UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Vitor Leão

Análise do papel da subunidade c-Rel durante a geração *in vitro* de células T regulatórias induzidas a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical.

Ribeirão Preto
2018

VITOR LEÃO

Análise do papel da subunidade c-Rel durante a geração *in vitro* de células T regulatórias induzidas a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leão, Vitor.

Análise do papel da subunidade c-Rel durante a geração *in vitro* de células T regulatórias induzidas a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical. Ribeirão Preto, 2018, 123 p

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.
Orientador: Panepucci, Rodrigo Alexandre.

Palavras Chave: 1. Linfócito T regulatório induzido - iTreg, 2. T Naive, 3. NF- κ B , 4. c-REL; 5. ChIP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Leão

Análise do papel da subunidade c-Rel durante a geração *in vitro* de células T regulatórias induzidas a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de concentração: Genética

Aprovado em: __/__/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Carlos Alberto e Nilma Augusta, a quem tenho orgulho de chamá-los de pai e mãe,
e a minha irmã Juliane Caroline, e a todos que acreditam em mim.
Por me ensinarem as melhores maneiras de lutar pelos meus objetivos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Papai do Céu. Pela vida, por todas as oportunidades e dificuldades que me foram impostas e assim sendo, por todos os aprendizados obtidos durante essa caminhada, pois sem eles eu não teria tanto crescimento profissional e pessoal, ao qual tem papel principal na formação da pessoa que posso ser hoje.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci pela receptividade em seu laboratório, pelas ideias, argumentos e discussões, assim como pela confiança em mim e, principalmente pela sua orientação e apoio para a conclusão deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Funcional e a todos que ali estão ou passaram, mas que compartilham os momentos únicos e sempre colaboram com sugestões, discussões e companheirismo durante a realização deste trabalho, às técnicas do laboratório Josiane Lillian e Amélia, e não posso deixar de citar as técnicas da Hematologia do HC, que acompanharam o início deste projeto, incluindo Elizabete (Bete), Júlia e Cláudia.

Assim como os demais pós-graduandos que me ajudaram nos projetos com conselhos, dicas e com todo amparo (em todos os aspectos); cito inicialmente aos que já seguiram seus caminhos profissionais além do laboratório, como Bruno, Sarah e Ildercílio e mais recentemente Helder, e aos que continuam no laboratório, como Felipe Canto, Amanda Corvelone, Hudson e Igor. Muito obrigado!

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, pelo curso de excelência. Pela secretária do departamento, Susie Adriana Penha Nalon, por sempre esclarecer minhas dúvidas e tornar muito mais fácil a parte burocrática da pós-graduação.

Gostaria de agradecer também à MATER de Ribeirão Preto, à enfermeira Maria Fernanda Lopes, que realizou todas as coletas de sangue, e a todas as mães que doaram o sangue de cordão umbilical de seus filhos, obrigado ainda aos colaboradores do Hemocentro da Criobiologia, aos colaboradores da Hematologia II, e principalmente a Priscila Santos Scheucher, pela ajuda com as aquisições dos dados de citometria de fluxo no início do projeto, e ao laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro, principalmente à Camila e Patricia pelas conversas e toda ajuda na aquisição e análise dos dados de citometria de fluxo, assim como todos que ajudaram para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

Dentre os colaboradores, agradeço ao centro de medicina Genômica da FMRP-USP, onde foram realizados experimentos de ChIP-seq, em especial Kamila que ajudou em toda questão experimental do sequenciamento das amostras e a Jéssica e Carlos pela ajuda providencial na análise dos dados.

Gostaria de agradecer banca examinadora pela disposição em participar e contribuir para a concretização e o crescimento deste trabalho.

A minha família, a quem dediquei este trabalho e agradeço imensamente por serem a base fundamental para qualquer tipo de crescimento. Agradeço a vocês, por mesmo com pouco conhecimento da área que trabalho, estão sempre perguntando das “minhas celulinhas”. Me orgulho muito de vocês!

A todos os colegas do Biologia Funcional e aos colegas do laboratório das “Primas”, pelas conversas e por toda convivência que tivemos durante todo o período, em especial a “prima” Danielle Brotto, pela toda “turbulência” que causou até agora. Obrigado. Agradeço também as pessoas que conheci nesse período, com quem convivo dentro e fora do laboratório, “Rafa. Beijo!”, Fer, Juh, aos colegas do futebol, Jessica “vizinha”, vocês são fundamentais para a vida. Amigos, muito obrigado!

Agradeço a Capes, pela bolsa de mestrado concedida, aos auxílios do Hemocentro de Ribeirão Preto e do CNPq e da FAEPA

E a todos os demais que de forma direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma com a realização desse trabalho, com minha formação pessoal e com a concretização de um grande sonho. Um agradecimento em especial a todas as pessoas que me amam e que torcem por mim.

“Não precisa me agradecer, na verdade sou eu quem agradeço, pois você, sem perceber, está me ajudando muito mais do que imagina!”

Muito obrigado!

“É preciso sair da ilha para ver a ilha. Não nos vemos se não saímos de nós”

José Saramago

“Há duas maneiras de viver. A forma que o mundo te obriga e a que você se sente bem”

Vitor Leão

RESUMO

Leão, V. **Análise do papel da subunidade c-Rel durante a geração *in vitro* de células T regulatórias induzidas a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical.** [Tese] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018; 123p.

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) desempenham um papel essencial no controle da tolerância periférica, regulando a homeostase do sistema imune, e, por este motivo, são consideradas a população celular - com fenótipo regulatório - mais importante do sistema imune. Sob estímulos específicos, as Tregs podem ser geradas naturalmente no timo (nTregs), ou serem induzidas na periferia (pTreg) a partir de células T naive. É possível gerar Tregs *in vitro* (iTreg) a partir de células T CD4⁺ naive isoladas de sangue de cordão umbilical, suplementando a cultura com TGF- β , atRA e IL-2. Haja vista o grande potencial terapêutico das iTregs, a comunidade científica apresenta grande interesse no entendimento dos mecanismos envolvidos em sua geração. Os mais recentes trabalhos indicam um importante papel da via NF- κ B na geração destas células, especialmente no que tange o componente c-Rel. Entretanto, na literatura, não existem dados suficientes sobre a avaliação dos genes potencialmente orquestrados por este fator. Permeado por todo este questionamento, o presente trabalho avalia a interação de c-Rel com as regiões promotoras do genoma, em células T naive e nas células iTregs geradas *in vitro*. Em adição, também avalia o efeito do silenciamento da proteína c-Rel no perfil de geração das iTregs. Para isso, foi utilizada a metodologia de imunoprecipitação de cromatina atrelada à técnica de PCR em tempo real com primers, que cobrem as regiões promotoras de alguns genes com papel importante na biologia de células T naive e de iTreg. Também foi avaliado a eficiência de transfecção de siRNA contra c-Rel e também do siRNA marcado com molécula fluorescente FITC em conjunto com diferentes concentrações e diferentes reagentes de transfecção, utilizando células Jurkat e T naive. Nossos resultados mostraram uma melhor eficiência de transfecção do siRNA FITC, considerando as células viáveis transfectadas, com os agentes DharmaFECT®1 (22,14%), DharmaFECT®4 (43,14%) e DMRIE-C (27,59%) em células Jurkat e DharmaFECT®1 (16,35%) e DMRIE-C (25,94%) em células T naive, nas maiores concentrações, entretanto não é muito eficiente para a avaliação do silenciamento proteico por qPCR. Além disso demonstramos que em uma pureza média de 80,46% de células T naive isoladas obtivemos a geração das iTregs (CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺) com 98,42%, em média, na expressão do marcador FOXP3, e essas células iTregs apresentam maior ligação de c-Rel aos promotores de genes como IL2RA (CD25) (média de 8,26 vezes), CD69 (3,71 vezes), regiões do gene FOXP3 (região promotora (20,15 vezes), região CNS – kb1 (16,9 vezes), kb2 (17,2 vezes) e kb3 (23,29 vezes)) e do próprio Rel (8,12 vezes). Estes resultados evidenciam os potenciais mecanismos de regulação exercidos por c-Rel, durante o processo de geração das iTregs.

Palavras Chaves: Linfócito T regulatório induzido - iTreg, T Naive, NF- κ B , c-REL; ChIP

ABSTRACT

Leão, V. **Analysis of the c-Rel subunit roles during the *in vitro* regulatory T cells generation induced from umbilical cord blood-naïve T cells.** [Thesis] Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2018; 123p.

Regulatory T lymphocytes (Tregs) play an essential role in the control of peripheral tolerance, regulating the homeostasis of the immune system, and are considered the cellular population - with regulatory phenotype - most important of the immune system. Tregs can be generated naturally in the thymus (nTregs), or be induced at the periphery (pTreg) from naïve T cells, in dependence of specific stimuli. In cell culture, supplemented with factors such as IL-2, TGF- β and aT_RA, it is possible to generate *in vitro* Tregs (iTreg) from naïve CD4 + T cells isolated from umbilical cord blood. Knowing the great therapeutic potential of iTregs, the scientific community has shown great interest in understanding the mechanisms involved in this process. Recent works indicate an important role of the NF- κ B pathway in the generation of these cells, especially relating the involvement of the c-Rel component, however, in the literature, there are not enough data on the evaluation of genes potentially orchestrated by this factor. With all this questioning, this thesis aimed to evaluate the interaction of c-Rel with the some promoter regions of the genome, naïve T cells and *in vitro* generated iTregs cells, in addition, we have also attempted to evaluate the effect of c-Rel protein silencing on the generation profile of iTregs. For this, the methodology of chromatin immunoprecipitation coupled to the real-time PCR technique with primers was used, which cover the promoter regions of some genes with important role in the biology of naïve and iTreg T cells. The efficiency of siRNA transfection against c-Rel and also the siRNA labeled with FITC fluorescence molecule in conjunction with different concentrations and different transfection reagents, using Jurkat and naïve T cells, was also evaluated. Our results showed a better transfection efficiency of the FITC siRNA, considering the viable cells transfected with the highest concentrations of the reagents DharmaFECT®1 (22,14%), DharmaFECT®4 (43,14%) e DMRIE-C (27,59%) with Jurkat cells and DharmaFECT®1 (16,35%) e DMRIE-C (25,94%) with naïve T cells, however, was not very efficient for the evaluation by qPCR of silencing, that is, the reduction of c-Rel mRNA and RNA of other genes. In addition, we demonstrated that in an average purity of 80.46% of isolated naïve T cells we obtained the generation of iTregs (CD4 + CD25 + CD127-FOXP3 +) with 98.42%, on average, in the expression of the FOXP3 marker, and in these iTregs cells, when compared to naïve T cells, c-Rel subunit has bound to the promoters of the genes as IL2RA (CD25) (average de 8,26 folds), CD69 (3,71 folds), regions of the FOXP3 gene (promoter region (20,15 folds), CNS regions - kb1 (16,9 folds), kb2 (17,2 folds) and kb3 (23,29 folds)) and c-Rel promoter – Rel (8,12 folds). Our results demonstrate the possible regulatory mechanisms, such as some of the main roles of the c-Rel subunit during the generation process of iTregs.

Keywords: Induced regulatory T lymphocyte - iTreg, Naïve T cells, NF- κ B , c-REL, ChIP

SUMÁRIO

Sumário

1.	Introdução	22
1.1	Sistema Imunológico	23
1.2	Autotolerância	24
1.2.1	Tolerância Imunológica	24
1.3	Células T regulatórias	25
1.4	NF- κ B	35
	Justificativa do Estudo	38
2.	Objetivos	39
2.1	Objetivo geral	40
2.1	Objetivos Específicos	40
3.	Material e Métodos	41
3.1	Aspectos éticos e coleta do Sangue de Cordão Umbilical	42
3.2	Crerérios de Participação	42
3.3	Causuística	43
3.4	Isolamento de células T naíve a partir do sangue de cordão umbilical (SCU)	43
3.5	Pureza das células T naive obtidas após coluna imunomagnética	44
3.6	Geração de iTregs a partir das células T naíve isoladas de SCU	44
3.7	Caracterização imunofenotípica das células iTreg	44
3.8	Imunoprecipitação de Cromatina	45
3.9	Análise da ligação de c-REL em sítios promotores	48
3.10	Padronização da concentração de siRNA no ensaio de transfecção em células T naive	50

3.11	Padronização do ensaio de transfecção com diferentes reagentes de transfecção em células Jurkat e T naive	50
3.12	Extração do RNA	52
3.13	Quantificação das amostras	52
3.14	Transcrição Reversa	53
3.15	Análise de expressão gênica.....	53
4.	Resultados.....	54
4.1	Pureza das células T naive obtidas após coluna imunomagnética	55
4.2	Caracterização imunofenotípica das células iTreg.....	55
4.3	Imunoprecipitação de Cromatina	56
4.3.1	Ligação de c-Rel na região promotora do receptor de IL-2.....	57
4.3.2	Ligação de c-Rel na região promotora do gene REL.....	57
4.3.3	Ligação de c-Rel na região promotora do gene que codifica o CD69	58
4.3.4	Ligação de c-Rel na região do gene FOXP3.....	59
4.4	Padronização da concentração de siRNA no ensaio de transfecção em células T naive	62
4.5	Padronização do ensaio de transfecção com diferentes reagentes de transfecção	63
4.5.1	– Em células Jurkat	63
4.5.2	– Em células T naive.....	69
5.	Discussão	71
5.1	Isolamento e geração de células iTregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ FOXP3 ⁺	72
5.2	Análise da ligação de c-Rel em sítios promotores de genes	75
5.2.1	Ligação de c-Rel na região promotora do gene ILR2A.....	76
5.2.2	Ligação de c-Rel na região promotora do gene REL.....	77
5.2.3	Ligação de c-Rel na região promotora do gene que codifica o CD69	78
6	Conclusão.....	81
7	Anexos	84

6.1 Anexo 1.....	85
Aprovação do comitê de ética.....	85
6.2 Anexo 2.....	86
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	86
6.3. Anexo 3.....	88
Manuscrito.....	88
8 Referências Bibliográficas	112

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Avaliação por citometria de fluxo da pureza das células T naive ($CD4^+CD25^-CD45RA^+$) obtidas por seleção imunomagnética das células a partir do sangue de cordão umbilical. Para avaliação da pureza, com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC), foi determinada uma região excluindo debris (células mortas, fragmentos celulares e sujeira) e englobando todas as células sanguíneas (Linfócitos). Figura representativa do dot plot da expressão dos marcadores CD4 e CD25, assim como a expressão de CD45RA. Imagem retirada do software FlowJo 10.0.4..... 55

Figura 2. Análise por citometria de fluxo da geração de iTreg, com marcadores CD4, CD25, FOXP3 e CD127. À superior esquerda, dot plot representativo de tamanho por complexidade interna indicando a delimitação da região dos linfócitos; dot plot representativo mostrando as populações das células geradas e análise da expressão dos marcadores FOXP3 e CD127 (quadros inferiores) das células $CD4^+CD25^+$ (superior direito). Os eventos fora da gate “Lymphocytes” representam células mortas, debris celulares, ou não consideradas. Imagem retirada do software FlowJo 10.0.4..... 56

