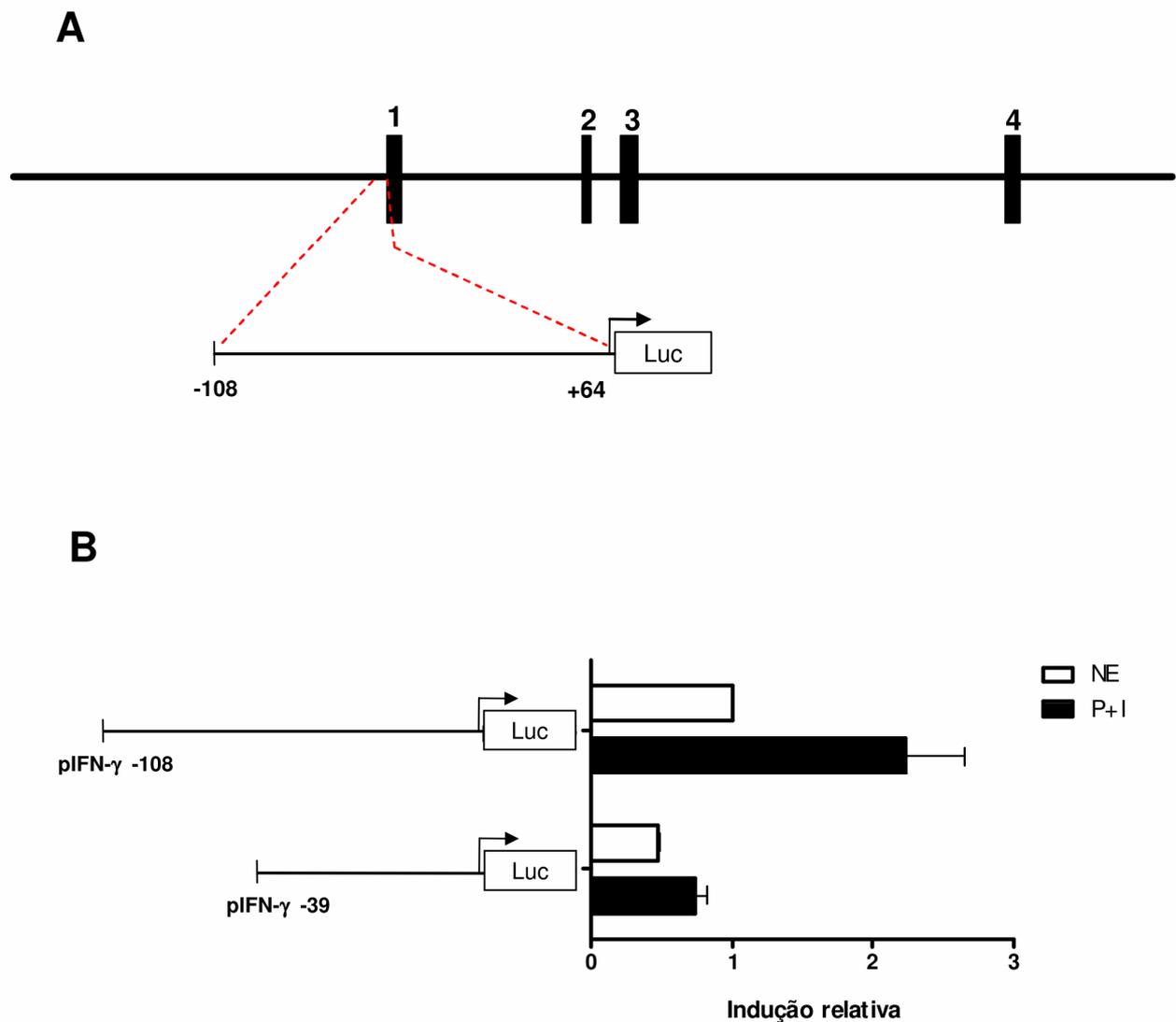


Figura 4.14. Avaliação da função da região HSI-4 na regulação de *Irfg*. **A.** Esquema da construção do plasmídeo pGL3-Luc contendo uma sequência presente na região HSI-4. **B.** Células Jurkat foram eletroporadas com os plasmídeos contendo as regiões de interesse e mantidas não-estimuladas ou estimuladas com PMA e ionomicina por 6 horas, conforme indicado. A atividade de luciferase firefly foi medida e normalizada pela atividade de luciferase renilla. Todos os valores obtidos foram comparados ao obtido em células eletroporadas com o plasmídeo -108-pGL3Luc não-estimuladas. Média e desvio-padrão de 4 experimentos independentes.

Esta é uma das regiões que parece estar envolvida na expressão diferencial de IFN- γ em linfócitos T, no entanto ainda existem diversas regiões envolvidas nessa regulação que devem ser melhor investigadas. Além disso, os mecanismos epigenéticos associados tanto à acessibilidade desta região em células Th1 e T CD8 quanto à expressão diferencial de IFN- γ em células T CD4 e T CD8 também devem ser melhor elucidados.

5. DISCUSSÃO

O interferon (IFN)- γ é a principal citocina envolvida na resposta imune anti-tumoral, além de ser essencial para a imunidade contra patógenos intracelulares. Sabe-se que durante a diferenciação de células T CD4 para um fenótipo Th1, modificações epigenéticas no *locus* de *Irfng* são necessárias para a alta expressão desta citocina. Trabalhos anteriores já sugeriram que a produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8 seria regulada diferencialmente (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Entretanto não foi demonstrado se essa expressão diferencial de IFN- γ em células T CD4 e T CD8 também seria dependente de tais alterações de cromatina. Diante disso, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos epigenéticos que regulariam a expressão diferencial de IFN- γ em células T CD4 e T CD8.

Para tanto, nosso primeiro objetivo foi avaliar a expressão e produção de IFN- γ por células T. Inicialmente caracterizamos o nosso modelo, avaliando a pureza e o perfil de ativação das populações de células T CD4 e T CD8 obtidas (Fig 4.1). A porcentagem de células consideradas *naive* CD62L^{hi}/CD44^{lo}, foi semelhante tanto em células T CD4 quanto T CD8 e dentro do esperado, de forma que as células utilizadas neste estudo estavam semelhantemente enriquecidas de uma população *naive*.

Em 1999 Carter e colaboradores mostraram que a indução da produção de IFN- γ em células T CD8, após seis dias de estímulo, era independente de IL-12 e STAT4, diferentemente do observado para células T CD4. Da mesma forma, Teixeira e colaboradores (2005) mostraram que quando células T eram estimuladas *in vitro* com anti-CD3 durante 72 horas, a população de células T CD8 produtoras de IFN- γ era consideravelmente maior que a população de células T CD4 IFN- γ ⁺. Esses trabalhos mostraram que a ativação do TCR nestas células levava a um padrão de expressão de IFN- γ distinto em células T CD4 e T CD8, sugerindo que somente as vias de sinalização induzidas pela ativação do TCR fossem suficientes para indução de IFN- γ em células T CD8, enquanto células T CD4 necessitavam de mecanismos adicionais.

De fato, em nosso trabalho, quando purificamos células T CD4 e T CD8 e submetemos essas células a um estímulo de 6 horas com PMA e ionomicina, reproduzimos os resultados já descritos, observando que a população de células T CD8 produtoras de IFN- γ é significativamente maior (16,3%) que a população T CD4

IFN- γ ⁺ (0,9%) (Fig 4.2). Mesmo utilizando um estímulo muito mais curto que os trabalhos anteriores, já observamos essa expressão diferencial de IFN- γ entre células T, o que sugere que exista de fato algum componente diferencial próprio dessas células. Muito se sabe sobre a regulação da expressão de IFN- γ em células T CD4 e Th1. No entanto, em células T CD8 existem poucos estudos. O principal regulador transcricional do gene *Ifng* em células T CD4 é o fator transcricional T-bet (SZABO *et al.*, 2000). E esta parece até o momento ser a principal diferença na regulação da expressão desta citocina entre linfócitos T CD4 e T CD8, pois em células T CD8, o fator transcricional Eomes, e não T-bet, é o principal regulador da expressão de IFN- γ . No entanto, é importante ressaltar que da mesma forma que em células T CD8 *naive* os níveis de Eomes são baixos quando comparados ao observado em células T CD8 efetoras (PEARCE *et al.*, 2003), em células T CD4 *naive*, T-bet não é expresso, sendo induzido durante o comprometimento em Th1. Desta forma a diferença na indução da produção de IFN- γ entre os linfócitos *naive* deve depender de outros fatores e não somente da regulação diferencial destes fatores de transcrição. Inclusive outros fatores de transcrição envolvidos na regulação de *Ifng*, tais como NF κ B, NFAT e AP-1 são comuns tanto a linfócitos T CD4 como T CD8.

Para entendermos melhor a dinâmica desta regulação diferencial, optamos em comparar a produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8 com células já classicamente produtoras de altos e baixos níveis de IFN- γ : células Th1 e Th2 respectivamente. Para tanto, estabelecemos um modelo de diferenciação *in vitro* de células T CD4 em Th1 e Th2 (Fig 4.3). A análise da produção das citocinas IFN- γ e IL-4 por essas células, validou nosso modelo de diferenciação uma vez que os perfis efetores, Th1 e Th2, apresentaram uma maior população de células produtoras de suas citocinas específicas, IFN- γ e IL-4 respectivamente (Fig 4.3). Além de produzirem uma maior quantidade de suas citocinas específicas, os perfis efetores também produziram baixos níveis da citocina do fenótipo oposto, conforme pode ser visualizado na Figura 4.3. A expressão diferencial de *Ifng* por essas células é resultante tanto de diferentes fatores de transcrição associados a cada uma das subpopulações, como também de modificações no *locus Ifng*, que apresenta características permissivas a transcrição em células Th1, e restritivas a transcrição em células Th2 (WILSON, ROWELL & SEKIMATA, 2009).

Para compararmos a produção de IFN- γ entre os diferentes linfócitos T, inicialmente analisamos a produção protéica de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de células T CD4 e T CD8 recém isoladas e células T CD4 diferenciadas como descrito para perfis Th1 e Th2 (Fig 4.4). Corroborando nossos resultados anteriores, após o estímulo primário os principais linfócitos que produzem IFN- γ são os T CD8 enquanto células T CD4 só produzem níveis significativos desta citocina após a diferenciação para um perfil Th1. Semelhantemente às células T CD4 *naive*, células Th2 pouco produzem IFN- γ . Interessantemente, a produção de IFN- γ por células T CD8 e Th1 é crescente ao longo da ativação, apesar da produção por células Th1 ser consideravelmente maior.

Sabe-se que a expressão de diversas citocinas pode ser regulada tanto ao nível transcricional como pós-transcricionalmente, através da regulação da estabilidade do mRNA. A meia-vida dos mRNA em eucariotos pode variar de 15 minutos a mais de 24 horas (revisado por SEKO *et al.*, 2006). Ou seja, uma diferença significativa de expressão de determinado gene em uma dada célula pode não refletir diferenças na transcrição deste gene, mas sim da regulação da estabilidade de seu mRNA. Alguns mRNA de citocinas como IL-2, IL-1 e inclusive IFN- γ possuem em sua região 3'-UTR sequências ricas em AU reconhecidas por diferentes proteínas (ex: HuR) que controlam o recrutamento destes mRNA para degradação, de forma que a regulação da expressão gênica dessas citocinas também pode envolver mecanismos pós-transcricionais (revisado por SEKO *et al.*, 2006).

Para confirmarmos que a diferença observada na produção protéica de IFN- γ por linfócitos T era consequência da regulação transcricional do gene *lfng* após ativação, e não um reflexo do acúmulo da proteína na cultura ou mesmo consequência de uma possível regulação pós-transcricional, avaliamos os níveis do transcrito de *lfng* produzidos por essas células através de RT-PCR em Tempo Real.

Através de uma cinética curta (0-8 horas) de ativação com anti-CD3, observamos uma produção acentuada e crescente do transcrito de *lfng* em células T CD8 quando comparada à cinética observada em células T CD4. Nestas células a produção de IFN- γ nos tempos analisados se manteve praticamente constante. A cinética da expressão do mRNA de *lfng* foi muito semelhante em células T CD8 *naive* e Th1, apresentando uma indução rápida e crescente que persistiu entre 3-8 horas após ativação com anti-CD3. Por outro lado, células T CD4 *naive* produziram baixos níveis do transcrito sem aumento significativo mesmo após 8 horas de

ativação (Fig 4.5). Uma vez que a transcrição de *Ifng* por linfócitos T é refletida nos níveis protéicos avaliados anteriormente, sugerimos que a diferença na produção de IFN- γ entre células T CD4 *naive*, T CD8 *naive* e Th1 ocorra, ao menos em parte, ao nível transcricional.

É interessante termos demonstrado a rápida produção de IFN- γ após ativação por células T CD8. Sabe-se que as células T CD8 efetoras produzem grandes quantidades de IFN- γ após ativação do TCR (GLIMCHER *et al.*, 2004), no entanto esperava-se que a produção desta citocina por linfócitos *naive*, CD4 e CD8, fosse comparável. Dada a importância de IFN- γ no processo de comprometimento de células T CD4 *naive* em células Th1 efetoras (BRADLEY *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2001), Teixeira e colaboradores (2005) sugeriram que o IFN- γ produzido por células T CD8 pudesse contribuir nesta diferenciação de células T CD4 em Th1. Em experimentos *in vitro* mostrou-se que células T CD4 que foram cocultivadas com células T CD8 IFN- $\gamma^{+/+}$ produziram mais IFN- γ e menos IL-4 do que aquelas cocultivadas com células T CD8 IFN- $\gamma^{-/-}$, sugerindo que o IFN- γ produzido por células T CD8 acentua o desenvolvimento do fenótipo Th1 *in vitro*. Nossos dados evidenciam uma produção rápida e acentuada de IFN- γ por células T CD8 ativadas, semelhantemente ao observado em células Th1. O real papel biológico desta rápida produção por linfócitos T CD8 deve ser mais bem investigado, porém dados os indícios *in vitro* acreditamos que estas células possam ser uma importante fonte de IFN- γ para a diferenciação de células T CD4 em Th1.

Mecanismos epigenéticos regulam diversos genes associados ao sistema imunológico. Sabe-se que a rápida produção de IFN- γ por células NK ocorre, em parte, porque regiões regulatórias de *Ifng* apresentam modificações de cromatina permissivas à transcrição, tais como uma maior acetilação de histonas por todo o *locus Ifng* (CHANG & AUNE, 2005). Apesar de alguns relatos conflitantes, há um consenso que a diferenciação para um fenótipo Th1 induz regiões hipersensíveis a DNase I em diversas regiões regulatórias de *Ifng* e muitas dessas regiões coincidem com modificações de histonas permissivas à transcrição tais como acetilação e metilação de H3K4 (SCHOENBORN *et al.*, 2007). No caso de células T CD8, ZHOU, CHANG & AUNE, (2004) demonstraram que a acetilação de histonas numa grande região (aproximadamente 50 kb) que inclui a do gene *Ifng* é parte do processo de diferenciação destas células para um fenótipo citotóxico.

Estes estudos mostraram que mecanismos epigenéticos estão associados à regulação da expressão de IFN- γ em células produtoras desta citocina. Diante de nossos resultados que mostraram uma rápida produção de IFN- γ por células T CD8, cuja cinética é bastante semelhante à de células Th1, especializadas na produção desta citocina, supomos que modificações epigenéticas no *locus* de *Irfng* em células T CD8 pudessem ocorrer de forma semelhante ao que ocorre em células Th1 e NK. A maior acessibilidade da maquinaria de transcrição, a essa região, nestas células do que em linfócitos T CD4 *naive* poderia explicar a diferença observada na cinética de produção de IFN- γ entre células T CD4 e T CD8. É possível que em células T CD8 o *locus* de *Irfng* já esteja acessível aos fatores de transcrição induzidos pela ativação do TCR, enquanto em células T CD4 são necessários estímulos adicionais para abertura desse *locus* tais como a sinalização via IL-12. Coloca-se em hipótese, então, que modificações na cromatina de regiões regulatórias de *Irfng* sejam necessárias para modular a expressão diferencial de IFN- γ em células T.

Com isso, fomos verificar a presença de regiões de diferente acesso à cromatina no gene *Irfng* em células T CD4 e T CD8 através da digestão dos núcleos dessas células com a enzima DNase I. Regiões transcricionalmente ativas, caracterizadas por uma menor ocupação de nucleossomos, são mais acessíveis a DNase I. Em 1998, Agarwal e Rao, demonstraram a existência de sítios hipersensíveis a DNase I no promotor proximal, intron 1 e intron 3 de *Irfng* em células Th1. Estes sítios não existiam em células Th2. É importante ressaltar que essa caracterização foi realizada em células D5 (Th1) e D10 (Th2) que em função do longo tempo em cultura são populações já estabilizadas e que podem apresentar estruturas de cromatina atípicas e não refletir o encontrado *in vivo*.