Figura 3. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de IL2RA. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene IL2RA em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos. 57

Figura 4. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de REL. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene REL, que codifica a proteína c-Rel, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos. 58

Figura 5. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de CD69. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene CD69, em 3 experimentos independentes. Os resultados são

normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos. 59

Figura 6. Estrutura do locus FOXP3. O locus FOXP3 é composto por quatro regiões bem conservadas, a região promotora e três regiões não codificadas, denominadas por CNS, que são representadas pelas caixas de cor rosa; as caixas de preenchidas com coloração azuis indicam as regiões que são codificadas; e as caixas azuis sem preenchimento representam os éxons não codificados. Adaptado de (TOKER; HUEHN, 2011).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região do Promotor de FOXP3. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do Promotor de FOXP3, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos..... 60

Figura 8. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb1. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb1, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos..... 61

Figura 9. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb2. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb2, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos..... 61

Figura 10. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb3. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb3, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos..... 62

Figura 11. Representação gráfica dos resultados de expressão gênica do mRNA de c-Rel obtidos da transfecção de células T naive. As células T naive foram tratadas com o reagente de transfecção DMRIE-C e em 3 concentrações diferentes de siRNA (5, 10 e 20 nM) por 72 horas. As análises de expressão relativa (*fold change*) foi realizada pelo método de 2^{-ddc} em que a normalização do dcq foi realizado pela média dos cqs do gene endógeno e a normalização do ddcq foi realizada pela média dos dcqs das amostras tratadas com siRNA controle..... 63

Figura 12. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 64

Figura 13. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT2. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 65

Figura 14. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT3. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas,

não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 65

Figura 15. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT4. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 66

Figura 16. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção siPORT. Foram utilizadas as concentrações de 0,176; 0,353 e 0,706 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 66

Figura 17. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,04; 0,08 e 0,13 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 67

Figura 18. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 68

Figura 19. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT4. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 68

Figura 20. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,08; 0,16 e 0,32 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 69

Figura 21. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em células T naive, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 70

Figura 22. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em células T naive, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,08; 0,16 e 0,32 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das sequências dos primers utilizadas na metodologia de ChIP-qPCR	
.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- atRA = do inglês “*all-trans Retinoic Acid*”
- μg = micrograma
- μL = microlitro
- μM = micromolar
- CD = do inglês “*Cluster of Differentiation*”
- cDNA = do inglês “*Complementary Desoxiribonucleic Acid*”
- CTLA-4 = Antígeno-4 associado ao Linfócito T Citotóxico
- CTM = Células Tronco Mesenquimais
- CPD = do inglês “citrate phosphate dextrose”
- DNA = do inglês “*Desoxiribonucleic Acid*”
- FT = Fator de Transcrição
- FITC = do inglês “*Fluorescein isothiocyanate*”
- FSC = do inglês “*Forward Scatter*”
- FOXP3 = fator de transcrição *forkhead boxp3*
- GPCR= Receptor de Crescimento Tumoral induzido por glicocorticoide
- ICAM= moléculas de adesão intercelular
- IFN- γ = Interferon gamma
- IL = Interleucina
- iTreg = Células T Regulatórias Induzidas
- NF- κB = do inglês “*Nuclear Factor kappa B*”
- ng = nanograma
- nM = nanomolar
- pb = Pares de Base
- PBS = do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”
- PCR = Reação da Cadeira da Polimerase
- PE = do inglês “*Phycocitrin*”
- qPCR = PCR quantitativo

- RNA = do inglês “*Ribonucleic Acid*”
- rpm = rotações por minuto
- SBF = Soro Bovino Fetal
- SSC = do inglês “*Side Scatter*”
- TCR = Receptor de células T
- TGF- β : Do inglês “*Transforming Growth Factor beta*”
- TNaïve = células T naïve
- Treg = Células T regulatórias
- TNF = do inglês “*Tumor Necrosis Factor*”

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imunológico

O sistema imunológico, ou sistema imune, é um sistema de estruturas e processos biológicos que tem como principal função detectar e proteger o organismo contra infecções neutralizando microorganismos patogênicos (PLITAS; RUDENSKY, 2016) e, para isto, de uma forma didática foi classicamente dividido em duas grandes estratificações: a imunidade inata, e a imunidade adaptativa (CHAPLIN, 2003;2010).

A imunidade inata consiste no primeiro mecanismo de defesa do organismo, envolvendo as barreiras físicas e químicas (pele intacta, muco, pH, enzimas e componentes solúveis como o sistema complemento) (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997), além de células como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células NK e dendríticas, sua resposta inflamatória protetora ocorre minutos após o contato com o patógeno e responde de forma igual a sucessivas infecções (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; TURVEY; BROIDE, 2010). Enquanto que na imunidade adaptativa a defesa do organismo ocorre através da participação dos linfócitos (T e B) com o reconhecimento de moléculas específicas antigênicas – moléculas estas que permitem a memória imunológica - possibilitando o aumento da magnitude das respostas em exposições posteriores (ITOH et al., 1999).

Os linfócitos T são apresentados com um importante papel no combate contra patógenos estranhos e sua geração possibilita a expressão de um repertório diversificado de receptores de antígenos através do rearranjo gênico dos receptores de antígenos. Entretanto, infelizmente, essa diversidade de receptores pode levar a geração de populações de linfócitos T que reconhecem auto-antígenos, que por fim, podem resultar em um estado de autoimunidade (ALROQI; CHATILA, 2016).

Os diversos mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema imune têm recrutado um grande número pesquisas que procuram esclarecer diversas dúvidas, sendo uma das principais questões a compreensão de como é estabelecida e mantida a ausência de resposta imunológica aos nossos antígenos próprios (autotolerância) e, consequentemente, estabelecer nitidamente a relação entre a perda da autotolerância e a geração de doenças autoimunes (ALROQI; CHATILA, 2016; ITOH et al., 1999).

1.2 Autotolerância

1.2.1 Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica pode ser definida como um processo que visa garantir a homeostase do organismo, sendo bipartido em tolerância central (desinente no timo) e tolerância periférica (GOLDRATH; HEDRICK, 2005; SAKAGUCHI et al., 2001).

Na tolerância central, os timócitos (células ainda não diferenciadas), podem sofrer morte celular induzida por ativação, uma vez que há a possibilidade dos receptores TCR destas células se ligarem fortemente aos antígenos próprios, ou morte por negligência, devido ao fato de não se ligarem a antígeno nenhum. Quando a intensidade da ligação de TCR com os antígenos próprios ocorre de forma moderada, estes sobrevivem e migram para os órgãos periféricos (GOLDRATH; HEDRICK, 2005). Permitindo assim, a manutenção da homeostase imunológica mediada pela subpopulação de células T CD4+ (PLITAS; RUDENSKY, 2016), contudo, este processo não elimina todos os linfócitos autorreativos, que podem escapar do tecido tímico medular e/ou estas células podem ser exclusivamente expressas nos órgãos periféricos (ALROQI; CHATILA, 2016), necessitando de mecanismos de regulação periféricos que controlam a autorreatividade, ou tolerância periférica.

A tolerância periférica pode atuar por diferentes mecanismos individuais ou em conjunto, com a finalidade de alterar o perfil da resposta imune, podendo destacar a incapacidade de ativação e proliferação das células efectoras, processo denominado anergia (BARRON et al., 2008); a ativação de mecanismo de inibição, como o reconhecimento de receptores como CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) que leva à apoptose dos linfócitos (BLUESTONE, 1997; GREENWALD et al., 2001); mudança no perfil de produção de citocinas; e, por fim, a indução de tolerância por células T regulatórias (CARRIER et al., 2007; CHEN, T. C. et al., 2004).

Portanto, além dos mecanismos de deleção clonal presente no timo, que eliminam os linfócitos autorreativos, a tolerância periférica também pode ser controlada a partir da participação das células T regulatórias (ITOH et al., 1999; SHEVACH, 2000), componentes indispensáveis do sistema imune que atuam suprimindo a ativação e expansão da resposta efectoras das células T autorreativas potencialmente perigosas existentes na periferia, evitando

a ocorrência da autoimunidade e as resposta exacerbadas de células efectoras no geral (MALOY; POWRIE, 2001; SHEVACH, 2000; YAGI, H. et al., 2004).

A relevância desta subpopulação de células T, características regulatórias, foi discutida em diversos estudos em que foram realizados os procedimentos de timectomia (retirada total do Timo) neonatal de camundongos (3 dias de vida), cujo os resultados demonstraram um quadro de autoimunidade e produção elevada de anticorpos, entretanto, este quadro pôde ser revertido uma vez que células T tímicas ou esplênicas de camundongos adultos foram infundidas nestes camundongos timectomizados, impedindo assim, o desenvolvimento deste quadro autoimune, inflamação e dano tecidual (ASANO et al., 1996; BONOMO et al., 1995).

Por este motivo, este mecanismo de tolerância, assegurada pelas células T regulatórias, apresenta uma possível relação entre doenças autoimunes como consequências de um possível desequilíbrio entre as células T regulatórias e T efectoras ou autorreativas (ANNACKER et al., 2001; GRACA et al., 2004; JORDAN et al., 2001; WING; SAKAGUCHI, 2010), e diante desse quadro de instabilidade tem sido considerado como uma importante estratégia para manter a tolerância periférica em humanos e em camundongos (ALROQI; CHATILA, 2016).

1.3 Células T regulatórias

As células T com capacidade supressora da resposta imune correspondem a uma população celular altamente heterogênea, denominadas linfócitos T regulatórios (Tregs), constituída por diferentes subpopulações que são caracterizadas com base em diversos marcadores (LUGLI et al., 2013). Algumas das subpopulações são: o fenótipo $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD8^-$ (duplo negativas) células T $CD8^+CD28^-$, $CD8^+CD122^+$ e gamma-delta e secretoras de interleucina (IL)-10, células Th3 secretoras de TGF-beta (do inglês, *Transforming growth factor-beta*), e as células Natural Killer (NK) (HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2003), sendo que a maioria dessas células é gerada durante os primeiros estágios do desenvolvimento das células T fetais e neonatais (SAKAGUCHI et al., 2001).

A diferenciação celular, no timo, segue por uma sequência de estágios de desenvolvimento até a geração de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ maduras. Estes estágios podem ser definidos com base na expressão de um conjunto de receptores, o TCR (CD3), CD4 e CD8 (BLOM; SPITS, 2006), sendo que, inicialmente, os timócitos, células triplamente negativas ($CD3^-CD4^-CD8^-$) adquirem o marcador CD4, classicamente denominado CD4 monopositivo

imaturo – CD4ISP⁻ e, posteriormente, o marcador CD8, conferindo assim a característica de serem células duplamente positivas (CD4⁺CD8⁺), para que, subsequentemente ao início da expressão de TCR e de acordo com a capacidade do reconhecimento do TCR pelo complexo de histocompatibilidade (MHC de classe I e classe II), estas células são submetidas a processos de seleção positiva, para se tornarem CD4⁺CD8⁻ (quando o reconhecimento é pelo MHC II) ou CD4⁻CD8⁺ (MHC I) (TEH et al., 1988), ou ainda, por seleção negativa, que é caracterizada quando ocorre uma excessiva sinalização via TCR que induz estas células à apoptose (PAREL; CHIZZOLINI, 2004).

Dentre as populações positivamente selecionadas, estão as células T CD4⁺ naive (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺) que podem se diferenciar, logo após a interação com células apresentadoras de antígenos (APCs), em uma variedade de subpopulações que incluem as células Th1, Th2, Th17 (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009), que exercem proteção contra agentes exógenos e as células T regulatórias (BRYN et al., 2008; DE REZENDE et al., 2010) que, por sua vez, protegem contra reações autoimunes e reações intensas das células efectoras (MAGGI et al., 2009; MAHIC et al., 2008; ROMAGNANI et al., 2009; ZHOU, C. et al., 2009).

Com base nisso, em 1995, o grupo de pesquisa liderado por Sakaguchi descobriu um subconjunto de linfócitos T CD4⁺, que apresentavam, além de uma alta expressão de CD25, foram capazes de suprimir os quadros típicos de autoimunidade em modelos experimentais em camundongos timectomizados (SAKAGUCHI et al., 1995), entretanto os quadros de inflamação, relacionados à autoimunidade, se seguiram quando as células CD25⁺ foram depletadas da população de linfócitos T CD4 antes da infusão nos camundongos receptores (PLITAS; RUDENSKY, 2016; SAKAGUCHI et al., 1995).

No entanto, a população celular de Treg que apresenta maior relevância fisiológica é a população CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, já que sua capacidade de supressão frente a ativação e expansão de linfócitos T efetores (HORWITZ et al., 2003; SURI-PAYER et al., 1999; WING; SAKAGUCHI, 2010; ZHAO et al., 2006), são responsáveis, ainda que parcialmente, pelo papel crucial na manutenção da tolerância imunológica e homeostasia do sistema imune (DEENICK; MA, 2011), assim como na tolerância ao transplante (PANDIYAN et al., 2007; WING; SAKAGUCHI, 2010). Devido a atuação destas células em diferentes patologias imunológicas

e ao seu potencial terapêutico, as Treg atraem um grande interesse (RILEY; JUNE; BLAZAR, 2009).

Classicamente, as Tregs podem ser divididas em 3 subtipos: as que compreendem as células geradas naturalmente no timo durante os primeiros estágios do desenvolvimento das células T e, sucessivamente, são exportadas para os tecidos periféricos exercendo suas funções na homeostase do sistema imune (FEUERER et al., 2010; SAKAGUCHI et al., 2001), denominadas Treg naturais (nTregs); as Treg adaptativas (Treg_{sadapt}) ou Tregs induzidas na periferia (pTreg), geradas a partir de células CD4⁺ maduras, após sofrerem certos estímulos de algumas citocinas nos órgãos linfoides secundários (PANDIYAN et al., 2007; SHEVACH et al., 2006) e, por fim, as Tregs induzidas *in vitro* (iTregs) (ABBAS et al., 2013; SHEVACH, 2006; SHEVACH; THORNTON, 2014) que são geradas no cultivo de células CD4⁺ a partir da ativação e em presença de citocinas (SCHIAVINATO et al., 2017), ou ainda pelo cocultivo com células-tronco mesenquimais (FEUERER et al., 2009; SCHMITT; WILLIAMS, 2013).

As nTregs constituem cerca de 1-5% de todas as células T CD4⁺ no sangue periférico humano (BAECHER-ALLAN et al., 2001) e aproximadamente de 5-10% em camundongos (ALROQI; CHATILA, 2016), essas populações, após a ativação via TCR, exercem sua função principalmente por um mecanismo parácrino, produzindo citocinas imunossupressoras que atuarão sobre células vizinhas, principalmente IL-10, TGF- β (BATTAGLIA et al., 2006) e IL-35, permitindo a supressão por contato celular (THORNTON; SHEVACH, 2000) e interferindo na capacidade de infiltração das células efectoras (GREEN et al., 2003). Essa supressão mediada pelas células T regulatórias é um mecanismo muito importante de regulação negativa da inflamação, apresentando relação em distúrbios autoimunes e de inflamação, alergia, infecções agudas e crônicas, assim como no câncer. Essa associação com diversas doenças humanas levou ao crescimento de pesquisas sobre a manipulação de células T regulatórias e seu potencial terapêutico (PLITAS; RUDENSKY, 2016).

Ademais, as nTregs expressam altos níveis de CD25, que são receptores de IL-2 (Interleucina-2), que além de servir como marcador, é essencial para a diferenciação e manutenção da proliferação dessas células, visto que estudos que utilizam camundongos com ausência de expressão das cadeias alfa e beta do receptor (IL2R α e IL2R β , respectivamente), ou a administração de anticorpos que neutralizam IL2, geram uma depleção de células T regulatórias e quadros de autoimunidade, que são revertidos com infusões de células T

CD4+CD25+, ou neutralizando o anticorpo contra IL2 (anticorpo anti-anti-IL2), resultando em uma expansão das células T regulatórias (PLITAS; RUDENSKY, 2016). Além disso a expressão de CD25, nas células T regulatórias, atua como um dos seus mecanismos de ação, sequestrando e consumindo as moléculas de IL-2 do microambiente (THORNTON; SHEVACH, 1998;2000) e essa depleção induz as células efetoras a entrarem em apoptose (PANDIYAN et al., 2007).

Entretanto essa relação das células T regulatórias com o receptor CD25 levantou o questionamento se essas células fazem parte de uma subpopulação distinta de células T ou apenas representam um estado particular de ativação, visto que a expressão de CD25 é regulado em todas as células T ativadas (PLITAS; RUDENSKY, 2016).

Por este motivo, adicionalmente ao CD25, as células T regulatórias expressam diversas moléculas imunomoduladoras como granzimas e citocinas, como IL-10 (Interleucina 10) que é uma citocina com propriedade imunossupressora, essencial para manter a resposta imune sob controle (PLITAS; RUDENSKY, 2016), além de outros marcadores que têm se mostrado importante na sua função supressora como CTLA-4 (antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico), que promove um mecanismo de supressão dependente de contato célula a célula (ALROQI; CHATILA, 2016); TNF (fator necrose-tumoral), GITR (fator de crescimento tumoral induzido por glicocorticoide, que tem o gene relacionado à família do TNFR - TNFRSF18), CD69 (receptor de membrana de lectina C tipo 2) que tem sua expressão rapidamente induzida após ativação celular (GONZALEZ-AMARO et al., 2013), ausência ou baixos níveis de CD127 (receptor alpha de IL-7) é um marcador de superfície que tem a sua expressão diminuída em linfócitos T após a ativação, (LIU et al., 2006; SEDDIKI et al., 2006) e principalmente a expressão de FOXP3 (fator de transcrição *forkhead boxp3*) (FONTENOT; RASMUSSEN; WILLIAMS; et al., 2005; HORI; TAKAHASHI; SAKAGUCHI, 2003; PACHOLCZYK et al., 2006; ZIEGLER, 2006), que atua como controlador da expressão gênica para garantir o desenvolvimento e a função das células Tregs (HUEHN; BEYER, 2015).

Adicionalmente ao FOXP3 há alguns outros fatores de transcrição que foram descritos como marcadores de células T regulatórias, por exercerem um papel importante na capacidade supressora destas células (ALROQI; CHATILA, 2016), como por exemplo Helios, um membro da família Ikaros de fatores de transcrição, que apresentam expressão indispensável para o desenvolvimento e função do sistema imunológico, entretanto sua expressão não é específica

de Treg, visto que pode ser expresso por células Th2 (WANG, Y.; SU; WAN, 2011) e a maioria das células FOXP3+ que expressam Helios são derivadas do timo e não da periferia (HIMMEL et al., 2013).

Além do Helios, outro exemplo de proteína que também pode ser um marcador de Treg, é a proteína GATA-3, que é um fator de transcrição, pertencente à família GATA (GATA-1-6), que apresentam interação com a sequência de DNA do GATA, o GATA-3 regula uma matriz de processos biológicos, dentre eles o desenvolvimento, diferenciação e tumorigênese, entretanto é altamente expresso em muitos tipos de tecido e tipos celulares, com principais funções relacionadas à regulação do sistema imune, com alta expressão em células Treg, quando comparadas às células T (WANG, Y. et al., 2011).

O fator de transcrição Foxp3 é reconhecido como o principal controlador das funções supressoras das T regulatórias (LAL et al., 2009), expresso em células T ativadas de maneira discreta e transitória em comparação aos altos níveis de expressão observados nas células T CD4+CD25+, e em todo subtipo de T regulatórias que exercem atividade supressora, portanto, é decisivo no desenvolvimento destas células (YAGI, H. et al., 2004) (FONTENOT; RASMUSSEN; GAVIN; et al., 2005).

Foi identificado que a mutação de perda de função, ou deleção do gene FOXP3, presente no cromossomo X, é responsável pelo desenvolvimento de uma doença autoimune fatal, com início precoce em camundongos (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI et al., 2003; HUEHN; BEYER, 2015), e que em humanos, essa doença é denominada como síndrome autoimune sistêmica hereditária conhecida como IPEX (Síndrome de Imunodisregulação da Poliendocrinopatia)(FONTENOT; RASMUSSEN; WILLIAMS; et al., 2005; PLITAS; RUDENSKY, 2016).

O promotor FOXP3 está localizado à 6,5 kb do primeiro exon do gene FOXP3 e sua ativação é induzida por vários fatores de transcrição, com sítios de ligação, além de NFAT e AP-1 que são vias induzidas por ativação do TCR, há sítios de ligação de NF-kB coincidentes com os locais NFAT. A via STAT5, é induzida por IL-2 e STAT-1, que é induzida por IL-27, se ligam diretamente à região promotora, e esta mesma região também pode ser ocupada por Smad e pCREB e podem induzir a expressão de FOXP3 (FONTENOT; RASMUSSEN; WILLIAMS; et al., 2005).

A perda de sua expressão em células T regulatórias resulta em uma perda da função supressora e da identidade celular (WILLIAMS; RUDENSKY, 2007), o que pode permitir a polarização dessas células e mantê-las com um perfil parecido com as de células Th17 (YANG et al., 2008), uma vez que, as Tregs FoxP3⁻ podem produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e INF- γ (KOMATSU et al., 2009).

Além da própria expressão de FOXP3, algumas marcas ou modificações epigenéticas, que, por definição, consistem em modificações externas ao DNA como, por exemplo, modificações de histonas, metilação do DNA, remodelação da cromatina, fatores de transcrição e ação de microRNAs que afetam a função/expressão do gene sem promover alterações na sequência do DNA (TING et al., 2018), também influenciam de forma contundente na diferenciação, no desenvolvimento e na função das células T regulatórias. Além de que essas marcas podem ser a justificativa para que estudos demonstrem uma certa heterogeneidade entre as células T regulatórias naturais e as periféricas (ALROQI; CHATILA, 2016).

Sabe-se que as células T regulatórias apresentam, no locus do gene *Foxp3*, elementos intensificadores intrônicos regulatórios, além do promotor que desempenham papéis importantes na diferenciação de Tregs (TING et al., 2018). Cada elemento tem sido descrito importante de maneira diferente na diferenciação Tregs no timo e na periferia. Esses intensificadores foram nomeados como sequências não codificadoras conservadas, numeradas de acordo com a distância do sítio de início de transcrição (TSS) (CNSs 1, 2 e 3), e uma região denominada CNS0 localizada 8kb antes do TSS, descrita como importante na regulação da expressão de *Foxp3* (IIZUKA-KOGA et al., 2017).

A região CNS1 (sequência não codificadora conservada -1), contém sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como por exemplo, Smads, NFAT, AP-1 e o receptor de ácido retinóico (RAR) a ligação com Smad-2/3 e com ácido retinóico tem sido demonstrado ser responsável pela capacidade de resposta ao TGF- β (IIZUKA-KOGA et al., 2017), além de ser necessário para a diferenciação das T regulatórias periféricas, mas não totalmente relacionado à diferenciação nas tímicas (PLITAS; RUDENSKY, 2016).

O elemento CNS2 é um regulador cis do FOXP3, apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição STAT-5, NFAT, Runx1, CREB (IIZUKA-KOGA et al., 2017), e principalmente GATA-3, que controla a expressão de *Foxp3* pela ligação ao CNS2 (WANG, Y. et al., 2011). CNS2 é um elemento essencial em células T regulatórias, por manter a

manutenção da identidade destas células durante a divisão celular, ou seja na indução da expressão do Foxp3, sendo dependente da sinalização pró-inflamatória do microambiente, ou seja, o elemento CNS2 reforça a estabilidade do estado regulatório em ambientes flutuantes, sendo importante para o controle em ambientes de inflamação e infecção crônica e metabólica, autoimunidade e cancer (HSIEH, C. S. et al., 2006; ZHENG et al., 2010).

Essa região é altamente enriquecida de sítios CpG e é parcialmente metilada em células T convencionais (CD4⁺CD25^{low}), que expressam Foxp3 transientemente (ALROQI; CHATILA, 2016), completamente desmetilada em Tregs, tanto tímicas como periféricas, contribuindo para a manutenção da expressão de Foxp3, possuem um padrão raramente desmetilada em iTreg, ou seja, uma expressão instável de Foxp3 (IIZUKA-KOGA et al., 2017).

A região CNS3 é relatada como uma região potenciadora com sítios de ligação para c-Rel, com função importante na diferenciação, tanto das células Tregs tímicas como as periféricas (HORI et al., 2003; RUAN et al., 2009). Em camundongos com deleção da região CNS3 notou-se, além da diminuição do número de Tregs (HORI et al., 2003; RUAN et al., 2009), a diminuição do acúmulo da metilação de histona (H3K4m1), que é descrito como uma modificação epigenética atuante na região do promotor do Foxp3, o que indica a possível relação que a remodelação do promotor de Foxp3 das células precursoras de Treg é facilitada pela região CNS3, permitindo a expressão do Foxp3 (SEKIYA et al., 2016), ou seja, a região CNS3 pode atuar como um modulador da intensidade da sinalização do TCR, sendo um papel pioneiro na expressão de Foxp3 para a diferenciação em células Tregs (HORI et al., 2003; IIZUKA-KOGA et al., 2017; RUAN et al., 2009).

Os mecanismos, no timo ou na periferia, que levam a indução das células imaturas para a geração de Treg ainda não são totalmente compreendidos, porém os trabalhos sugerem que as principais diferenças entre as subpopulações de Tregs têm a relação com a tolerância, uma vez que as tTregs são, provavelmente relacionadas à tolerância aos autoantígenos, enquanto as pTregs apresentam uma função de proteção contra respostas imunes relacionadas ao “não-próprio”, como alérgenos no geral ou antígenos alimentares (PLITAS; RUDENSKY, 2016).

Adicionalmente, sabe-se que a geração de células T regulatórias, assim como das demais células do sistema imune, é dependente da sinalização do microambiente, portanto é descrito sua relação com a presença de células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, macrófagos, assim como com células produtoras de citocinas e fatores que potencializam a

geração, como TGF- β e ácido retinóico (ALROQI; CHATILA, 2016), assim como diversos estudos demonstram que, em cultura celular, as iTregs podem ser geradas não só pelo cocultivo com células-tronco mesenquimais (FEUERER et al., 2009), mas também através do cultivo de células T CD4⁺ naive ativadas via TCR, na presença de IL-2 (WANG, H. Q.; SHAO, 2009), TGF- β (LI; FLAVELL, 2008) e atRA (do inglês. *All-trans retinoic acid*) (LU et al., 2010; SCHIAVINATO et al., 2017; WANG, J.; HUIZINGA; TOES, 2009).

A ativação das células, via TCR, com o uso de anticorpos policlonais, anti-CD2/CD3/CD28, em conjunto ao estímulo com a adição de IL-2, que além de ser indispensável para a sobrevivência das células T, gera uma polarização de T naive para iTreg, que agem induzindo a proliferação celular e controlando a expressão de FOXP3 (OHKURA; HAMAGUCHI; SAKAGUCHI, 2011; WANG, J. et al., 2009), que por sua vez tende a suprimir a diferenciação de células Th17, pelo fato de suprimir a sinalização do IL-6R (receptor de interleucina 6) mesmo na presença de citocinas inflamatórias, acelerando a regulação negativa (SCHIAVINATO et al., 2017), assim como a presença no meio de cultura e o estímulo de TGF- β , uma citocina imunossupressora (LI; FLAVELL, 2008), que induz a expressão de FOXP3, tanto nas Treg de camundongos (LUO et al., 2007; ZHENG, S. G. et al., 2007; ZHENG, Y. et al., 2007) quanto em células T periféricas em humanos (AMARNATH et al., 2007; FANTINI et al., 2004); e a adição de atRA, um metabolito ativo do ácido retinóico (LU et al., 2010; WANG, J. et al., 2009), molécula que ativa o receptor nuclear de RAR α , estimulando a expressão de FOXP3 de forma constitutiva pela desmetilação do locus FOXP3, *in vivo* e *in vitro* (CHEN, W. et al., 2003), aumentando a estabilidade e expansão de iTregs.

Diante disso, nosso grupo de pesquisa avaliou o processo de geração dessas células por um período de 1, 3 e 5 dias de cultivo, pós ativação das células T naive isoladas do sangue de cordão umbilical e avaliou o perfil de expressão de diversos marcadores de superfície, como GITR, LAP, CTLA4, CD69, CD127, TNFR2, assim como a expressão intracelular de FOXP3 dentro das populações de células CD4⁺ tanto na ausência, quanto na presença e também na alta expressão de expressão de CD25, geradas a partir da ativação das células T naive, cultivadas apenas com IL-2 e das cultivadas com IL-2, TGF- β e atRA, e foi visto que em 5 dias de tratamento, o percentual de células FOXP3⁺ aumentou significativamente, com expressão de 98% nas células cultivadas com IL-2, TGF- β e atRA, assim como foi demonstrado que os demais marcadores também são condizentes com o perfil obtido em células Tregs do sangue periférico e com bases nesses resultados, nosso grupo desenvolveu um protocolo, bem

reproduzido, de geração de células iTregs a partir do cultivo de células T CD4⁺ naive do sangue do cordão umbilical (SCHIAVINATO et al., 2017).

Foi avaliado também, pelo nosso grupo de pesquisa, o perfil celular e funcional das células T regulatórias originadas do sangue de cordão umbilical, ativadas e tratadas com IL-2, TGF- β e atRA, e foi observado que essas células apresentam um potencial imunossupressor (supressão, em cocultura, da proliferação de células CD3⁺) tão alto quando comparadas com as células T regulatórias humanas periféricas. Foi observado também que há um controle de expressão gênica, controlado por microRNAs, como por exemplo o miR-30^a, que atua de forma direta principalmente nos componentes envolvidos na sinalização IL6/JAK/STAT, diminuindo sua expressão e assim favorecendo a polarização para as células T regulatórias (SCHIAVINATO et al., 2017).