Optamos então em analisar a presença de regiões hipersensíveis a DNase I no gene *Irfng* em nosso modelo, cujas células T CD4 e T CD8 são obtidas diretamente de animais e as células Th1 e Th2 são recém-diferenciadas. Analisamos além das regiões descritas no trabalho anterior, regiões flangeadoras destas, tanto *upstream* quanto *downstream*. Diferentemente da técnica mais usual, que envolve ensaios de hibridização (*Southern blot*), optamos por uma nova metodologia que utiliza o PCR em Tempo Real para identificação de regiões hipersensíveis a digestão com DNase I (McARTHUR; GERUM; STAMATOYANNOPOULOS, 2001) e tem como vantagem apresentar uma sensibilidade muito maior que a anterior. No trabalho que descreveu esta técnica eles observam diferentes padrões de digestão na PCR em Tempo Real: (1) regiões que mesmo submetidas a altas concentrações

de DNase I não apresentam diminuições significativas da detecção do *amplicon* na PCR, sugerindo que são regiões cuja cromatina está inacessível; (2) regiões cuja detecção na PCR em tempo Real diminuem conforme aumenta-se a concentração da enzima e atingem cerca de 30-40% de redução na detecção; (3) regiões semelhantes as anteriores mas cuja redução pode chegar a 70-80%, o que sugere que são regiões hipersensíveis a DNase I.

Em nossos experimentos observamos no máximo, uma redução de 45%, mas as condições de digestão foram diferentes do trabalho de McARTHUR e colaboradores (2001). Segundo eles, uma redução neste nível indica regiões parcialmente hipersensíveis. De qualquer forma como esse nível de redução coincidiu com o observado em regiões hipersensíveis já descritas (AGARWAL & RAO, 1998), consideramos esse padrão como sítio hipersensível. Ressalto que a realização deste mesmo ensaio de PCR em Tempo Real a partir de um clone de células diferenciadas, como as células D5, resultaria provavelmente em um padrão de redução maior, refletindo uma população clonal. Células recém-diferenciadas, por outro lado, representam uma população heterogênea. De fato, quando Agarwal e Rao analisam a presença destas regiões hipersensíveis a DNase I em células Th1 recém-diferenciadas *in vitro* a partir de células T CD4 *naive*, a presença desses sítios hipersensíveis é menos evidente do que o observado em células D5.

Optamos neste momento em realizar o experimento de hipersensibilidade a DNase I em células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não estimuladas de forma que a estrutura da cromatina e a acessibilidade ao *locus* puderam ser avaliadas em condições de atividade transcricional mínima, evidenciando mais o potencial de transcrição destas células do que a transcrição gênica propriamente dita.

Dentre todas as regiões que analisamos, somente a região HSI-4 (Fig 4.6) relacionou o acesso a cromatina à expressão de IFN- γ . Esta região apresentou-se hipersensível em células Th1 e T CD8, justamente os linfócitos T que produzem altos níveis de IFN- γ rapidamente após ativação; e inacessível em células T CD4 e Th2 que pouco produzem IFN- γ . Nossa hipótese é que células T CD8 e Th1 já apresentem essa região acessível à maquinaria de transcrição, diferentemente de células T CD4 e Th2. De fato, um gene transcricionalmente ativo apresenta uma diminuição de nucleossomos *upstream* ao sítio de início de transcrição (CLAPIER & CAIRNS, 2009), justamente onde essa região HSI-4 está localizada (-253 pb a -7 pb).

Sabe-se que membros da família SWI/SNF estão envolvidos no remodelamento de nucleossomos do gene *Ifng* em células Th1. A subunidade catalítica deste complexo, BRG1, é recrutada para o promotor de *Ifng* nestas células e não em células T CD4 e Th2, e participa do processo de diferenciação para um perfil Th1. Como complexos SWI/SNF podem gerar regiões de menor densidade nos promotores gênicos (PIATTI; ZEILNER; LUSSER, 2011), sugerimos que a geração deste sítio hipersensível HSI-4 possa depender da ação desse complexo remodelador de cromatina. Ainda não foi demonstrado se esse complexo também é recrutado para o promotor de *Ifng* em células T CD8. De qualquer forma a região HSI-4 pode desempenhar um importante papel funcional na expressão diferencial de *Ifng* em células T.

Em nossos resultados, a região hipersensível anteriormente identificada e localizada no intron 3 (HSIII-2), também apresentou-se hipersensível tanto em células Th1 e T CD8, mas também em células T CD4 (Fig 4.8). É possível que essa região também seja importante para a expressão de IFN- γ e só esteja com a cromatina inacessível em células Th2 que não apresentam potencial para transcrever *Ifng*. Durante a diferenciação para um fenótipo Th1, a região mantém-se acessível, conforme já ocorre em células T CD4 *naive*, enquanto a diferenciação para um fenótipo Th2 parece envolver a compactação da cromatina nessa região.

Surpreendentemente muitas das regiões analisadas apresentaram-se hipersensíveis tanto em células Th1 quanto em células Th2. Inclusive a região hipersensível descrita por Agarwal e Rao, HSII-2, localizada no primeiro intron de *Ifng* (Fig 4.7). Em células D10 esse sítio não foi identificado, mas neste trabalho eles não demonstraram a existência ou não desses sítios em células Th2 recém-diferenciadas *in vitro*.

Muitas vezes *silencers* também se apresentam hipersensíveis ao tratamento com DNase I. Um clássico exemplo é o *silencer* de *Il4* (ANSEL *et al.*, 2004; DJURETIC *et al.*, 2007) que encontra-se na região hipersensível HS IV de *Il4* e é bastante evidente em células T CD4 e células Th1 (AGARWAL; RAO, 1998), onde está acessível a T-bet e Runx3. É possível que algumas dessas regiões hipersensíveis em Th2 estejam associadas à repressão da expressão de *Ifng* nestas células. Por outro lado os fatores transcrpcionais que se ligam e regulam essas regiões podem estar associados à polarização para um fenótipo Th1, estando não-expressos em células Th2, como por exemplo, o fator transcricional T-bet. Sabe-se que T-bet não é expresso em células T CD4 *naive*, mas é induzido rapidamente

durante o comprometimento em Th1 (SZABO *et al.*, 2000). Um estudo recente em células T CD4 humanas sugere que modificações epigenéticas no *locus* do gene de T-bet são necessárias para a indução da transcrição desta proteína. Estas modificações seriam controladas por NFAT e STAT1/STAT4, somente durante a diferenciação para um fenótipo Th1 (PLACEK *et al.*, 2009).

Algumas regiões apresentaram-se hipersensíveis somente em células Th1 e Th2, enquanto outras também se apresentaram hipersensíveis em células T CD4 e T CD8 recém isoladas. Já foram descritas situações nas quais a acessibilidade da cromatina em certos *locus* não é acompanhada de transcrição. Um exemplo é o *locus Gzmb* que se apresenta acessível em células T CD8 de memória que produzem baixos níveis de Granzima B quando comparadas à células T CD8 efetoras (ZEDIAK *et al.*, 2011). Muitas vezes a presença desses sítios hipersensíveis independe do tipo celular e da expressão de IFN- γ , o que pode sugerir que esses elementos estejam envolvidos na organização estrutural dos genes formando estruturas tridimensionais que permitam interações inter e intra cromossomos. Um exemplo é o gene *Rad50*, que está contido no *locus* de citocinas Th2 e apresenta um sítio hipersensível em células T CD4. Esta região hipersensível interage com o promotor de *Ifng* nestas células, sendo essencial para as interações destes *loci* em células T CD4 *naive* e até mesmo para a expressão de IFN- γ (SPILIANAKIS *et al.*, 2005). De qualquer forma as regiões que em nossas análises apresentaram este padrão de hipersensibilidade independente da produção de IFN- γ , não parecem estar envolvidas na expressão diferencial de *Ifng* por células T CD4 e T CD8.

Como o aumento na expressão do mRNA de *Ifng* em células T CD8 ocorre por volta de 3 horas após estímulo (Fig 4.5), seria interessante também analisarmos a existência dos sítios hipersensíveis a DNase I na região promotora e gene *Ifng* em células T CD8, T CD4, Th1 e Th2, estimuladas com anti-CD3 por 3 horas. É possível que só após ativação algumas regiões do *locus* de *Ifng* tornem-se acessíveis em células T CD8. Inclusive, um trabalho recente mostrou que células T CD8 efetoras e de memória apresentam depleção de histonas na região próxima ao sítio de início de transcrição do gene *Ifng*, acompanhado de um maior recrutamento da RNA polimerase II do que o observado em células T CD8 *naive* (ZEDIAK *et al.*, 2011). Com isso também seria interessante compararmos o recrutamento da RNA polimerase II ao promotor de *Ifng* em células T CD8 e T CD4 *naive*.