Como estabelecido, as células T regulatórias apresentam um papel importante em diversos contextos da resposta imune e a experiência de manipulação e polarização das células T naive em iTregs *in vitro* descrita acima, é de extrema importância, uma vez que o desenvolvimento de projetos que auxiliam no entendimento dos mecanismos desta geração, propiciam a criação de possíveis terapias para o reestabelecimento da tolerância periférica em diversas doenças imunológicas, como diabetes autoimune, esclerose múltipla, e alergia (MAREK-TRZONKOWSKA et al., 2012; PLITAS; RUDENSKY, 2016; SCHMITT; WILLIAMS, 2013), assim como na prevenção contra a rejeição de transplantes, aumentando a possibilidade de sobrevida do tecido enxertado (WOOD et al., 2003).

A grande maioria dos estudos acerca das populações de células T regulatórias, ou de geração destas células, tanto em camundongos como em humanos, são provenientes de experimentos utilizando células do sangue periférico (SZABOLCS et al., 2003). Desta forma, o sangue de cordão umbilical (SCU) tem sido explorado como fonte alternativa e muito atraente das células T naive, e por consequência, para a geração *in vitro* de células iTregs. O SCU apresenta uma série de vantagens sobre o uso do sangue periférico (SP), entre elas estão: o menor risco da doença do enxerto contra o hospedeiro, menor risco de transmissão viral, por possuir população mais homogênea, por ser uma fonte de fácil acesso e sua coleta não conferir riscos a mãe ou ao feto, e principalmente, pelo fato de que o SCU apresenta um elevado número de células naive sem contato com antígenos (90% das células T CD3⁺ expressam CD45RA)

(SZABOLCS et al., 2003) quando comparado a células mononucleares de SP (MAYER et al., 2012; SCHIAVINATO et al., 2017).

Pesquisas demonstram que, após a ativação dos linfócitos, ou no processo de geração de Treg (HORWITZ et al., 2003; HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2008; WOOD et al., 2003), diversos sinais estão vinculados ao envolvimento com membros da via NF- κ B, pois a via NF- κ B pode estar centralmente envolvida na ativação das células T (SCHULZE-LUEHRMANN; GHOSH, 2006), por algumas evidências de que a sinalização pelo CD28 pode atuar como um ativador da via NF- κ B (SOLIGO et al., 2011) com seu papel relacionado ao controle da expressão de genes envolvidos com os mecanismos de polarização da células T (BUNTING et al., 2007; GHOSH; HAYDEN, 2008). Um exemplo bem claro é a expressão de CD69, caracterizado como um dos primeiros marcadores de ativação de linfócitos T (MARDINEY; BROWN; FLEISHER, 1996; RISSO et al., 1991), ou ainda a expressão contínua de CD25 (COSTELLO et al., 1993; COSTELLO; LIPCEY, 1993; MARDINEY et al., 1996; RISSO et al., 1991), assim como a expressão de FOXP3 em Treg (LONG et al., 2010) podem ser relacionadas aos importantes papéis que os fatores de transcrição da NF- κ B exercem neste processo de geração de Treg (HAUER et al., 2005).

A ativação da transcrição de FOXP3 decorrente da ativação de CD28 pode acontecer na ausência de c-Rel, uma vez que as vias downstream de CD28 não ativam a translocação nuclear c-Rel, entretanto alguns trabalhos concordam que a subunidade c-Rel de NF- κ B é um fator importante para a geração normal do número de células T regulatórias, tanto tímicas quanto periféricas, uma vez que este seja recrutado à se ligar no promotor, podendo iniciar a transcrição de FOXP3 (SOLIGO et al., 2011).

Curiosamente, a ativação das vias de sinalização TCR e CD28 aumentam a ativação do promotor de FOXP3, visto em células humanas com perfil T CD4⁺CD25⁺. Isso implica que estes receptores podem induzir a ativação sequencial do gene, independente de c-Rel, assim como independente de RelA, partindo de vias diferentes que sinergizam a ativação do gene. Em células T, a ativação do CD28 induz a degradação de I κ B α , que medeia a ativação apenas de RelA, enquanto a expressão de c-Rel exige nova transcrição e tradução de genes por uma via que é suprimida por CsA (ciclosporina A), caracterizando uma indução mais lenta de c-Rel e, consequentemente, uma transcrição gênica mais lenta quando dependente de c-Rel do que a comparada àquela mediada por RelA (SOLIGO et al., 2011).

1.4 NF- κ B

A primeira vez em que a via NF- κ B foi descrita na Cell, em 1986, os autores identificaram, em extratos de tumores de linfócitos B, a atividade de ligação ao DNA de um fator nuclear *enhancer* (intensificador) encontrado no gene que codifica a cadeia leve *kappa* (sitio k) de imunoglobulinas (SEN; BALTIMORE, 1986a;1986b) e, desde então, as descobertas só aumentaram, ao passo que NF- κ B não é apenas uma molécula, mas sim uma família de cinco proteínas Rel e tem sido relacionada a uma ampla variedade de células. Estão presentes juntamente como fatores de transcrição que podem se ligar em regiões promotoras de um farto número de genes em resposta a diversos estímulos externos (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

Dentre os principais processos que são relacionados à via NF- κ B estão apoptose, proliferação e desenvolvimento celular (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009), a regulação da resposta imune inata e adaptativa (BONIZZII; KARIN, 2004) e ainda o papel fundamental na regulação da inflamação (KARIN; LIN, 2002).

Em mamíferos, a via NF- κ B é formada por um complexo de cinco proteínas que atuam como fatores de transcrição: RelA (p65), RelB, c-REL, NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100) (HAYDEN; GHOSH, 2004), que se associam mutuamente formando complexos de homo e heterodímeros diferentes, com relatos que a via NF- κ B constitui um sinal essencial para o desenvolvimento de Tregs, assim como a homeostase, *in vivo* (SOLIGO et al., 2011).

Desta forma, quando ocorre a ativação das células do sistema imune, principalmente as células T, a resposta derivada destes estímulos é coordenada por diferentes vias de sinalização NF- κ B. As duas mais estudadas são: via clássica ou canônica; e via alternativa, constitutiva ou não canônica (GHOSH; HAYDEN, 2008; XIAO et al., 2006).

A via canônica de NF- κ B pode ser induzida por citocinas como TNF α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*), IL-1 e LPS (lipopolissacarídeo) e é dependente da degradação por fosforilação de I κ Bs (inibidores de *kB*), mediada pela cinase I κ B (IKK) que são associados aos componentes da via. Após a degradação dos inibidores, os complexos de NF κ B, principalmente RelA/NF κ B1, sofrem translocação para o núcleo ativando a transcrição dos genes alvos (SMALE, 2011) como citocinas inflamatórias, bem como TNF- α , IL-1, de proteínas de fase

aguda, além de moléculas de adesão celular (REINHARD et al., 2011), que atuam positivamente sobre a via canônica, caracterizando amplificações repetitivas desta etapa, resultando em uma resposta inflamatória rápida e intensa (GHOSH; HAYDEN, 2008).

A via não canônica é representada principalmente pelo processamento de p100 e pela formação do complexo IKK α /NIK (cinase indutora de NF- κ B)/p100, atuante na fosforilação da subunidade p100 resultando em p52 (NFKB2), implicando na translocação do dímero RelB/p52 para o núcleo (XIAO et al., 2006).

Em ambientes com estímulo inflamatório, a via canônica é rapidamente ativada, produzido o aumento da expressão de diversos genes, entre eles componentes da via não canônica, que são traduzidos e acumulados até o momento em que a atividade da via canônica passa a ser substituída pela atividade da via não canônica (KAHN-PERLES et al., 1997; SACCANI; PANTANO; NATOLI, 2003; TIAN, B.; NOWAK; BRASIER, 2005; TIAN, L.; HOLMGREN; MATOUSCHEK, 2005). De acordo com estes estudos, pesquisas realizadas em nosso laboratório (dados não publicados), demonstraram que mediante cocultura de CTMs com células T, a via canônica de NF- κ B tende a ser inibida e substituída pela sinalização mediada pela via não-canônica (SALDANHA-ARAÚJO et al., 2011).

Dentre os componentes de NF- κ B, a subunidade c-Rel é um membro único desta família (GILMORE; GERONDAKIS, 2011) e desempenha um importante papel na atividade imune celular (GHOSH; HAYDEN, 2008; XIAO et al., 2006) e na ativação das células T (BUNTING et al., 2007), regulando a transcrição de uma pluralidade de genes, assim como estão presentes na sinalização essencial para o desenvolvimento de células T regulatórias *in vivo* (SOLIGO et al., 2011). Estudos demonstraram que camundongos deficientes em c-Rel e NF- κ B1/p50 possuem um menor número de células Treg, tanto no timo quanto na periferia destes animais (DEENICK; MA, 2011; VISEKRUNA et al., 2013). Adicionalmente a isto, foi demonstrado em outra pesquisa que c-Rel regula diretamente a polarização de T naive em Tregs, pela sua relação direta com a produção de IL-2 (VISEKRUNA et al., 2013).

Perante os papéis, ainda não tão claros, de c-Rel no controle e no desenvolvimento das Tregs, foi demonstrado que este mecanismo de geração depende da permanência da ativação via TCR (AMARNATH, 2013; BENOIST; MATHIS, 2012; GRIGORIADIS et al., 2011; VISEKRUNA et al., 2013) assim como na ativação do receptor de TNF, e a atuação nestas duas

vias conhecidas como essenciais para o desenvolvimento de Tregs, culminando na expressão constitutiva do gene FOXP3 (HSIEH, H. L. et al., 2010; SEKIYA et al., 2016).

Esta ativação conduz o componente c-Rel aos sítios promotores do gene FOXP3, que está associado ao início da transcrição de *Foxp3* nos precursores de Tregs tímicos (SOLIGO et al., 2011), mantendo a estabilidade e a função destas células (HSIEH, H. L. et al., 2010), assim como desempenha um papel fundamental na proliferação, diferenciação e na produção de IL-2 e na expressão de IL-2R- α (CD25) nas células Tregs, moléculas cruciais para a divisão celular e função imunológica (BAECHER-ALLAN et al., 2001).

Em contrapartida, este fator não atua da mesma forma quando se comparam as nTregs e as Tregs da periferia (BUNTING et al., 2007; VISEKRUNA et al., 2013), pressupondo que é necessário mais estudos para a compreensão dos mecanismos pelos quais este processo é estabelecido. De fato, essa geração e expressão de FOXP3 pode não ser totalmente dependente de c-Rel, visto que em camundongos c-Rel $-/-$ há uma significativa redução no número de Tregs periféricas, entretanto as Tregs residuais (c-Rel $-/-$) expressam níveis normais de FOXP3 e apresentam um fenótipo semelhante às Tregs normais (SOLIGO et al., 2011).

Além de participar direta ou indiretamente na indução da transcrição do gene FOXP3, c-Rel também está relacionado à produção de citocinas como IL-2, GM-CSF, IL-3, IFN- γ e IL-21 (GILMORE; GERONDAKIS, 2011; HORI et al., 2003; LUGLI et al., 2013). Diversos trabalhos caracterizam um papel essencial, porém não exclusivo, de que c-Rel pode desempenhar no desenvolvimento de Treg, o que pode ser justificado devido à redundância de c-Rel com outros componentes de NF- κ B, tal como RelA, que também é translocado para o núcleo após a ativação das células, evidenciando que há uma possível função de apenas amplificar ou sustentar a resposta transcricional de genes (BUNTING et al., 2007; YU et al., 2013), uma vez que c-Rel pode ser dispensável para a função das Tregs “maduras”, que exercem suas principais funções sendo dirigida por FOXP3 (GILMORE; GERONDAKIS, 2011).

Estudos controversos com camundongos c-Rel $^{-/-}$, que tiveram linfócitos T CD4 isolados, foram diferenciados *in vitro* de forma aparentemente normal em células Th17, mas não em iTreg, o que é revertido em uma geração normal de iTreg após a adição de IL-2 (ISOMURA et al., 2009; VISEKRUNA et al., 2013). Outros estudos apontam o contrário, que a diferenciação em Th17 a partir de linfócitos T de camundongos c-Rel $^{-/-}$ foram comprometidas, enquanto a

geração de iTreg ocorreu aparentemente normal, o que foi justificado por conta da presença de IL-2 (YU et al., 2013).

Yu e colaboradores, em 2013, apresentaram um trabalho que indica um aumento na porcentagem de Tregs nos camundongos transplantados com células T CD4⁺ de camundongo c-Rel^{-/-} (YU et al., 2013). Em contradição, diversos estudos demonstram que o desenvolvimento de Treg é dependente de c-Rel, tanto no timo quanto na periferia (CHEN, T. C. et al., 2004; DEENICK; MA, 2011; REINHARD et al., 2011; VISEKRUNA et al., 2013) e por estes trabalhos, c-Rel é um componente de NF-κB que desperta interesse para muitos pesquisadores e clínicos que estudam imunologia e desordens imunológicas, principalmente doenças auto-imunes e cânceres hematopoiéticas (GILMORE; GERONDAKIS, 2011; HSIEH, H. L. et al., 2010).

Justificativa do Estudo

As Tregs são descritas como células de função essencial para a homeostase do sistema imune e por este motivo são consideradas como potenciais agentes terapêuticos em diversas desordens imunológicas e despertam grande interesse em pesquisas para o entendimento dos principais mecanismos de geração e função destas células, com a intenção de se descobrir um protocolo de geração com maior eficiência e estabilidade.

Alguns desses estudos demonstram a importância dos componentes da via NF-κB neste processo de indução de Tregs. Diante deste cenário, este projeto fez-se necessário uma vez que, até o momento, não foram apresentados trabalhos que avaliaram profundamente quais mecanismos e genes que podem apresentar sua expressão regulada pelo fator c-Rel, durante esse processo de geração de células T regulatórias a partir das células T naive do sangue de cordão umbilical.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o envolvimento de c-Rel, diante dos mecanismos de regulação epigenéticos, pré e pós-transcricionais, na indução das células T regulatórias (iTreg), geradas *in vitro*, a partir da ativação de células T CD4⁺ naive isoladas de sangue de cordão umbilical, por meio da identificação das principais interações de c-Rel com regiões promotoras gênicas.

2.1 Objetivos Específicos

- Isolar células T CD4⁺ naive do sangue de cordão umbilical e induzir a geração de iTregs por meio da ativação por *beads* conjugadas a anticorpos anti-CD2/CD3/CD28 e do cultivo na presença de TGF- β , IL-2 e atRA;
- Caracterizar imunofenotipicamente as populações isoladas e geradas.
- Avaliar a ligação do fator de transcrição c-Rel nas regiões promotoras de alguns genes nas células T naive isoladas e nas células iTregs geradas;
- Avaliar o perfil transcricional das células T naive e das células iTregs submetidas ao processo de indução das células iTreg a partir das células T CD4 naive;
- Padronizar a técnica de transfecção de siRNA em células Jurkatt e em Células T naive isoladas do sangue de cordão umbilical;
- Estabelecer protocolo de geração de iTregs a partir de células T naive isoladas do sangue de cordão umbilical, com o uso do protocolo de silenciamento com siRNA c-Rel;
- Avaliar as alterações transcricionais decorrentes do uso do siRNA durante o processo de geração;
- Integrar os dados de forma a identificar potenciais alvos de regulação de c-Rel neste processo de geração de iTreg.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e coleta do Sangue de Cordão Umbilical

As amostras de sangue de cordão umbilical foram angariadas com consentimento dos responsáveis de acordo com o projeto aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto e pela Comissão de Pesquisa da Mater, visto que este é uma parte adicional do projeto de pesquisa intitulado inicialmente “Estudo de mecanismos regulatórios no processo de geração in-vitro de células T regulatórias induzidas (iTreg) a partir de células naive de sangue periférico: Papel da via canônica e não-canônica de NF- κ B” (Processo HCRP nº 4562/2012 – Anexo 1). O termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) foi apresentado aos responsáveis pela enfermeira Maria Fernanda Capeli, contratada da Mater, responsável pela coleta do Material.

As bolsas de sangue de cordão umbilical são obtidas utilizando-se de técnicas de coleta em assepsia logo após o parto e secção do cordão umbilical. A punção da veia do cordão umbilical foi efetuada com agulha acoplada a uma bolsa de coleta (JP indústria farmacêutica, Ribeirão Preto, SP, Brasil), contendo 25 ml de solução anticoagulante CPD (*citrate phosphate dextrose*). As bolsas de sangue de cordão umbilical foram mantidas a 4°C até o processamento, ou processado num período de até 24 horas pós coleta, no qual foi utilizado todo o volume de sangue coletado.

3.2 Critérios de Participação

Os doadores (as parturientes e seus filhos) do sangue de cordão umbilical foram selecionados de acordo com alguns parâmetros – sem consideração de raça, classe social ou religião – atendidos no centro obstétrico, com idade gestacional acima de 35 semanas, com peso do feto maior que 2800g e a bolsa rota (rompimento da membrana amniótica) há menos de 12 horas.

As gestantes foram submetidas aos exames laboratoriais para sífilis, doença de Chagas, hepatite B e C, HTLV I e II, HIV 1 e 2, toxoplasmose (sorologia para detecção de anticorpos IgM) e citomegalovírus (sorologia para detecção de anticorpos totais e IgM). As amostras que apresentaram um ou mais resultados positivos foram descartadas.

3.3 Causuística

O número de bolsas de sangue de cordão umbilical necessárias para o desenvolvimento deste projeto variou em função das padronizações e do sucesso obtido para a geração das células Tregs e na aplicação de todos os métodos do trabalho.

3.4 Isolamento de células T naíve a partir do sangue de cordão umbilical (SCU)

As células mononucleares de sangue de cordão umbilical foram isoladas inicialmente realizando uma centrifugação à 250xg por 10 minutos para retirar o excesso de plasma, anticoagulante contido na bolsa de coleta e plaquetas do sangue de cordão umbilical. Posteriormente, foram adicionados, a cada amostra, uma solução de PBS-ACD (5% de ACD (v/v)) na proporção de 1:3 (v/v) para cada parte de sangue e misturados por inversão.

Posteriormente, a solução foi adicionada cuidadosamente em tubos contendo o reagente de Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience), os tubos foram submetidos à centrifugação de 30 minutos por 800 xg em 37°C, resultando em tubos com três fases (uma orgânica – Ficoll e uma aquosa – amostra diluída e o plasma + PBS-ACD excedente).

Após a centriugação, foi possível visualizar os anéis do gradiente de densidade, que o anel intermediário foi colhido e lavado por duas vezes com a solução de PBS-ACD (5% de ACD (v/v)) e centrifugados à 800 xg por 10 minutos. Após as lavagens, foi realizado o processo de lise de hemácias com a adição de 20 mL da solução de lise ACK (NH_4Cl (0,15M); KHCO_3 (10mM); EDTA (0,1mM)), mantido resfriado em gelo por 10 minutos e inativado com duas lavagens com a solução de Tampão de Coluna (PBS 1X, 5% ACD e 0,5% albumina (v/v/v)), centrifugados à 800 xg por 10 minutos e as células mononucleares foram contadas em câmara de Neubauer com corante de viabilidade celular, azul de Tripiano (Trypan Blue 0,4%).

Para o isolamento da população de células naíve ($\text{CD4}^+ \text{CD25}^- \text{CD45RA}^+$) a partir das células mononucleares, foi utilizado o kit comercial *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, human* (Cat No. 130-094-131 Miltenyi Biotec-MACS), que consiste no uso de um coquetel de anticorpos biotinizados anti- CD45RO, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, anti-TCR γ/δ , anti-HLA-DR, e CD235a; e com a ligação de esferas magnéticas (*microbeads*) ligadas à anticorpos com antibiotina, que, ao serem submetidas à seleção em coluna imunomagnética, realizam, neste experimento, uma seleção negativa, que consiste na

retenção, das células marcadas na coluna, enquanto as células de interesse (células T naïve) foram eluídas (não apresentam nenhuma marcação destes anticorpos do kit) em suspensão de Tampão de Coluna.

3.5 Pureza das células T naïve obtidas após coluna imunomagnética

As células T naïve isoladas, conforme descrito anteriormente, foram avaliadas imunofenotipicamente pela técnica de citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson), em que alíquotas com cerca de 1×10^5 células, foram separadas e incubadas com 5 μ L de anticorpos anti-CD4 (Clone: RPA-T4 - Cat.No 555347), antiCD25 (Clone: 2A3 Cat.No 347643) e anti-CD45RA (Clone: HI100 Cat.No 550855) (BD Pharmingen, San Jose-CA, USA), conjugados aos fluoróforos: R-phycoerythrin (PE); fluorescein isothiocyanate (FITC) e allophycocyanin (APC), respectivamente e analisadas pelo software *FlowJo 10.0.4*. (Treestar, Inc., San Carlos, CA). As amostras que apresentaram uma pureza de células T naïve superior a 80% foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

3.6 Geração de iTregs a partir das células T naïve isoladas de SCU

As células T naïve isoladas e com a pureza superior ao descrito anteriormente foram ativadas, via coestímulo de CD2, do TCR (receptor de células T) e de CD28, seguindo as normas do fabricante do sistema comercial *T Cell Activation/Expansion Kit human* (Cat. No. 130-091-441, Miltenyi Biotec-MACS), na proporção de 1 *bead* para cada 2 células. Após a ativação, estas células foram cultivadas em uma densidade de 3×10^5 células em placas de cultura de 24 poços com o volume de 1 mL de meio de cultura – *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640, Cat.No.11875-093 Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) – suplementado com 10% de SFB (GIBCO™).

Para garantir a proliferação e a sobrevivência dos linfócitos durante os 5 dias de cultura em ambiente controlado (37°C, 85% umidade relativa e atmosfera de 5% de CO₂), foram adicionados às condições de cultura solução de IL-2 (interleucina-2) (1 μ g/mL), além de TGF- β (fator de crescimento tumoral) (1 μ g/mL) e de atRA (ácido transretinóico) (10 μ M).

3.7 Caracterização imunofenotípica das células iTreg

Uma alíquota ($1,2 \times 10^6$ células) das populações geradas, foram caracterizadas imunofenotipicamente com o uso dos anticorpos de superfície anti-CD4 (Clone: RPA-T4

[PerCP] – Cat. No347324), CD25 (Clone: M-A251 [APC] – Cat. No 560987), CD127 (Clone: HIL-R7-M21 [FITC] – Cat. No 560549), (BD Pharmingen, San Jose-CA, USA). Para a marcação intracelular, após a marcação de superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas com o uso do kit *Human FOXP3 Buffer Set* (BD Pharmingen, San Jose-CA, USA, Cat. No. 560098), e o uso do anticorpo anti-human FOXP3 (Clone: PCH101 [PE] – Cat.No 12-4776-42) (eBiosciences (San Diego, CA, USA)).

Após a marcação, as células foram analisadas pelo citômetro FACScalibur (BD Pharmingen) e pelo software *FlowJo 10.0.4*. (Treestar, Inc., San Carlos, CA) e as amostras que continham células com o perfil de iTreg foram contadas em câmara de Neubauer com azul de tripano e submetidas aos ensaios subsequentes.

3.8 Imunoprecipitação de Cromatina

A ligação do complexo transcricional de NF- κ B (contendo a sub-unidade c-REL) às regiões promotoras do genoma humano, tanto as células T naive, quanto nas células iTregs, foi avaliada por meio de ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com o kit comercial *Magna ChIP™ G* (Cat.No 17-611) e do kit *EZ-Magna ChIP™ G* (Cat.No 17-409) (Millipore), conforme as normas do fabricante e atrelada a técnica de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real) (ChIP-qPCR) e também com a técnica de sequenciamento de nova geração.

Inicialmente, por volta de 1×10^7 células, tanto as células T naive recém-coletadas do SCU, quanto as iTregs geradas após as condições de cultura descritas anteriormente, foram fixadas (crosslink) com formaldeído (Sigma-Aldrich, Cat.No F8775, Steinhein, Alemanha) na concentração final de 1% (v/v) em próprio meio de cultura, por 15 minutos à temperatura ambiente. A fixação foi neutralizada com a adição de Glicina (GE Healthcare, Cat.No 17132301) na concentração final de 125mM por 5 minutos, sob leve homogeneização. Após este período, as células foram lavadas por duas vezes com 10mL de PBS 1x gelado, centrifugadas a 1000 xg por 5 minutos, e eluídas em uma solução de PBS 1x com a adição da solução de Coquetel Inibidor de Protease (Sigma-Aldrich, Cat.No P2714) (proporção de 1/200 (v/v)) e congelados à -80°C.

Posteriormente, as células foram descongeladas e ressuspensas em 500uL de tampão de lise celular (Millipore, Cat.No CS200634), com a adição do coquetel inibidor de protease II

MATERIAL E MÉTODOS

(1/200) e mantidas em gelo por 10 minutos. Depois, foram centrifugadas à 800 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O material foi eluído em 500uL de tampão de lise nuclear (Millipore, Cat.No CS200623) e separados em alíquotas de 100uL em tubos de 0,5mL (*Bioruptor® Plus Microtubes* - Cat.No C30010013 (Diagenode)).

Seguidamente, as alíquotas foram submetidas, em série, ao processo de fragmentação das cromatinas, por sonicação, no aparelho *Bioruptor Pico®* (Diagenode, Cat.No B01060010) com 14 ciclos de 30 segundos de vibração (*pulso on*) e 60 segundos de descanso (*pulso off*) em água com temperatura controlada de 4° C, de maneira que os fragmentos gerados atingissem o tamanho aproximado de 200 a 600 pares de base.

Para avaliar o tamanho aproximado dos fragmentos gerados pela sonicação, foi realizado um passo de checagem, que consistiu na retirada de uma alíquota de 20 uL e submetê-las à digestão do RNA, pela adição de 4 uL de RNase A (10 mg/mL) (*Ribonuclease A from bovine pancreas*, Sigma-Aldrich, Cat.No R6513) e das proteínas pela adição de 4 uL da enzima Proteinase K (20mg/mL) (Merck, Cat.No 539480) em um ciclo de temperatura composto por 37°C por 30 minutos seguido por 2 horas incubadas à 62°C, essas alíquotas foram aplicadas em gel de agarose (GibcoBRL, Cat.No A9539) 2% em tampão TEB 1x (89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2 mM EDTA), corado com 1,2 % (v/v) SYBR® Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen™, Cat.No S7563) e corridos à 90 volts em cuba com TEB 1x.

O complexo de esferas (*beads*) magnéticas com os anticorpos foram preparados com a adição de 20uL das esferas magnéticas revestidas com proteína A/G (Cat.No CS203152), lavadas duas vezes com 1 mL da solução de bloqueio (Blocking Solution, Cat.No CS203157) e a adição de 5 ug do anticorpo anti c-Rel (C) X (Santa Cruz, Cat. No sc-71 X); 1 ug do anticorpo controle positivo, anti-RNA Polymerase II (clone CTD4H8, Millipore, Cat.No 05-623B) e 1 ug do anticorpo controle inespecífico (negativo) Normal Mouse IgG (Millipore, Cat.No 12-371), com cada anticorpo em um tubo independente, incubadas em plataforma giratória sob rotação de 15 rpm e refrigeração de 4°C por um período de 16 horas. O complexo foi lavado 3 vezes com solução de bloqueio e ressuspendidas em 100 uL da mesma solução.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 (v:v) em uma solução contendo tampão de diluição (Dilution Buffer, Millipore, Cat.No CS200624) e coquetel inibidor de protease II (1:200 v:v), desta solução foram retiradas alíquotas de 5% do volume como amostra

denominada “*Input*”, e um volume de 500 uL das cromatinas fragmentadas diluídas foram incubadas com o complexo *beads* e anticorpos (para cada anticorpo), em plataforma giratória com rotação de 15 rpm e refrigeração de 4°C por um período de 16 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com 500 uL com cada um dos tampões de lavagem do complexo imunoproteico, na seguinte ordem, com baixa (Low Salt Wash Buffer, Millipore, Cat.No CS200625) e com alta (High Salt Wash Buffer, Millipore, Cat.No CS200626) concentração de sal, com solução de LiCl (Cloreto de Lítio) (LiCl Wash Buffer, Millipore, Cat.No CS200627) e com tampão TE (TE Buffer, Millipore, Cat.No CS200628). Sucessivamente, foram ressuspendidas em 100 uL de Tampão de Eluição (ChIP Elution Buffer, Millipore, Cat.No CS200629) com adição de 2 uL de Proteinase K (10 mg/mL) e incubadas por duas horas, sob agitação, em 62°C; e, logo em seguida, à 95°C por 10 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as esferas magnéticas foram separadas do sobrenadante com o uso da rack magnética (DynaL MPC®S Magnetic Particle Concentrator, Prod.No 120.20).

Cada sobrenadante, tanto os imunoprecipitados (IP) quanto os *inputs*, foram incubados por 5 minutos com 5 vezes seu volume de reagente de ligação (Bind Reagent “A”, Millipore, Cat.No 20-292) e transferidos cada um para um tubo com filtro de separação do DNA (Spin Filters com Collection Tubes, Millipore, Cat.No 20-190 e Cat.No 20-291, respectivamente) centrifugados por 10.000 xg por 30 segundos e que cada filtro da amostra foi lavado com o reagente de lavagem (Wash Reagent B, Millipore, Cat.No 20-293) e centrifugado por duas vezes, descartando o líquido, por 10.000 xg por 30 segundos e, por fim, cada amostra de DNA foi eluído do filtro, em um novo tubo, com 50 uL do tampão de eluição (Elution Reagent C, Millipore, Cat.No 20-298). As amostras de DNA eluídas dos imunoprecipitados e do *input* foram mantidas em temperatura de -20°C.

Para avaliar a eficácia da imunoprecipitação foram realizadas reações de qPCR para o conjunto de primers controle (Control Primers, Millipore, Cat.No 22-004) que cobre a região promotora do gene GAPDH (Tabela 1).