A alteração no posicionamento dos nucleossomos e a geração destes sítios hipersensíveis são mediadas principalmente por complexos remodeladores de

cromatina, como o SWI/SNF, que podem ser recrutados por modificações de cromatina tais como modificações pós-traducionais de histonas e metilação do DNA. Dessa forma, regiões hipersensíveis a DNase I geralmente coincidem com regiões de modificações permissivas a transcrição, tais como hiperacetilação de histonas, a presença das variantes de histona H3.3 e H2A.Z e ausência de metilação do DNA (BELL *et al.*, 2011). Dentre todas as regiões analisadas, a região HSI-4 destacou-se por correlacionar a acessibilidade com a produção de IFN- γ e com isso tornou-se uma interessante região para analisarmos possíveis modificações epigenéticas diferenciais entre células T, que explicassem a rápida produção de IFN- γ por células Th1 e T CD8.

A metilação do DNA no promotor de um dado gene, correlaciona-se com o decréscimo na expressão deste gene e a cromatina não metilada é frequentemente associada com cromatina ativa, acessível à transcrição. A regulação da expressão de diversas citocinas, como IL-2, IL-4 (BRUNIQUEL & SCHWARTZ, 2003; LEE, AGARWAL & RAO, 2002) e inclusive IFN- γ envolve a regulação por metilação. No entanto os estudos sobre a metilação na regulação do gene *Ifng* são ainda bastante controversos e não mostram o estado de metilação durante diferentes tempos após ativação e diferenciação. A fim de avaliarmos se a expressão diferencial de IFN- γ é dependente de modificações epigenéticas, nós analisamos o padrão de metilação dos sítios CpG localizados no promotor de *Ifng*, que compreende a região hipersensível do promotor proximal (HSI-4) e um CpG mais distal (-301 pb), e também no primeiro éxon de *Ifng*.

Inicialmente analisamos os 10 sítios CpG compreendidos no promotor de IFN- γ em células T CD4, T CD8, Th1 e Th2 não-estimuladas ou estimuladas por 3 e 72 horas com anti-CD3. Nossas análises mostraram que o promotor de IFN- γ está essencialmente hipometilado em todos os tipos celulares, nos tempos analisados, especialmente em células T CD4 e T CD8 *naive* (Figuras 4.9; 4.10 e 4.11). Em células T CD4, especialmente após 72 horas de estímulo, em células T CD8 e em células Th1 após o reestímulo, observamos um aumento no percentual de demetilação total da região analisada. Por outro lado o mesmo não é observado em células Th2. É possível que especificamente em células T CD8, T CD4 *naive* e Th1, as vias de sinalização induzidas pela ativação do TCR podem estar envolvidas em mecanismos de demetilação, o que estaria associado ao potencial de expressão de *Ifng* que estas células apresentam.

Nota-se que os sítios metilados são em sua maioria os localizados na região do gene *Ifng* que é transcrita (sítios +12, +91 e +114). Esses sítios estão metilados de forma consistente em células T CD4, Th1 e Th2. Por outro lado em células T CD8 há uma demetilação dos sítios +12 e +114. É possível que estes sítios estejam envolvidos na regulação diferencial de *Ifng* entre células T CD4 e T CD8, uma vez que aparecem menos metilados mesmo antes da ativação, em células T CD8 que produzem IFN- γ rapidamente.

Não identificamos sítios putativos para a ligação de fatores de transcrição nesses CpG, sugerindo que se a metilação destes sítios mediar a repressão gênica, deve ser através de mecanismos indiretos, como o reconhecimento por proteínas ligadoras de metil-CpG. Por outro lado estes sítios aparecem consistentemente metilados em células Th1, produtoras de altos níveis de IFN- γ , o que pode sugerir que a metilação nestes sítios não estaria associada à repressão gênica. O contexto epigenético em que um dado gene é regulado depende da ação conjunta de diversos mecanismos de remodelamento de cromatina, de forma que a investigação de outros mecanismos associados à metilação ou não destes sítios deve ser realizada.

Em um trabalho de 1992, Larsen e colaboradores analisaram a presença de ilhas CpG em 375 genes humanos e a maioria das 240 ilhas CpG identificadas compreendiam além da região promotora, também o primeiro éxon destes genes. Essa situação foi mais freqüente em genes tecido-específicos do que nos genes ditos constitutivos, o que pode sugerir um papel da metilação destas regiões 3' na regulação gênica. No entanto são necessários mais estudos sobre o efeito da metilação destas regiões no padrão de expressão destes genes. Por exemplo, o gene *APOE* humano apresenta uma ilha CpG localizada no éxon 4, no entanto a metilação desta região não silencia sua transcrição (revisado por JONES, 1999).

Como já comentado anteriormente, também não está totalmente claro na literatura o papel da metilação em apenas um ou poucos sítios CpG na regulação gênica. As primeiras evidências de que a metilação em um único sítio CpG poderia afetar a regulação gênica, vieram com estudos com o vírus Epstein-Bar que sugeriram que a metilação de 2 sítios é suficiente para reduzir fortemente a atividade de seu promotor (ROBERTSON *et al.*, 1995).

Em nosso trabalho, também identificamos diferenças discretas no padrão de metilação do sítio CpG -58, localizado na região HSI-4. Este sítio encontra-se não metilado tanto em células T CD4 *naive* como T CD8 *naive* e permanece assim

mesmo após ativação, sugerindo em um primeiro momento que a regulação através da metilação deste sítio não seja responsável pela expressão diferencial de *Irfng* observada nestas células. No entanto quando analisamos o padrão de metilação deste sítio em células T *helper*, observamos que durante a diferenciação para um fenótipo efetor, este sítio torna-se metilado e após o re-estímulo ele permanece metilado somente em células Th2. Há uma clara redução no número de clones metilados neste sítio em células Th1, 72 horas após o estímulo via TCR, como observado durante toda a cinética de células T CD4 e T CD8. Em 2006, Jones e Chen mostraram que a metilação deste sítio causa o deslocamento dos fatores transcricionais ATF2/C-jun e contribui no silenciamento da expressão de *Irfng*. Uma diminuição da metilação neste sítio em células Th1 e um aumento de metilação em células Th2 corrobora estes dados. Além disso, nossos dados sugerem que como este sítio não está metilado em células T CD4 e CD8, estas células apresentem potencial para a transcrição de *Irfng*. Mecanismos adicionais de regulação da expressão gênica devem estar associados à metilação ou não deste sítio, na regulação da expressão de *Irfng*. É importante ressaltar que este sítio localiza-se na região HSI-4 citada anteriormente, sugerindo que somente em células T CD8 e Th1 a cromatina nesta região esteja acessível à transcrição. Então por mais que este sítio não esteja metilado em células T CD4, nessas células este CpG está contido em uma região que parece estar inacessível a maquinaria de transcrição, como visto pelo nosso experimento de hipersensibilidade a DNase I.

Nossos resultados sugerem que o estado de metilação do promotor do *Irfng* não está diretamente relacionado à expressão rápida deste gene em células T CD8 e Th1, quando comparado às células T CD4, uma vez que especialmente o padrão de metilação observado em células T CD4 e células T CD8 recém isoladas é bastante semelhante. Porém não está excluída a possibilidade que os sítios -58; +12 e +114 desempenhem algum papel nessa regulação diferencial. Além disso, outros mecanismos epigenéticos ou mesmo a metilação em outras regiões regulatórias podem interferir na regulação da expressão do IFN- γ por essas células.

Sabe-se que a regulação da expressão de *Irfng* é altamente dependente de regiões regulatórias distais. O trabalho de SCHOENBORN e colaboradores (2007) identificou um total de 8 CNS localizadas em uma região flanqueadora do gene *Irfng* de aproximadamente 100 kb. Dentre estas, estão a CNS1, CNS2 e CNS-22 anteriormente identificadas. Neste trabalho eles analisaram o padrão metilação destas regiões em células T CD4, Th1 e Th2. A região que apresentou uma

diferença mais acentuada foi a CNS1: em células T CD4 e Th2 a região está consistentemente metilada; em células Th1 está consistentemente demetilada. É interessante comentar que neste trabalho também foi analisada a metilação de dinucleotídeos CpG na região promotora de *Irfng*. No entanto eles analisam somente o padrão de metilação em células não-ativadas e não analisaram o sítio +114. Nossas análises da metilação do promotor em células não-ativadas corroboram esse trabalho.

Dada a importância da região CNS1 na regulação de *Irfng*, exercendo papel de *enhancer* (SHNYREVA & WILSON, 2004), optamos por analisar o padrão de metilação dessa região também em células T CD8 e após o estímulo de células T com anti-CD3. Esta região compreende 18 sítios CpG e todos foram analisados. É importante ressaltar que na região CNS1 já foram identificadas também modificações de histonas favoráveis à transcrição em células Th1 (SHNYREVA & WILSON, 2004). Surpreendentemente, nos tempos analisados observamos o mesmo padrão de metilação em todos os tipos celulares: todos os sítios CpG analisados estão metilados antes e após 3 horas de ativação com anti-CD3 (Fig 4.12). Ou seja, a metilação desta região não parece estar relacionada à expressão diferencial de IFN- γ por células T CD4 e T CD8. Mais uma vez, como o estado transcricional de um gene é resultante de diversos processos epigenéticos atuando conjuntamente, nem sempre a metilação de citosinas reflete-se na repressão transcricional. É possível também que a CNS1 só venha a estar demetilada em tempos mais posteriores à ativação e seja necessária não para o início rápido da indução de IFN- γ nestas células, mas sim para a transcrição constante e em níveis elevados em tempos mais tardios. São necessárias análises em tempos como 24, 48 e 72 horas após ativação para verificarmos essa hipótese.

Nossos resultados da análise da metilação desta região em células Th1 não corroboraram com o que já foi descrito na literatura. Acreditamos que isso possa ser consequência de variações do modelo experimental de diferenciação *in vitro* de células T CD4 em Th1/Th2. De qualquer forma, nosso modelo está bem padronizado e observamos claramente a diferenciação de células T CD4 para um fenótipo Th1 quando as condições apropriadas são oferecidas (Fig 4.3). Sendo assim, pelo menos em nosso modelo, a metilação desta região CNS1 não reprime a expressão de IFN- γ , visto que a região está completamente metilada em células Th1.

Desta forma, outras regiões regulatórias podem apresentar um padrão de metilação que explique a diferença na produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8

frente a um mesmo estímulo e outros mecanismos epigenéticos podem também estar envolvidos de forma que novos estudos são necessários para esclarecermos essas questões. Um exemplo é o intron 1 de *Ifng* que apresenta-se demetilado em células NK (TATO *et al.*, 2004), metilado em células Th2 e T CD4 *naive* e parcialmente metilado em células Th1 (SCHOENBORN *et al.*, 2007). A análise do padrão de metilação desta região também em células T CD8 seria bastante interessante.

Por fim, fomos avaliar a função regulatória que a região HSI-4 poderia desempenhar na regulação de *Ifng*. Identificamos nesta região, diversos sítios putativos para ligação de uma grande variedade de fatores de transcrição, dentre os quais destacamos aqueles com funções biológicas já conhecidas na regulação da expressão de IFN- γ , tanto positivamente quanto negativamente (Fig 4.13). Ressaltamos também a proteína Jarid1b pela sua importância na regulação epigenética, ao atuar demetilando H3K4 metiladas (SEWARD *et al.*, 2007), uma marca de cromatina ativa transcricionalmente. Até o momento, existem poucos estudos envolvendo esta enzima demetilase de histonas, mas é possível que em células Th2 e T CD4 ela seja recrutada para a região HSI-4 tornando a cromatina nessa região mais inacessível à transcrição e auxiliando no silenciamento da expressão de *Ifng* nestas células. Nós também identificamos um sítio para a ligação de Oct-1. Este fator transcricional pertence a família de fatores transcricionais POU, que inclui Oct4, um importante fator associado a células-tronco embrionárias. Não existem muitos relatos na literatura sobre a função de Oct1 na regulação da expressão de citocinas, mas um trabalho recente sugeriu uma importante função na regulação de IL-2 (SHAKYA *et al.*, 2010). Quando células T CD4 *naive* são estimuladas, Oct1 sofre modificações dependentes da via de MAPK, que desviam a regulação repressiva de Oct1 pela interação com o complexo NuRD, para uma regulação anti-repressiva, ao recrutar a enzima demetilase de H3K9, Jmjd1a. Desta forma eles mostraram que a regulação da expressão gênica por Oct1 depende do contexto celular tornando-o um candidato promissor na regulação diferencial da expressão de *Ifng* em células T CD4 e T CD8.

Nossos ensaios de luciferase mostraram que interessantemente, uma pequena região compreendida na região HSI-4 é capaz de induzir claramente a expressão do repórter após estímulo com PMA e ionomicina, evidenciando que esta região regule positivamente a expressão de *Ifng* (Fig 4.14). Além disso, quando 69 pb desta região são deletados há uma drástica redução na expressão da luciferase,

demonstrando que a sequência compreendida entre -108 e -39 pb do promotor de *Irfng* tenha de fato uma importante função regulatória. Esta sequência inclui sítios de ligação para NFAT, T-bet e ATF2, fatores transcricionais importantes na ativação da expressão de *Irfng*.

Um trabalho anterior já havia identificado dentro dessa região de -108 a -39 pb a presença de uma sequência evolutivamente conservada (-77 a -52 pb). Em ensaios de luciferase foi mostrado que uma construção contendo duas cópias *in tandem* dessa sequência era capaz de induzir o repórter de forma semelhante ao promotor completo de *Irfng* (PENIX *et al.*, 1996). Além disso, quando 10 pb são deletados dentro dessa região (-61 a -52 pb) há uma drástica redução na indução mediada pelo promotor completo de *Irfng* (PENIX *et al.*, 1993). É interessante ressaltar que nesta região está localizado o CpG -58 discutido anteriormente.

Dessa forma, mostramos pela primeira vez, que essa importante região envolvida na regulação positiva da expressão de *Irfng* está localizada em uma região aparentemente acessível em células Th1 e células T CD8, justamente os linfócitos T que produzem grandes quantidades de IFN- γ após ativação. Por outro lado em células Th2 e T CD4 esta região apresenta a cromatina mais fechada. É possível então que essa seja uma das regulações envolvidas na expressão diferencial de IFN- γ por linfócitos T CD4 e T CD8 frente a um mesmo estímulo. Ressaltamos que um sítio CpG localizado nesta região (CpG -58) também possa ter um importante papel, uma vez que a metilação deste sítio está associada a repressão da expressão de *Irfng* (JONES *et al.*, 2006), e este sítio encontra-se demetilado em células T CD8. Em células T CD4, embora o sítio também esteja demetilado, este CpG encontra-se em uma região cuja cromatina está menos acessível.

Em conclusão, este trabalho mostrou que frente a um mesmo estímulo há uma produção diferencial de IFN- γ por células T CD4 e T CD8 e que esta expressão diferencial é refletida ao nível transcricional. Enquanto células T CD4 só produzem quantidades significativas de IFN- γ após diferenciação para um perfil Th1; células T CD8 e Th1 são rapidamente induzidas a produzirem grandes quantidades do mRNA de IFN- γ após o estímulo. Esta expressão diferencial pode ser regulada pela acessibilidade a uma região localizada no promotor prozimal de *Irfng* (região HSI-4), que está mais acessível em células T CD8 e Th1 do que em células T CD4 e células Th2. De fato, uma pequena região contida na região HSI-4 regula positivamente o gene *Irfng* e a região entre -108 pb e -39 pb é necessária para essa regulação. No entanto, a expressão diferencial de IFN- γ nestas células não parece correlacionar-se

com a metilação de dinucleotídeos CpG na região promotora do gene *Ifng*, que inclui esta região HSI-4. Contudo o real papel biológico de alguns sítios CpG deve ser melhor investigado, especialmente os sítios +12 e +114 que estão menos metilados em células T CD8 do que em células T CD4, e o sítio -58 que localiza-se na região HSI-4. Outras regiões cuja acessibilidade da cromatina não está associada à produção de IFN- γ não devem estar envolvidas nesta regulação diferencial. Da mesma forma, a metilação do *enhancer* de *Ifng*, CNS1, não parece estar associada à repressão de IFN- γ , uma vez que esta região está completamente metilada em todos os tipos celulares analisados, incluindo células Th1 e células T CD8.

Esse projeto se propôs a colaborar com o entendimento da regulação diferencial de IFN- γ em linfócitos T. A princípio esta diferença parece estar relacionada à região do promotor proximal, HSI-4. No entanto são necessários mais estudos para avaliarmos o papel de outros mecanismos epigenéticos neste processo. Uma vez que mecanismos epigenéticos estão associados com diversos aspectos do sistema imunológico e também no desenvolvimento de alguns cânceres humanos, a identificação destes na regulação da expressão gênica em células do sistema imune tornam-se cada vez mais importantes. Neste contexto, destaca-se a importância da citocina IFN- γ , crucial para a imunidade contra patógenos intracelulares e para o controle do desenvolvimento tumoral. Após a malignização as células tumorais devem ser capazes de escapar dos mecanismos de defesa do organismo e falhas do sistema imunológico podem ser decisivas para o estabelecimento do tumor. Os níveis de IFN- γ produzidos por células T CD4 e T CD8 participam de diversas etapas da montagem de uma resposta imune tumoral eficiente e a produção aberrante ou defeito na sinalização desta citocina leva à alterações no crescimento celular e diferenciação, que podem culminar com o estabelecimento de tumores. De fato, quando células T CD4 infiltrantes de tumores de colon de pacientes humanos são tratadas *in vitro* com 5-Azacitidina, há um aumento na expressão de IFN- γ entre 4-35 vezes, sugerindo que a metilação de regiões regulatórias de *Ifng* possa limitar a produção de IFN- γ por essas células, favorecendo a sobrevivência das células tumorais (JANSON *et al.*, 2008). Desta forma, o conhecimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da sua expressão por células T contribuirá para uma melhor compreensão destas vias. Estes conhecimentos poderão contribuir com o maior entendimento da imunologia tumoral e de doenças relacionadas tanto a respostas Th2, quanto Th1.