As reações foram realizadas no aparelho de detecção de PCR em tempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), em triplicata e em placas 96 poços, seguindo a proporção das soluções com 12,5 ul de Master Mix Power SYBR Green (Thermo

Fisher Scientific, Cat. No 4367659), 1,0 ul do mix de primers, 2,0 ul de DNA (*Input* e IP-RNA Pol II e IP-IgG) em volume final de 25ul, sob as condições de termociclagem com incubação a 50°C por 2 minutos, 94°C por 10 minutos, seguidos por 50 ciclos de 94°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto e a curva de dissociação que consiste em 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

A avaliação dos resultados ocorreu através do software Sequence Detection System V1.3 para a obtenção dos valores de Cq. Os dados exportados foram convertidos em arquivo Excel para o cálculo dos valores de ΔCT da seguinte forma: os valores de Ct de cada amostra imunoprecipitada foram normalizados pela subtração do valor de Ct obtido nas respectivas amostras Input (por exemplo, o valor de Ct da amostra IP das células Naive foi subtraído pelo valor de Ct obtido pela amostra *Input* Naive), além das amostras serem aplicadas em gel de agarose (2%) (m:v) para a análise das bandas de amplificação (tamanho da banda).

3.9 Análise da ligação de c-REL em sítios promotores

O enriquecimento, ou seja, a ligação do fator de transcrição c-Rel nos sítios promotores dos genes CD40, IL2RA, CD69, CREL e FOXP3, tanto em seu promotor, quanto em três regiões não codificadas altamente conservadas CNSkb1, CNSkb2 e CNSkb3, nas amostras *Input* e nas imunoprecipitados (IP) com c-Rel das células T naive e nas células iTreg, foram analisados por qPCR. Para isto, foram utilizados *primers* (Integrated DNA Technologies, Brasil) conforme o apresentado na Tabela 1. As reações de amplificação destas regiões gênicas foram realizadas no aparelho de detecção de PCR em tempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As reações foram realizadas em duplicata em placa de 96 poços, seguindo a proporção das soluções com 10ul de Master Mix Power SYBR Green, 0,8 ul de cada primers (10μM), 2,0ul de DNA (*Input* e IP c-Rel) em volume final de 20ul, sob as condições de termociclagem com incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e a curva de dissociação que consiste em 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1. Relação das sequências dos primers utilizados na metodologia de ChIP-qPCR

Primers	Sequências
Control Primers	F: 5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG -3' R: 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA -3'
IL2RA	F: 5'- GCTTATGAAGTGCTGGGTGAG -3' R: 5'- TCAGCTACGCCCATAAAAGG -3'
CD69	F: 5'- AAATTTAAGGCAGGATGTCTCAG -3' R: 5'- CCCTGTTGTCTGAAATGTGC-3'
Promotor CREL	F: 5'- ATTAGAAGAGAGAGGTCTGCGGCT-3' R: 5'- GGCTTGTGGGAAACTGTCACGTAT-3'
Promotor FOXP3	F: 5'- GTAACCTACATGCCCCCTCACC -3' R: 5'- GATATGGTCCCCATTGCTTG -3'
CNSkb1	F: 5'- TCAGATGACTCGTAAAGGGCAAAG -3' R: 5'- TCTCTCTCTCTGTGTTTCTCCT -3'
CNSkb2	F: 5'- CATAATCTGTGTCCCAGAAACATCCC-3' R: 5'- GGCTTCCTGCACTGTCTGTT -3'
CNSkb3	F: 5'- AGCTGCCTGACTTTCAGATGGTTC -3' R: 5'- GTCCCAAAGTCTCAGTATGTGTAGGC -3'

A avaliação dos resultados ocorreu através do software Sequence Detection System V1.3 para a obtenção dos valores de Cq. Os dados exportados foram convertidos em arquivo Excel para o cálculo dos valores de ΔCT da seguinte forma: os valores de Ct de cada amostra imunoprecipitada foram normalizados subtraindo o valor de Ct obtido nas respectivas amostras *Input* (por exemplo, o valor de Ct da amostra IP das células Naive foi subtraído pelo valor de Ct obtido pela amostra *Input* Naive). Após a obtenção destes valores, foram realizados os cálculos para a determinação do enriquecimento relativo (*fold enrichment*), baseados na

fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001), comparando o nível de enriquecimento de cada região das células T naive com as células iTreg.

3.10 Padronização da concentração de siRNA no ensaio de transfecção em células T naive

A padronização da concentração de siRNA contra o alvo do mRNA (RNA mensageiro) de c-Rel foram realizados conforme protocolo de transfecção previamente padronizado em outros ensaios realizados em nosso laboratório.

Inicialmente, foram realizadas as diluições do siRNA contra c-Rel (REL Silencer® Select Pre-designed siRNA – Ambion, Cat. No 4392421), siRNA contra GAPDH (Silencer® Select GAPDH siRNA – Ambion, Cat.No 4390849), siRNA contra Ubiquitina (SMARTpool: siGENOME human UBC (7316) siRNA, – Ambion, Cat.No M-019408-01-0005) e o siRNA controle inespecífico (Silencer Select Negative Control No1 siRNA – Ambion, Cat.No 4390843) sob as concentrações de 5, 10 e 20 nM em Opti-MEM™ / Reduced Serum Medium (ThermoFischer Scientific, Cat.No. 31985062), com 0,5 uL do reagente de transfecção DMRIE-C Reagent – ThermoFischer Scientific (Cat.No 10459014), para um volume final de 100 uL por poço, e posteriormente vortexados e incubados por 30 minutos.

Logo, foram incubados por 4 horas em conjunto à 300 uL de suspensão celular, contendo um total de 3×10^5 células T naive recém isoladas do sangue de cordão umbilical e prontamente suplementado com 600 uL de RPMI com 10% SFB (Soro Fetal Bovino). As amostras foram coletadas para a extração de RNA total após 72 horas de transfecção.

3.11 Padronização do ensaio de transfecção com diferentes reagentes de transfecção em células Jurkat e T naive

A padronização dos ensaios de eficiência de transfecção das moléculas de siRNA, com diferentes concentrações e reagentes de transfecção foram realizados em placas de 96 poços pretas, de fundo translúcido, específicas para ensaios baseados em análises de imagem e utilizando as células da linhagem Jurkat para posterior aplicação nos ensaios em células T naive.

Primeiramente, o siRNA marcado com molécula fluorescente FITC (Block-IT, Invitrogen, Cat.No 2013) e o siRNA controle inespecífico e foram diluídas em Meio Opti-MEM®, mantendo as concentrações finais de 30nM, que foram adicionados, vortexados e

incubados por 30 minutos em diferentes volumes de diferentes agentes de transfecção (DharmaFECT® - ThermoFischer Scientific – 1 (cat#T-2001-03), 2 (cat#T-2002-03), 3 (cat#T-2003-03) e 4 (cat#T-2004-03) nos volumes de 0,05 uL, 0,1 uL e 0,2 uL por 100 uL volume final; DMRIE-C Reagent - ThermoFischer Scientific, nos volumes de 0,25 uL, 0,5 uL e 0,75 uL por 100 uL volume final e siPORT™ NeoFX siRNA Transfection Agent – ThermoFischer Scientific (Cat.No AM4510), nos volumes de 1 uL, 2 uL e 4 uL por 100 uL volume final) constituindo a solução de transfecção em um volume final de 20 uL/poço.

Após o preparo e a distribuição da solução de transfecção nas placas, foram distribuídos e homogeneizados 80 uL/poço da suspensão celular contendo $5,3 \times 10^4$ células por poço em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na ausência de antibióticos.

As placas com os tratamentos de transfecção foram incubadas em estufa de ambiente controlado (5% de CO₂; 85% de umidade relativa e temperatura de 37°C) por 72 horas. Após este período, foram centrifugadas por 3 minutos à 800 xg. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram incubadas por 20 minutos com 100 uL de solução de marcação, contendo dois corantes sendo um não permeável às membranas intactas, a solução de Iodeto de Propídio (PI, 1,5 ug/mL, Life Technologies) na proporção de 1:50 (v/v) e Hoechst 33342 (1uM, Life Technologies), um corante de DNA permeável às membranas, na proporção de 1:1000 (v/v) diluídos em PBS 1x.

Para a análise de viabilidade celular pós transfecção, bem como a quantificação da porcentagem de células transfectadas, foi utilizado o sistema de aquisição de imagens HCS (*High Content Screening*) ImageXpress XL da Molecular Devices, com o software MetaXpress (Molecular Devices), utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*, que realiza análise com vários fluoróforos, sendo que um deles deve identificar núcleos (definindo o que é célula). As imagens foram obtidas utilizando a lente objetiva de 10X e 20X e os núcleos foram segmentados embasando-se na imagem gerada pelo canal de DAPI (marcação com Hoechst 33342), permitindo a identificação das células. Os núcleos positivos para o canal Cy3 (marcação de PI) foram identificados como “células inviáveis” e as células positivas para FITC, foram chamadas de “células transfectadas”. Novamente, os dados obtidos foram exportados para planilhas de Excel para posterior análise das porcentagens.

3.12 Extração do RNA

O RNA total das células obtidas, tanto no isolamento das células T Naive, quanto na geração das células iTreg, quanto no ensaio de transfecção, foram obtidos utilizando o método de extração de RNA por Trizol-LS Reagent (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) padronizado pelo laboratório. Em suma, foram utilizadas aproximadamente 5×10^6 células para cada extração. Após lavagem, houve a sedimentação das células por centrifugação e adicionou-se às amostras o volume de 250 μ l de PBS 1x tratado com DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 750 μ l de TRIZOL. Os tubos foram armazenados em freezer à temperatura de -80°C .

As amostras foram descongeladas e a cada uma adicionou-se 10 μ l de glicogênio e 200 μ l de clorofórmio e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 1200 xg por 15 minutos a 4°C . Após centrifugação, os homogenatos ficaram separados em 2 fases: uma aquosa contendo o RNA total e outra orgânica contendo o DNA e proteínas. Os anéis da fase aquosa foram recolhidos cuidadosamente, e transferidos para tubos limpos e, em seguida, foi adicionado 500 μ l de isopropanol gelado em cada tubo. A precipitação ocorreu à temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1200 xg por 15 minutos a 4°C , e, posteriormente o sobrenadante foi descartado.

Os sedimentos formados foram ressuspensos em etanol 70% e centrifugados a 1200 xg por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram novamente descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 15 μ l de água livre de RNase. Os RNAs foram congelados em freezer à temperatura de -80°C .

3.13 Quantificação das amostras

Os RNAs totais obtidos das amostras foram quantificados utilizando 2 μ L de cada amostra no espectrofotômetro Nanovue *Plus* (General Electronics, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 $\mu\text{g/ml}$ para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 nm, sendo considerada uma boa extração àquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8.

3.14 Transcrição Reversa

As amostras de RNA total obtidas foram submetidas a reação de transcrição reversa, utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat.No 4368813), com a utilização de 1 ug do RNA total extraído e seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes foram diluídas em água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, EUA) na concentração final de 10 ng/uL, para então serem utilizadas nas análises de expressão gênica por PCR em tempo real.

3.15 Análise de expressão gênica

Para avaliar o efeito molecular da transfecção dos siRNAs contra c-Rel, contra GAPDH e do Controle Inespecífico, nas células T naive, os transcritos diluídos foram analisados por PCR quantitativo em tempo real com os primers que cobrem as regiões do gene REL e do gene endógeno do GAPDH, usado para normalização interna das amostras.

As reações foram realizadas no aparelho de detecção de PCR em tempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), em duplicata, utilizando placa de 96 poços com adição de 10ul de Master Mix Power SYBR Green, 0,8 ul de cada primers (10μM), 2,0ul de cDNA em volume final de 20ul e submetidas às condições de termociclagem com incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e a curva de dissociação que consiste em 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

Os resultados de Cq foram obtidos através do software Sequence Detection System V1.3 e exportados para planilhas do software Excel. Os resultados foram normalizados, subtraindo o valor do Cq obtido para cada amostra, pelo valor de Cq obtido pelo controle endógeno GAPDH. Estes valores foram novamente normalizados pela subtração dos resultados obtidos dos ΔC_t das amostras, pela média dos ΔC_t das amostras transfectadas com siRNA Controle inespecífico e o valor obtido de cada normalização foi utilizada como referência para o cálculo de valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4. RESULTADOS

4.1 Pureza das células T naive obtidas após coluna imunomagnética

O protocolo de isolamento de Tnaive de sangue de cordão umbilical, padronizado em nosso laboratório está bem estabelecido e reprodutível, conforme descrito, sendo utilizado nas 5 bolsas de sangue de cordão umbilical aplicadas para obtenção dos resultados.

Avaliou-se o percentual de células $CD4^+CD25^-CD45RA^+$ (Figura 1), obtendo-se, dentro das 5 bolsas, uma média do grau de pureza de 80,46%,

Figura 1. Avaliação por citometria de fluxo da pureza das células T naive ($CD4^+CD25^-CD45RA^+$) obtidas por seleção imunomagnética das células a partir do sangue de cordão umbilical. Para avaliação da pureza, com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC), foi determinada uma região excluindo debris (células mortas, fragmentos celulares e sujeira) e englobando todas as células sanguíneas (Linfócitos). Figura representativa do dot plot da expressão dos marcadores CD4 e CD25, assim como a expressão de CD45RA. Imagem retirada do software FlowJo 10.0.4.

4.2 Caracterização imunofenotípica das células iTreg

Bem como o protocolo de isolamento, o processo de geração de iTreg por meio da adição de IL-2, TGF- β e atRA também está bem estabelecido em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, com a caracterização imunofenotípica com base nos seguintes marcadores: CD69, CD127, TNFR2, GITR, CTLA-4, LAP e FOXP3. Entretanto, neste trabalho, analisou-se como iTregs as células que apresentam o perfil imunofenotípico $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$, já que alguns trabalhos apontaram que as células $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{hi}$ apresentam uma larga expressão de FOXP3 (RONCADOR et al., 2005) e, também, a maioria das células Tregs apresentam o perfil imunofenotípico $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$ (SHEN et al., 2009).

Os resultados obtidos da análise da citometria foram separados em uma *gate* denominada “linfócitos” e as análises dos marcadores foram aplicados nesta população

RESULTADOS

selecionada. A expressão dos marcadores FOXP3 e CD127 foram analisados dentro da população $CD4^+CD25^+$ - quadrante duplo positivo – (células ativadas) (Figura 2).

Dentre os quatro experimentos de geração de iTregs, a média da expressão do marcador FOXP3 foi de 98,42% e a média da ausência de expressão de CD127 foi de 98,24%, sendo, então, consideradas iTreg e utilizadas para os experimentos subsequentes.