6. CONCLUSÕES

- 6.1.** Células T CD4 e T CD8 *naive* produzem IFN- γ diferencialmente. Enquanto células T CD4 só produzem IFN- γ após diferenciação para um fenótipo Th1, células T CD8 produzem essa citocina rapidamente após ativação;
- 6.2.** A produção diferencial de IFN- γ por células T CD4 e T CD8 é refletida ao nível transcricional;
- 6.3.** Células T CD8 e Th1 apresentam a região do promotor proximal (HSI-4) hipersensível a DNase I, diferentemente de células T CD4 e Th2, sugerindo que esta região esteja acessível à maquinaria de transcrição somente em células T CD8 e Th1;
- 6.4.** A região HSIII-2, localizada no intron 3 de *Ifng*, aparece hipersensível em células T CD4, T CD8 e Th1, estando com a cromatina inacessível somente em células Th2.
- 6.5.** Diversas regiões no promotor, intron 1 e intron 3 de *Ifng* apresentaram-se hipersensíveis a DNase I, independente do tipo celular e produção de IFN- γ , sugerindo que essas regiões não estejam envolvidas na regulação diferencial de *Ifng* em células T CD4 e T CD8;
- 6.6.** A metilação de sítios CpG na região promotora de *Ifng* não parece estar relacionada a expressão diferencial de IFN- γ por células T CD4 e T CD8, mas o papel dos sítios -58; +12 e +114 deve ser melhor investigado;
- 6.7.** A metilação de sítios CpG no *enhancer* CNS1 não está relacionada a expressão diferencial de IFN- γ por células T CD4 e T CD8;
- 6.8.** A região HSI-4 regula positivamente a expressão de *Ifng in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D. Conserved sequences and the evolution of gene regulatory signals. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 6, p. 628-33, Dez 2005.
- AFKARIAN, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. **Nat Immunol**, v. 3, n. 6, p. 549-57, Jun 2002.
- AGARWAL, S.; AVNI, O.; RAO, A. Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 643-52, Jun 2000.
- AGARWAL, S.; RAO, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. **Immunity**, v. 9, n. 6, p. 765-75, Dez 1998.
- AKIMZHANOV, A. M.; YANG, X. O.; DONG, C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 9, p. 5969-72, 2 Mar 2007.
- ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 51, p. 786-94, Maio 1964.
- ANSEL, K. M. *et al.* Deletion of a conserved Il4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. **Nat Immunol**, v. 5, n. 12, p. 1251-9, Dez 2004.
- ANTEQUERA, F.; BIRD, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 24, p. 11995-9, 15 Dez 1993.
- ARAMBURU, J. *et al.* Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. **J Exp Med**, v. 182, n. 3, p. 801-10, 1 Set 1995.
- AVNI, O. *et al.* T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. **Nat Immunol**, v. 3, n. 7, p. 643-51, Jul 2002.
- BALASUBRAMANI, A. *et al.* Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls Ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. **Immunity**, v. 33, n. 1, p. 35-47, 23 Jul 2010.
- BALLAS, Z. K. The use of 5-azacytidine to establish constitutive interleukin 2-producing clones of the EL4 thymoma. **J Immunol**, v. 133, n. 1, p. 7-9, Jul 1984.
- BELL, O. *et al.* Determinants and dynamics of genome accessibility. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 8, p. 554-64, Ago 2011.
- BHATTACHARYA, S. K. *et al.* A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. **Nature**, v. 397, n. 6720, p. 579-83, 18 Feb 1999.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 2, p. 97-113, Abr 2009.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 2, p. 97-113, Abr 2009.
- BIRD, A. P. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. **J Mol Biol**, v. 118, n. 1, p. 49-60, 5 Jan 1978.
- BIRD, J. J. *et al.* Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. **Immunity**, v. 9, n. 2, p. 229-37, Ago 1998.

- BOEHM, U. *et al.* Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 749-95, 1997.
- BOGDANOVIC, O.; VEENSTRA, G. J. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromosoma**, v. 118, n. 5, p. 549-65, Out 2009.
- BRADLEY, L. M.; DALTON, D. K.; CROFT, M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. **J Immunol**, v. 157, n. 4, p. 1350-8, 15 Ago 1996.
- BRANDEIS, M. *et al.* Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. **Nature**, v. 371, n. 6496, p. 435-8, 29 Set 1994.
- BROWN, C. E. *et al.* The many HATs of transcription coactivators. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 1, p. 15-9, Jan 2000.
- BRUNIQUEL, D.; SCHWARTZ, R. H. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. **Nat Immunol**, v. 4, n. 3, p. 235-40, Mar 2003.
- CAMPANERO, M. R.; ARMSTRONG, M. I.; FLEMINGTON, E. K. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 12, p. 6481-6, 6 Jun 2000.
- CAO, R. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 1039-43, 1 Nov 2002.
- CARTER, L. L.; MURPHY, K. M. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. **J Exp Med**, v. 189, n. 8, p. 1355-60, 19 Abr 1999.
- CARTHARIUS, K. *et al.* MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinformatics**, v. 21, n. 13, p. 2933-42, 1 Jul 2005.
- CHANG, S.; AUNE, T. M. Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of T helper type 2 cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 7, p. 723-31, Jul 2007.
- CHANG, S.; AUNE, T. M. Histone hyperacetylated domains across the *Irfng* gene region in natural killer cells and T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 47, p. 17095-100, 22 Nov 2005.
- CHEN, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med**, v. 198, n. 12, p. 1875-86, 15 Dez 2003.
- CHI, T. H. *et al.* Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 195-9, 11 Jul 2002.
- CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 273-304, 2009.
- CORN, R. A. *et al.* T cell-intrinsic requirement for NF-kappa B induction in postdifferentiation IFN-gamma production and clonal expansion in a Th1 response. **J Immunol**, v. 171, n. 4, p. 1816-24, 15 Ago 2003.
- COSMA, M. P.; TANAKA, T.; NASMYTH, K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. **Cell**, v. 97, n. 3, p. 299-311, 30 Abr 1999.
- COSTA, F. F. *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481-8, 19 Feb 2004.
- DARDALHON, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 12, p. 1347-55, Dez 2008.

- DE CARVALHO, D. D.; YOU, J. S.; JONES, P. A. DNA methylation and cellular reprogramming. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 10, p. 609-17, Out 2010.
- DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev**, v. 25, n. 10, p. 1010-22, 15 Mai 2011.
- DENSLOW, S. A.; WADE, P. A. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5433-8, 13 Ago 2007.
- DHALLUIN, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 491-6, 3 Jun 1999.
- DJURETIC, I. M. *et al.* Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Irfng* and silence *Irf4* in T helper type 1 cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 2, p. 145-53, Fev 2007.
- EALICK, S. E. *et al.* Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. **Science**, v. 252, n. 5006, p. 698-702, 3 Maio 1991.
- EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, 27 Maio 2004.
- EISSENBERG, J. C. Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. **Gene**, v. 275, n. 1, p. 19-29, 5 Set 2001.
- FAN, H. Y. *et al.* Distinct strategies to make nucleosomal DNA accessible. **Mol Cell**, v. 11, n. 5, p. 1311-22, Mai 2003.
- FAZILLEAU, N. *et al.* Follicular helper T cells: lineage and location. **Immunity**, v. 30, n. 3, p. 324-35, 20 Mar 2009.
- FIELDS, P. E.; KIM, S. T.; FLAVELL, R. A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 647-50, 15 Jul 2002.
- FITZPATRICK, D. R.; WILSON, C. B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clin Immunol**, v. 109, n. 1, p. 37-45, Out 2003.
- FYODOROV, D. V. *et al.* Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. **Genes Dev**, v. 18, n. 2, p. 170-83, 15 Jan 2004.
- GLIMCHER, L. H. *et al.* Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 11, p. 900-11, Nov 2004.
- GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J Exp Med**, v. 195, n. 11, p. 1499-505, 3 Jun 2002.
- GOWHER, H. *et al.* Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 13341-8, 8 Abr 2005.
- GRENNINGLOH, R.; KANG, B. Y.; HO, I. C. Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses. **J Exp Med**, v. 201, n. 4, p. 615-26, 21 Fev 2005.
- GROGAN, J. L. *et al.* Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. **Immunity**, v. 14, n. 3, p. 205-15, Mar 2001.
- GRONBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1039-59, Out 2007.
- GUO, J. U. *et al.* Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 423-34, 29 Abr 2011
- HARDISON, R. C. Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. **Trends Genet**, v. 16, n. 9, p. 369-72, Set 2000.

- HARGREAVES, D. C.; CRABTREE, G. R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. **Cell Res**, v. 21, n. 3, p. 396-420, Mar 2011.
- HARRINGTON, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.
- HATA, K. *et al.* Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. **Development**, v. 129, n. 8, p. 1983-93, Abr 2002.
- HATTON, R. D. *et al.* A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. **Immunity**, v. 25, n. 5, p. 717-29, Nov 2006.
- HO, I. C. *et al.* The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. **Cell**, v. 85, n. 7, p. 973-83, 28 Jun 1996.
- HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, v. 187, n. 4173, p. 226-32, 24 Jan 1975.
- HUTCHINS, A. S. *et al.* Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. **Mol Cell**, v. 10, n. 1, p. 81-91, Jul 2002.
- HWANG, E. S. *et al.* T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 430-3, 21 Jan 2005.
- INTLEKOFER, A. M. *et al.* Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1236-44, Dez 2005.
- ITOH, M. *et al.* Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5317-26, 1 Mai 1999.
- JANSON, P. C. *et al.* CpG methylation of the IFNG gene as a mechanism to induce immunosuppression in tumor-infiltrating lymphocytes. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2878-86, 15 Ago 2008.
- JANSON, P. C.; WINERDAL, M. E.; WINQVIST, O. At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 9, p. 906-19, Set 2009.
- JIN, C. *et al.* H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. **Nat Genet**, v. 41, n. 8, p. 941-5, Ago 2009.
- JONES, B.; CHEN, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. **EMBO J**, v. 25, n. 11, p. 2443-52, 7 Jun 2006.
- JONES, P. A. The DNA methylation paradox. **Trends Genet**, v. 15, n. 1, p. 34-7, Jan 1999.
- JONES, P. L. *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, v. 19, n. 2, p. 187-91, Jun 1998.
- KAMIJO, R. *et al.* Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1612-5, 18 Mar 1994.
- KANNO, Y. *et al.* Transcriptional and Epigenetic Control of T Helper Cell Specification: Molecular Mechanisms Underlying Commitment and Plasticity. **Annu Rev Immunol**, 24 Mar 2011.
- KAPLAN, D. H. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 13, p. 7556-61, 23 Jun 1998.
- KHORASANIZADEH, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 259-72, 23 Jan 2004.

- KIM, H. P.; LEONARD, W. J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. **J Exp Med**, v. 204, n. 7, p. 1543-51, 9 Jul 2007.
- KIM, J. I. *et al.* The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. **Immunity**, v. 10, n. 6, p. 745-51, Jun 1999.
- KIM, S. T.; FIELDS, P. E.; FLAVELL, R. A. Demethylation of a specific hypersensitive site in the Th2 locus control region. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17052-7, 23 Out 2007.
- KORNBERG, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. **Science**, v. 184, n. 4139, p. 868-71, 24 Mai 1974.
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 23 Feb 2007.
- KURATA, H. *et al.* Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 677-88, Dez 1999.
- KURATA, H. *et al.* Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 677-88, Dez 1999.
- LAL, G. *et al.* Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. **J Immunol**, v. 182, n. 1, p. 259-73, 1 Jan 2009.
- LARSEN, F. *et al.* CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095-107, Ago 1992.
- LAZAREVIC, V. *et al.* T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. **Nat Immunol**, v. 12, n. 1, p. 96-104, Jan 2011.
- LEE, C. E.; YOON, S. R.; PYUN, K. H. Mechanism of interferon-gamma down-regulation of the interleukin 4-induced CD23/Fc epsilon RII expression in human B cells: post-transcriptional modulation by interferon-gamma. **Mol Immunol**, v. 30, n. 3, p. 301-7, Feb 1993.
- LEE, D. U. *et al.* A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 4802-10, 6 Feb 2004.
- LEE, D. U.; AGARWAL, S.; RAO, A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. **Immunity**, v. 16, n. 5, p. 649-60, Maio 2002.
- LEE, H. J. *et al.* GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. **J Exp Med**, v. 192, n. 1, p. 105-15, 3 Jul 2000.
- LEE, P. P. *et al.* A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 763-74, Nov 2001.
- LEE, Y. K. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 92-107, 16 Jan 2009.
- LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 707-19, 23 Feb 2007.
- LIANG, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med**, v. 203, n. 10, p. 2271-9, 2 Out 2006.
- LIGHVANI, A. A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15137-42, 18 Dez 2001.
- LIN, C. J.; TAM, R. C. Transcriptional regulation of CD28 expression by CD28GR, a novel promoter element located in exon 1 of the CD28 gene. **J Immunol**, v. 166, n. 10, p. 6134-43, 15 Maio 2001.

- LOGIE, C.; PETERSON, C. L. Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. **EMBO J**, v. 16, n. 22, p. 6772-82, 17 Nov 1997.
- LUO, D. *et al.* Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. **Lab Invest**, v. 86, n. 6, p. 591-8, Jun 2006.
- MAKAR, K. W.; WILSON, C. B. DNA methylation is a nonredundant repressor of the Th2 effector program. **J Immunol**, v. 173, n. 7, p. 4402-6, 1 Out 2004.
- MCARTHUR, M.; GERUM, S.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Quantification of DNaseI-sensitivity by real-time PCR: quantitative analysis of DNaseI-hypersensitivity of the mouse beta-globin LCR. **J Mol Biol**, v. 313, n. 1, p. 27-34, 12 Out 2001.
- METIVIER, R. *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. **Nature**, v. 452, n. 7183, p. 45-50, 6 Mar 2008.
- MILLER, S. A. *et al.* Coordinated but physically separable interaction with H3K27-demethylase and H3K4-methyltransferase activities are required for T-box protein-mediated activation of developmental gene expression. **Genes Dev**, v. 22, n. 21, p. 2980-93, 1 Nov 2008.
- MILNE, T. A. *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. **Mol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1107-17, Nov 2002.
- MITO, Y.; HENIKOFF, J. G.; HENIKOFF, S. Histone replacement marks the boundaries of cis-regulatory domains. **Science**, v. 315, n. 5817, p. 1408-11, 9 Mar 2007.
- MIZUGUCHI, G. *et al.* ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. **Science**, v. 303, n. 5656, p. 343-8, 16 Jan 2004.
- MOHANDAS, T.; SPARKES, R. S.; SHAPIRO, L. J. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. **Science**, v. 211, n. 4480, p. 393-6, 23 Jan 1981.
- MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348-57, 1 Abr 1986.
- MULLEN, A. C. *et al.* Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. **Nat Immunol**, v. 3, n. 7, p. 652-8, Jul 2002.
- MUNSHI, A. *et al.* Histone modifications dictate specific biological readouts. **J Genet Genomics**, v. 36, n. 2, p. 75-88, Feb 2009.
- NAN, X.; CAMPOY, F. J.; BIRD, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 471-81, 21 Feb 1997.
- NAOE, Y. *et al.* Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbfbeta binding to the Ii4 silencer. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1749-55, 6 Ago 2007.
- NEELY, K. E. *et al.* Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 6, p. 1615-25, Mar 2002.
- NURIEVA, R. I. *et al.* Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 138-49, 18 Jul 2008.
- OKANO, M. *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-57, 29 Out 1999.
- OOI, S. K. *et al.* DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 714-7, 9 Ago 2007.
- OOI, S. K.; BESTOR, T. H. The colorful history of active DNA demethylation. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1145-8, 27 Jun 2008.