Figura 2. Análise por citometria de fluxo da geração de iTreg, com marcadores CD4, CD25, FOXP3 e CD127. À superior esquerda, dot plot representativo de tamanho por complexidade interna indicando a delimitação da região dos linfócitos; dot plot representativo mostrando as populações das células geradas e análise da expressão dos marcadores FOXP3 e CD127 (quadros inferiores) das células $CD4^+ CD25^+$ (superior direito). Os eventos fora da gate “Lymphocytes” representam células mortas, debris celulares, ou não consideradas. Imagem retirada do software FlowJo 10.0.4.

4.3 Imunoprecipitação de Cromatina

A técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foi desenvolvida em meados de 1980, por Gilmour e Lis, como uma ferramenta para monitorar a associação de RNA polimerase II com genes transcritos de *Escherichia coli* e de *Drosophila melanogaster* (CAREY; PETERSON; SMALE, 2009). Desde então tem sido empregada como um método de valor inestimável para a compreensão da interação DNA-proteína ou modificações de histonas em regiões do DNA genômico (CAREY et al., 2009; SPENCER et al., 2003).

4.3.1 Ligação de c-Rel na região promotora do receptor de IL-2

A imunoprecipitação da cromatina ligada a c-Rel, realizada em 3 experimentos individuais, foi normalizada pelos valores obtidos pela média dos Cqs das respectivas amostras *Input*, demonstrando assim que a subunidade c-Rel está 11,7 vezes mais ligada às regiões promotoras do receptor de IL-2R α (CD25) nas células iTregs, quando comparada às T naive, no primeiro experimento. Este padrão se repete com o aumento de 1,2 vezes no segundo e de 11,8 vezes no terceiro experimento, com a média de ligação de c-Rel na região promotora de IL-2 de 8,26 vezes maior nas iTregs do que nas T naive (Figura 3).

Figura 3. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de IL2RA. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene IL2RA em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra *Input*. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

4.3.2 Ligação de c-Rel na região promotora do gene REL

Foi constatado que o componente c-Rel que foi imunoprecipitado, se liga fortemente à região promotora do gene REL nas células iTreg, com a média das razões iTreg/Tnaive de enriquecimento em 8,12 (6,8 no primeiro, 14,3 no segundo e 3,22 no terceiro experimento) vezes mais ligado nas células iTregs, quando comparadas às T naive (Figura 4).

Figura 4. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de REL. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene REL, que codifica a proteína c-Rel, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naíve na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

4.3.3 Ligação de c-Rel na região promotora do gene que codifica o CD69

Foi realizada também a análise referente a interação do fator de transcrição c-Rel com o DNA genômico, na região que confere o promotor do gene que codifica a proteína CD69 – uma proteína de membrana conhecida como um marcador inicial de ativação de linfócitos (CAMBIAGGI et al., 1992; CEBRIAN et al., 1988; MARDINEY et al., 1996).

A análise da imunoprecipitação de cromatina permitiu observar indícios que c-Rel pode estar envolvido na expressão desta proteína, uma vez que c-Rel é mais enriquecido nas iTregs em uma taxa média de 3,71 vezes, quando comparado com as células T naíve (aumento de 2,34 vezes no primeiro, 2,03 vezes no segundo e 6,75 vezes no terceiro experimento) (Figura 5).

Figura 5. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região promotora de CD69. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região promotora do gene CD69, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

4.3.4 Ligação de c-Rel na região do gene FOXP3

- Locus FOXP3

Visto a importância em função e como um dos principais marcadores das células T regulatórias, a proteína FOXP3 (FEUERER et al., 2009; FONTENOT et al., 2003) é reconhecida como controlador das células Tregs (ZHOU, X. et al., 2009). Com isso em mente, avaliamos a possível interação do fator de transcrição c-Rel com o DNA genômico, nas principais regiões descritas do locus FOXP3 – Região Promotora e Região CNS3 (kb1, kb2 e kb3).

4.3.4.1 Ligação de c-Rel na região do Promotor de FOXP3

A região promotora foi um dos alvos escolhidos para a avaliação do enriquecimento de c-Rel nesta região, visto a importância para a transcrição do gene, com sua expressão aumentada quando avaliada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram uma média da razão do enriquecimento de iTreg/Naive de 20,15 vezes, com 44,01 vezes no primeiro e, 15,13 e 1,31, respectivamente, no segundo e terceiro experimentos (Figura 7).

Figura 6. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região do Promotor de FOXP3. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do Promotor de FOXP3, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naíve na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

4.3.4.1 Ligação de c-Rel na região CNS3 (kb1, kb2 e kb3) do gene FOXP3

A região CNS3 é descrita como uma região rica em ilhas CpG, que são desmetiladas nas células Tregs (KIM, J. Y. et al., 2007) esta região foi dividida em três regiões intensificadoras principais, nomeadas de kb1, kb2 e kb3 (LONG, S. A. et al., 2009).

Nossos resultados demonstram um aumento médio de 16,9 vezes na ligação de c-Rel nas células iTregs geradas, quando comparadas com as T naíve, na região CNS3kb1, assim como um aumento médio de 17,2 e de 23,29 vezes nas regiões CNS3kb2 e CNS3kb3, respectivamente (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 7. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb1. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb1, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

Figura 8. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb2. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb2, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

Figura 9. Imunoprecipitação de cromatina de c-Rel na região CNS3kb3. A – Enriquecimento da cromatina imunoprecipitada com anticorpo anti-c-Rel na região do CNS3kb3, em 3 experimentos independentes. Os resultados são normalizados pelo valor do *fold change* da amostra Input. B – Enriquecimento relativo encontrado pelo cálculo da razão do enriquecimento (*fold Enrichment*) das amostras iTreg pelas células T naive na mesma região promotora, nos experimentos independentes e a média destes experimentos.

4.4 Padronização da concentração de siRNA no ensaio de transfecção em células T naive

Os ensaios da padronização da concentração de siRNA contra c-Rel por análise molecular foram realizados conforme protocolo de transfecção descrito no item 3.9 do Material e Métodos. Os resultados de expressão gênica relativa para o gene Rel não evidenciaram o efeito do silenciamento específico esperado pelas células que foram cultivadas com as soluções de transfecção com a adição do siRNA contra c-Rel, em nenhuma concentração, ademais, uma diminuição e uma heterogeneidade nesta expressão foi visualizada nas condições que continham apenas a solução de transfecção (mock), portanto na ausência de siRNA (Figura 11).

Estes resultados incoerentes, em adição com a ausência do efeito letal nas células sob o tratamento com o siRNA contra ubiquitina (dados não apresentados), sugeriram diversas hipóteses para o insucesso deste experimento. Dentre todas, foi decidido testar a eficiência de transfecção, que pode não ser satisfatória, ou seja, os reagentes de transfecção são incapazes, diante das condições apresentadas, de internalizar as moléculas de siRNA pela membrana celular.

Figura 10. Representação gráfica dos resultados de expressão gênica do mRNA de c-Rel obtidos da transfecção de células T naïve. As células T naïve foram tratadas com o reagente de transfecção DMRIE-C e em 3 concentrações diferentes de siRNA (5, 10 e 20 nM) por 72 horas. As análises de expressão relativa (*fold change*) foi realizada pelo método de 2^{-ddcq} em que a normalização do dcq foi realizado pela média dos cqs do gene endógeno e a normalização do ddcq foi realizada pela média dos dcqs das amostras tratadas com siRNA controle.

4.5 Padronização do ensaio de transfecção com diferentes reagentes de transfecção

4.5.1 – Em células Jurkat

Os resultados da padronização de transfecção nas linhagens de Jurkat, utilizando os reagentes de transfecção DharmaFECT®1, DharmaFECT®2, DharmaFECT®3, DharmaFECT®4, DMRIE-C e siPORT estão representados nas figuras de número 12 a 17.

Os gráficos representam as porcentagens de células não transfectadas viáveis, não transfectadas inviáveis, transfectadas viáveis e transfectadas inviáveis, além de apresentar as quantidades de células relativas ao controle.

Os reagentes de transfecção DharmaFECT®2, DharmaFECT®3 apresentaram os piores resultados de transfecção de células viáveis, com porcentagem inferior à 0,09% na condição intermediária (0,1 uL/100 uL de volume final) do reagente DharmaFECT®3 (Figura 14). O reagente siPORT apresentou taxas de transfecção de células viáveis superiores aos encontrados

RESULTADOS

nas transfecções utilizando DharmaFECT®2, DharmaFECT®3, com 0,13%, 0,20% e 0,30% nas concentrações de 0,176; 0,353 e 0,706 uL/100 uL v.f., porém, apresentaram uma variação de 34,89%, 11,78% e aumento de 33,15%, respectivamente, na viabilidade celular, se comparado ao controle (Figura 16).

A princípio, nas concentrações de DharmaFECT®1, 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f. apresentaram 0,075%, 0,10% e 0,06%, respectivamente, de transfecção em células viáveis (Figura 12), e nas mesmas concentrações de DharmaFECT®4 foi possível observar os valores de 0,19%; 0,18% e 0,14% de transfecção (Figura 15). Com as concentrações de 0,04; 0,08 e 0,13 uL/100 uL v.f. de DMRIE-C, foi possível analisar uma taxa de 0,71%; 0,26% e 0,16% de transfecção das células viáveis (Figura 17).

Figura 11. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas, transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

RESULTADOS

Figura 12. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT2. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 13. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT3. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

RESULTADOS

Figura 14. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT4. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 15. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção siPORT. Foram utilizadas as concentrações de 0,176; 0,353 e 0,706 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 16. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,04; 0,08 e 0,13 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Perante tais resultados, foram repetidas as padronizações de transfecção com as concentrações de 0,75 uL; 1,0 uL e 1,5 uL/100 uL v.f para o reagente DharmaFECT®1 e para DharmaFECT®4, indicando uma eficiência de transfecção de 14,38%, 19,89% e 22,14% da menor para a maior concentração de DharmaFECT®1 (Figura 18). As taxas de transfecção para as mesmas concentrações de DharmaFECT®4 foram de 22,43%, 23,81% e 43,14% (Figura 19).

Foram repetidas as padronizações com o reagente DMRIE-C para as concentrações de 0,08; 0,16 e 0,32 uL/100 uL v.f., que manifestaram as seguintes taxas de transfecção: 10,5%, 18,59% e 27,59%, respectivamente (Figura 20).

Figura 17. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 18. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DharmaFECT4. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 19. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em Jurkat, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,08; 0,16 e 0,32 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

4.5.2 – Em células T naive

As condições de 0,75 uL; 1,0 uL e 1,5 uL/100 uL v.f para o reagente DharmaFECT®1 e as concentrações de 0,08 uL; 0,16 uL e 0,32 uL/100 uL v.f do reagente DMRIE-C foram realizadas nas células T naive recém isoladas do sangue de cordão umbilical e apresentaram as taxas de transfecção de 9,81%, 7,66% e 16,35% da menor para a maior concentração de DharmaFECT®1 (Figura 21) e taxas de transfecção de 6,28%, 12,63% e 25,94 % da menor para a maior concentração de DMRIE-C (Figura 22).

Entretanto, foi observado um grande número de morte celular, tanto nas células tratadas, quanto nas amostras controle, fator que evidencia que as células T naive necessitam de estímulos para a sobrevivência e para proliferação celular, como a adição de IL-2 ao meio.

RESULTADOS

Figura 20. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em células T naive, com o reagente de transfecção DharmaFECT1. Foram utilizadas as concentrações de 0,75; 1,0 e 1,5 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

Figura 21. Representação gráfica dos resultados do teste de transfecção de siRNA FITC em células T naive, com o reagente de transfecção DMRIE-C. Foram utilizadas as concentrações de 0,08; 0,16 e 0,32 uL/100 uL v.f., num período de 72 horas. No gráfico, é possível visualizar as porcentagens de células viáveis não transfectadas e transfectadas, não viáveis transfectadas e não transfectadas, e do total de células relativo ao controle negativo. Análise realizada com o ImageXpress XL, com o software MetaXpress, utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring*.

5. DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e geração de células iTregs CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺

Tendo em vista a importância do papel das células Tregs na homeostase do sistema imune, a intenção do presente trabalho foi estudar a interação da subunidade c-Rel com algumas regiões promotoras do genoma, em células T naive isoladas do sangue de cordão umbilical e em iTregs geradas *in vitro*, com isso foi possível correlacionar as possíveis interações desta subunidade da via NF-κB com alguns fatores importantes nestas células e, assim sendo, avaliar as alterações, tanto positivas quanto negativas, geradas neste processo de diferenciação celular.

Diante do fato de que os ensaios de diferenciação celular, realizados neste trabalho, requerem um alto grau de pureza e a necessidade de um grande número celular, o uso do sangue de cordão umbilical foi necessário, visto que este é descrito como uma potente fonte inicial para o isolamento de células T naive, devido o elevado percentual deste tipo celular (Szabolcs, et al. 2003) e o uso do processo de separação celular (seleção negativa) foi permitido a obtenção de uma população, caracterizada imunofenotipicamente por CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺, com elevado grau de pureza, obtendo-se, dentro das bolsas utilizadas, uma média do grau de pureza de 85,46%. Esses dados foram favoráveis para o progresso dos experimentos, com a geração de iTregs a partir desta população de T naive isolada.

O protocolo de isolamento e de geração, foram inicialmente baseados em trabalhos na literatura, que descrevem a geração destas células, assim como em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa que definiu as condições experimentais para garantir a eficácia e a reprodutibilidade do protocolo de isolamento e da geração das células do estudo (SCHIAVINATO et al., 2017).

O protocolo de geração de iTreg definido em nosso laboratório com o uso de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, em adição de fatores que auxiliam ou induzem a proliferação e a geração de células com o perfil regulatório. Um destes fatores é o IL-2, uma interleucina relacionada a proliferação e a sobrevivência dos linfócitos (Sakaguchi, et al. 2007), que possivelmente representa uma das moléculas-chave na homeostase celular, podendo atuar como um indicador (sinal de alarme) de ativação excessiva de células T, e por exemplo, aumentando o recrutamento e assim o número de células Treg no ambiente inflamatório (Amado, et al. 2013).

Foi empregado também o uso do fator como o TGF- β , uma família de citocinas anti-inflamatórias, expressa em seres humanos, que apresenta o envolvimento em processos como embriogênese (Ma, et al. 1998; Thornton and Shevach 2000), carcinogênese (Shin, et al. 2008; Thornton, et al. 2000) e resposta imune (Nestorowicz, et al. 1998; Thornton and Shevach 1998), e neste contexto, participa do processo de crescimento e o desenvolvimento das células T. TGF- β induz a ativação da via Smad2/3 nas células CD4⁺, no início da diferenciação de linfócitos Treg e Th17 (Lu *et al.*, 2011; Chen e Konkel, 2010), por isso foi descrita inicialmente como um fator inicial para a expressão e a estabilização de FOXP3 (Lu, L. *et al.*, 2010; Massague, 1996).