- PARK, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1133-41, Nov 2005.
- PEARCE, E. L. *et al.* Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1041-3, 7 Nov 2003.
- PENIX, L. *et al.* Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells. **J Exp Med**, v. 178, n. 5, p. 1483-96, 1 Nov 1993.
- PENIX, L. A. *et al.* The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. **J Biol Chem**, v. 271, n. 50, p. 31964-72, 13 Dez 1996.
- PIATTI, P.; ZEILNER, A.; LUSSER, A. ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factors and Their Roles in Affecting Nucleosome Fiber Composition. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 10, p. 6544-65, 2011.
- PLACEK, K. *et al.* Integration of distinct intracellular signaling pathways at distal regulatory elements directs T-bet expression in human CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 7743-51, 15 Dez 2009.
- PROKHORTCHOUK, A. *et al.* The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. **Genes Dev**, v. 15, n. 13, p. 1613-8, 1 Jul 2001.
- RIGGS, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet Cell Genet**, v. 14, n. 1, p. 9-25, 1975.
- ROBERTSON, K. D. *et al.* Transcriptional activation of the Epstein-Barr virus latency C promoter after 5-azacytidine treatment: evidence that demethylation at a single CpG site is crucial. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 6150-9, Nov 1995.
- ROGUEV, A. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. **EMBO J**, v. 20, n. 24, p. 7137-48, 17 Dez 2001.
- ROTTACH, A.; LEONHARDT, H.; SPADA, F. DNA methylation-mediated epigenetic control. **J Cell Biochem**, v. 108, n. 1, p. 43-51, 1 Set 2009.
- ROUSSET, F. *et al.* Regulation of Fc receptor for IgE (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and IFN-gamma. **J Immunol**, v. 140, n. 8, p. 2625-32, 15 Abr 1988.
- SAKAGUCHI, S. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1151-64, 1 Ago 1995.
- SARRAF, S. A.; STANCHEVA, I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. **Mol Cell**, v. 15, n. 4, p. 595-605, 27 Ago 2004.
- SAWALHA, A. H. Epigenetics and T-cell immunity. **Autoimmunity**, v. 41, n. 4, p. 245-52, Maio 2008.
- SCHOENBORN, J. R. *et al.* Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. **Nat Immunol**, v. 8, n. 7, p. 732-42, Jul 2007.
- SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, Fev 2004.
- SEGAL, E.; WIDOM, J. What controls nucleosome positions? **Trends Genet**, v. 25, n. 8, p. 335-43, Ago 2009.
- SEKO, Y. *et al.* The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 5, p. 299-305, Mai 2006.
- SEWARD, D. J. *et al.* Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 3, p. 240-2, Mar 2007.

- SHAKYA, A. *et al.* Oct1 is a switchable, bipotential stabilizer of repressed and inducible transcriptional states. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 450-9, 7 Jan 2011.
- SHAO, J. *et al.* [Expression of cellular phenotype switching markers-matrix protein Gla, mRNA and collagen I, III and V of human airway smooth muscle cells in vitro after TGF-beta1 stimulation]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**, v. 44, n. 7, p. 531-4, Jul 2006.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, Jan 2010.
- SHEVACH, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 195-201, Ago 2006.
- SHI, M. *et al.* Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the *lfn* locus during T helper 1 cell differentiation. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 763-73, Jun 2008.
- SHI, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941-53, 29 Dez 2004.
- SHNYREVA, M. *et al.* Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 34, p. 12622-7, 24 Ago 2004.
- SICA, A. *et al.* Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. **J Biol Chem**, v. 272, n. 48, p. 30412-20, 28 Nov 1997.
- SIMS, S. H. *et al.* A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 1, p. 690-702, Jan 1993.
- SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-7, 22 Mai 1987.
- SOUTTO, M.; ZHOU, W.; AUNE, T. M. Cutting edge: distal regulatory elements are required to achieve selective expression of IFN-gamma in Th1/Tc1 effector cells. **J Immunol**, v. 169, n. 12, p. 6664-7, 15 Dez 2002.
- SPILIANAKIS, C. G. *et al.* Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 637-45, 2 Jun 2005.
- STERNER, D. E.; BERGER, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 2, p. 435-59, Jun 2000.
- STETSON, D. B. *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. **J Exp Med**, v. 198, n. 7, p. 1069-76, 6 Out 2003.
- SUETAKE, I. *et al.* DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. **J Biol Chem**, v. 279, n. 26, p. 27816-23, 25 Jun 2004.
- SULLIVAN, B. M. *et al.* Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 26, p. 15818-23, 23 Dez 2003.
- SWEETSER, M. T. *et al.* The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon-gamma promoter in T cells. **J Biol Chem**, v. 273, n. 52, p. 34775-83, 25 Dez 1998.
- SZABO, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, 17 Mar 2000.
- SZABO, S. J. *et al.* Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, v. 295, n. 5553, p. 338-42, 11 Jan 2002.
- TAHILIANI, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930-5, 15 Maio 2009.

- TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3740-5, 19 Mar 2002.
- TANAY, A. *et al.* Hyperconserved CpG domains underlie Polycomb-binding sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 13, p. 5521-6, 27 Mar 2007.
- TATO, C. M. *et al.* Cutting Edge: Innate production of IFN-gamma by NK cells is independent of epigenetic modification of the IFN-gamma promoter. **J Immunol**, v. 173, n. 3, p. 1514-7, 1 Ago 2004.
- TATO, C. M. *et al.* Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3139-46, 15 Mar 2003.
- TATO, C. M. *et al.* Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma. **Int Immunol**, v. 18, n. 4, p. 505-13, Abr 2006.
- TAUNTON, J.; HASSIG, C. A.; SCHREIBER, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. **Science**, v. 272, n. 5260, p. 408-11, 19 Abr 1996
- TEIXEIRA, L. K. *et al.* IFN-gamma production by CD4+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 5931-9, 1 Nov 2005.
- THOMA, F.; KOLLER, T.; KLUG, A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. **J Cell Biol**, v. 83, n. 2 Pt 1, p. 403-27, Nov 1979.
- TONG, J. K. *et al.* Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 917-21, 29 Out 1998.
- TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, p. 179-90, Mar 2007.
- USUI, T. *et al.* GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. **Immunity**, v. 18, n. 3, p. 415-28, Mar 2003.
- VELDHOEN, M. *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nat Immunol**, v. 9, n. 12, p. 1341-6, Dez 2008.
- VETTESE-DADEY, M. *et al.* Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. **EMBO J**, v. 15, n. 10, p. 2508-18, 15 Maio 1996.
- WADE, P. A. *et al.* Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. **Nat Genet**, v. 23, n. 1, p. 62-6, Set 1999.
- WEI, G. *et al.* Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 155-67, 16 Jan 2009.
- WILSON, C. B. *et al.* DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. **Semin Immunol**, v. 17, n. 2, p. 105-19, Abr 2005.
- WILSON, C. B.; ROWELL, E.; SEKIMATA, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 2, p. 91-105, Fev 2009.
- WINDERS, B. R.; SCHWARTZ, R. H.; BRUNIQUEL, D. A distinct region of the murine IFN-gamma promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naive and Th1 cell differentiation, but is hypermethylated in Th2 cells. **J Immunol**, v. 173, n. 12, p. 7377-84, Dec 15 2004.
- WOLFFE, A. P.; MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 481-6, 15 Out 1999.
- WU, H. *et al.* Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 389-93, 19 Mai 2011.

- WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes Dev**, v. 25, n. 23, p. 2436-52, 1 Dez 2011.
- YANG, J. *et al.* IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. **Nat Immunol**, v. 2, n. 2, p. 157-64, Fev 2001.
- YANG, J. G. *et al.* The chromatin-remodeling enzyme ACF is an ATP-dependent DNA length sensor that regulates nucleosome spacing. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 12, p. 1078-83, Dez2006.
- YANG, X. J.; SETO, E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 2, p. 143-53, Abr 2003.
- YOUNG, H. A. *et al.* Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-gamma gene. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3603-10, 15 Out 1994.
- YU, J. *et al.* Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 575-90, Maio 2006.
- ZEDIAK, V. P. *et al.* Cutting edge: persistently open chromatin at effector gene loci in resting memory CD8+ T cells independent of transcriptional status. **J Immunol**, v. 186, n. 5, p. 2705-9, 1 Mar 2011.
- ZHANG, F.; BOOTHBY, M. T helper type 1-specific Brg1 recruitment and remodeling of nucleosomes positioned at the IFN-gamma promoter are Stat4 dependent. **J Exp Med**, v. 203, n. 6, p. 1493-505, 12 Jun 2006.
- ZHANG, Y. *et al.* Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. **J Exp Med**, v. 194, n. 2, p. 165-72, 16 Jul 2001.
- ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 587-96, 16 Maio 1997.
- ZHOU, W.; CHANG, S.; AUNE, T. M. Long-range histone acetylation of the Ifng gene is an essential feature of T cell differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 8, p. 2440-5, 24 Fev 2004
- ZHU, H. *et al.* Unexpected characteristics of the IFN-gamma reporters in nontransformed T cells. **J Immunol**, v. 167, n. 2, p. 855-65, 15 Jul 2001.
- ZHU, J. *et al.* Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 11, p. 1157-65, Nov 2004.
- ZHU, J. *et al.* Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 11, p. 1157-65, Nov 2004.
- ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-69, 1 Set 2008.
- ZHU, J.; PAUL, W. E.. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Res**, v. 20, n. 1, p. 4-12, Jan 2010.