Células iTregs geradas por TGF- β apresentam um potente efeito imunossupressor *in vivo* e *in vitro* (Apostolou, et al. 2008; Bettelli, et al. 2006; Chen, et al. 2003a; Chen, et al. 2003b; Fantini, et al. 2004), porém alguns autores têm demonstrado algumas diferenças significativas no comportamento das iTregs geradas por TGF- β quando comparadas às nTregs (Horwitz, et al. 2008a), sendo refletido nos perfis de expressão com similaridade apenas parcial (Feuerer, et al. 2010). Possivelmente por este motivo, células cultivadas apenas em TGF- β não apresentam uma alta capacidade supressora (Horwitz, Zheng *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2007), com isso em mente, foi adicionado o atRA como outro fator para favorecer a diferenciação celular.

O ácido trans-retinóico, atRA, é um fator que permite a estabilização da expressão de FOXP3, tornando-a constitutiva, *in vitro e in vivo* (Chen, et al. 2003c), por sua vez, garantindo o perfil celular na manutenção da tolerância imunológica. A utilização do atRA é importante pelo seu efeito descrito ser mediado pelo receptor nuclear RAR α , que ao ser ativado pode modular positivamente a expressão de FOXP3 e negativamente a expressão de IL-17, levando a polarização das células T naive para um fenótipo regulatório, ou seja, em Tregs, através da inibição da polarização em Th17 (Elias *et al.*, 2008; Mucida *et al.*, 2007). Também é descrito que o atRA promove o aumento da fosforilação de Smad2/3 e a abertura da cromatina na região do promotor do gene FOXP3, permitindo o aumento da expressão da proteína FOXP3 e, consequentemente a diferenciação das células FOXP3⁺ (Kang *et al.*, 2007).

O uso destes fatores de maneira isolada apresentam a capacidade de promover a geração de iTregs (Davidson, et al. 2007; Zheng, et al. 2008; Zheng, et al. 2007c; Zheng and Rudensky 2007), entretanto leva ao decaimento da expressão de FOXP3 nessas células (Zheng, et al. 2007a; Zheng, et al. 2007e). Adicionalmente ao descrito anteriormente, o tratamento de células T naive humanas ativadas, com o conjunto dos três fatores (IL-2, TGF- β e atRA), pode gerar

células com perfil regulatório, iTregs (CD25⁺FOXP3⁺), com características fenotípicas e funcionais semelhantes as nTregs (Lu, Zhou *et al.*, 2010; Lu, Ma *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014).

Diante dessas informações, neste trabalho, foi realizado o tratamento das células T naíve, isoladas do sangue de cordão umbilical, com o fenótipo (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺) ativadas, com anticorpos que coestimulam os receptores CD2, o TCR e o CD28, e cultivadas durante cinco dias com o tratamento concomitante com IL-2, TGF- β e aTRA.

Visto que em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, utilizamos como caracterização imunofenotípica em diversos marcadores, tais como: CD69, CD127, TNFR2, GITR, CTLA-4, LAP e FOXP3 (SCHIAVINATO *et al.*, 2017), porém foi definido a caracterização das células geradas com base no perfil imunofenotípico CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻, uma vez que sabe-se as células CD4⁺CD25⁺ (Hori *et al.*, 2003) e CD4⁺CD25^{hi} apresentam elevada expressão de FOXP3, este último em quase sua totalidade (RONCADOR *et al.*, 2005) e, também, a maioria das células Tregs, com função supressora, apresentam o perfil imunofenotípico CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ (SHEN *et al.*, 2009).

Dentro da população T regulatória, a expressão de FOXP3 é considerada essencial, visto que este fator de transcrição é um dos constituintes mais importantes (Feuerer, *et al.* 2009; Fontenot, *et al.* 2003). Como descrito anteriormente, a importância da expressão de FOXP3, é dada tanto nas iTregs quanto nas nTregs, uma vez que todas Tregs com atividade supressora o expressam, sugerindo que esse fator de transcrição seja um marcador definitivo de Tregs (Fontenot, *et al.* 2005). Assim como a perda de sua expressão pode direcionar as Tregs a se converterem em células Th17, ou induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e INF- γ (Komatsu, *et al.* 2009; Yang, *et al.* 2008). Em camundongos, a deficiência do gene FOXP3 provoca um quadro de autoimunidade sistêmica. No entanto, apesar de necessário, FOXP3 não é o suficiente para a geração dessas células *in vitro* (Fontenot, *et al.* 2003; Hori, *et al.* 2003).

Entretanto essa importância exclusiva da expressão de FOXP3 em células T regulatórias, pode ser discutida, visto que alguns trabalhos demonstraram que em humanos esse fator transcricional é inicialmente expresso nas células T CD4⁺ ativadas, de forma geral, não sendo, portanto, um reflexo direto e exclusivo da capacidade regulatória das células Tregs (Roncador *et al.*, 2005; Fontenot *et al.*, 2005).

Em contrapartida, FOXP3 é reconhecido como um dos principais controladores das funções das células regulatórias, não só no processo de iniciação e manutenção da função supressora das Tregs, mas também atuante como supressor transcricional ou como possível inibidor da produção de várias citocinas pró-inflamatórias e proteínas citolíticas pelas próprias Tregs (Zhou, et al. 2009), visto que a perda da expressão de FOXP3 pode levar as iTregs a se converterem em Th17 (Yang, et al. 2008) e assim, secretarem citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e INF- γ (Komatsu, et al. 2009).

Adicionalmente à avaliação da expressão de FOXP3, foi analisado a expressão de CD127 destas células geradas, com a finalidade de caracterizar as iTreg deste trabalho com o perfil CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻, uma vez foi descrito a similaridade da expressão de todos esses marcadores quando comparada às nTregs isoladas de sangue periférico de doadores saudáveis (SCHIAVINATO et al., 2017) e neste trabalho foi obtido uma média da expressão do marcador FOXP3 foi de 98,42% e a média da ausência de expressão, ou melhor a repressão de CD127 foi de 98,24%.

Esses resultados estão em coerência com os achados na literatura, visto que CD127 é definido como o receptor de IL-7, molécula capaz de distinguir, por sua baixa expressão, os linfócitos ativados CD25⁺ efetores de linfócitos CD25⁺ regulatórios (Liu, et al. 2006b; Seddiki, et al. 2006). Essa expressão inversa é descrita e explicada pela possível interação do fator de transcrição FOXP3 com o promotor do CD127 resultando na diminuição da expressão desse marcador em células Tregs (Liu, Putnam *et al.*, 2006; Draenert *et al.*, 2006), podendo ser considerado como um dos principais marcadores (ausência de expressão) de superfície para caracterizar as células Tregs (Sakaguchi, Ono *et al.*, 2006; Liu, Putnam *et al.*, 2006).

5.2 Análise da ligação de c-Rel em sítios promotores de genes

O ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) é uma técnica experimental muito valiosa para o estudo das interações entre proteínas específicas ou formas modificadas de proteínas com regiões do DNA genômico (Carey, et al. 2009; Spencer, et al. 2003), como por exemplo ser utilizada para determinar se um fator de transcrição tem interação com um gene alvo candidato, em que região do gene, assim como para monitorizar a presença de histonas com modificações pós-traducionais em locais genômicos específicos (Zeng, et al. 2006). O primeiro ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foi desenvolvido por Gilmour e Lis, em meados de 1980, como uma técnica para monitorar a associação da RNA polimerase II com

genes transcritos de *Escherichia coli* e de *Drosophila* (Carey, et al. 2009) e mais recentemente a união da técnica de ChIP com a detecção em microarray (ChIP-chip) e de sequenciamento (ChIP-seq) possibilitou que pesquisadores possam criar mapas de interação entre proteínas e DNA com maior resolução de dados (Carey, et al. 2009).

Os resultados obtidos da imunoprecipitação de cromatina nos permitiram buscar algumas regiões alvo de c-REL, que estão interessantemente relacionados ao processo de diferenciação de células T naive em células Treg para o presente no estudo.

5.2.1 Ligação de c-Rel na região promotora do gene ILR2A

Com a ideia de buscar esses alvos, houve a possibilidade de identificar o enriquecimento de c-REL na região promotora do gene *ILR2A*, que codifica o receptor IL-2R α , também conhecido como CD25. Este é um marcador indispensável para a manutenção de crescimento e de sobrevivência celular e, também, função imunológica (BAECHER-ALLAN et al., 2001), além de ser um dos marcadores de membrana celular que distinguem as células T regulatórias, este marcador é relacionado à molécula de IL-2 (SAKAGUCHI; WING; MIYARA, 2007).

A interleucina IL-2, como mencionado anteriormente para a suplementação do meio de cultura no processo de geração de iTregs, por ser relacionada com o aumento no número de células Treg (AMADO et al., 2013), além disso, representa uma molécula fundamental garantia da sinalização do microambiente celular, atuando como um indicador de ativação excessiva das células T. Esta interleucina

A expressão elevada e constitutiva de CD25 é atualmente descrito como um dos mecanismos de ação das Treg, com a função de supressão da sinalização pró-inflamatória do ambiente inflamatório, isso por que, quanto mais expresso o receptor CD25, nas Tregs, mais estes receptores “sequestrarão” as moléculas de IL-2 contida na região, privando as células efectoras vizinhas de receberem os sinais de proliferação decorrentes desta interleucina (MALOY; POWRIE, 2005).

Combinando nossos resultados de citometria de fluxo que demonstram o aumento na expressão de CD25 nas células iTregs (expressão média de 70% da população duplo positiva), quando comparadas com as T naive, com os resultados obtidos na imunoprecipitação de cromatina, em que vimos o enriquecimento médio de 8,26 vezes e em dois experimentos com

mais de 10 vezes maior nas iTreg comparando com as T naives, foi possível indicar que c-Rel pode participar na regulação gênica positiva deste gene, possibilitando o aumento da expressão de IL-2R (CD25), auxiliando no destino regulatório destas células, uma vez que este receptor é crucial para a proliferação celular e o desempenho da função imunológica regulatória (GERONDAKIS et al., 2014).

5.2.2 Ligação de c-Rel na região promotora do gene REL

Baseados em trabalhos que avaliam as características imunomodulatórias com o uso de camundongos deficientes para c-Rel, e pautados nos principais resultados da diminuição do número de Tregs (DEENICK; MA, 2011) e no comprometimento da geração de Treg (DEENICK et al., 2010; GILMORE; GERONDAKIS, 2011; ISOMURA et al., 2009; REINHARD et al., 2011), foi decidido investigar a participação de c-Rel no enriquecimento da região promotora que o codifica (gene REL).

Sabe-se que esta subunidade c-Rel desempenha diversos papéis na atividade imune mediada por células (GHOSH; HAYDEN, 2008; XIAO et al., 2006) e na ativação das células T (BUNTING et al., 2007), podendo regular a transcrição de uma vários genes, assim como participar na sinalização essencial para o desenvolvimento de células T regulatórias *in vivo* (SOLIGO et al., 2011). Após o processo de ativação celular, é descrito que c-Rel se deslocara o núcleo e se liga aos sítios do gene FOXP3, sendo assim associado ao início da transcrição de Foxp3 timócitos (SOLIGO et al., 2011) e posteriormente mantendo a estabilidade e a função das células Tregs (HSIEH, H. L. et al., 2010).

Foi constatado que a subunidade c-Rel se liga à região promotora do gene REL nas células iTreg, com a média das razões iTreg/Tnaive de enriquecimento, de 8,12 vezes mais ligado do que quando comparadas às T naive (Figura 4), essa informação corrobora a ideia de que c-Rel pode desempenhar um papel de amplificação ou sustentação da resposta transcricional de genes relacionados com as proteínas de NF- κ B, como o próprio gene REL, que o codifica (BUNTING et al., 2007).

Além da participação direta ou indireta na indução da transcrição do gene FOXP3, c-Rel também é descrito como essencial, porém não exclusivo, na produção de citocinas como IL-2, GM-CSF, IL-3, IFN- γ e IL-21 (GILMORE; GERONDAKIS, 2011; HORI et al., 2003; LUGLI et al., 2013). Essa ausência de exclusividade, que é relacionado à redundância de c-Rel

com outros membros de NF- κ B, evidencia que há uma possível função de amplificação ou apenas de sustentação da resposta transcricional desses demais genes (BUNTING et al., 2007; YU et al., 2013), uma vez foi descrito que c-Rel pode ser dispensável para a função das Tregs “maduras”, que exercem suas principais funções sendo dirigida exclusivamente por FOXP3 (GILMORE; GERONDAKIS, 2011).

5.2.3 Ligação de c-Rel na região promotora do gene que codifica o CD69

A proteína CD69 é uma proteína de membrana conhecida como um marcador inicial de ativação de linfócitos (CAMBIAGGI et al., 1992; CEBRIAN et al., 1988; MARDINEY et al., 1996), visto que ela é expressa rápida e transientemente em linfócitos T ativados (Sancho *et al.*, 2005).

Ela é expressa logo após a ativação celular via TCR, com a indução de expressão de CD69 dentro das duas primeiras horas, como auge da taxa de expressão por volta de 16 a 24 horas após a ativação, após este período a expressão diminui gradativamente (Cebrian *et al.*, 1988; Cambiaggi *et al.*, 1992; Mardiney *et al.*, 1996). Esse processo de rápida expressão após a ativação celular via TCR, se dá devido a um mecanismo rápido de transdução de sinal (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2013), por conta da presença de fatores de transcrição de ativação rápida (Gonzalez-Amaro, et al. 2013) como o descrito estar presente na via NF- κ B (MARDINEY et al., 1996; RISSO et al., 1991; Gonzalez-Amaro, et al. 2013).

A análise da imunoprecipitação de cromatina nos demonstrou indícios que c-Rel pode estar envolvido nesta transdução de sinal para a expressão desta proteína, uma vez que c-Rel é enriquecido nas iTregs com uma taxa média de 3,71 vezes maior do que quando comparado com as células T naïve. Caracterizando uma rápida translocação de c-Rel para o núcleo e imediata expressão do marcador CD69, visto que a população celular caracterizada imunofenotipicamente como CD4⁺CD25⁻CD69⁺ tem sido descrita com um perfil regulatório, tendo em vista sua capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T (Han, Guo *et al.*, 2009).

5.3.4 Ligação de c-Rel na região do gene FOXP3

- Locus FOXP3

Conceitualmente, a proteína FOXP3 é descrita como um dos mais importantes constituintes das células T regulatórias, sendo este um dos principais marcadores fenotípicos

desta população celular (FEUERER et al., 2009; FONTENOT et al., 2003). Com 431 aminoácidos, FOXP3 é um fator de transcrição reconhecido como controlador das células Tregs, seu papel está além da iniciação e manutenção da função supressora, no entanto, também atua como supressor transcricional de várias proteínas pró-inflamatórias e proteínas citolíticas nas Tregs (ZHOU, X. et al., 2009).

Em humanos, o gene FOXP3 está localizado no braço curto do cromossomo X e é expresso principalmente em células do timo, baço, linfonodos e particularmente nas Tregs (TORGERSON; OCHS, 2007; YAGI, Y. et al., 2004).

Estruturalmente, o locus FOXP3 é constituído de uma região promotora e de três regiões localizadas em região intrônica – não codificadas – denominadas CNS (CNS1, CNS2 e CNS3) (Figura 6) (KIM, H. P.; LEONARD, 2007), que são altamente conservadas e desempenham diferentes funções (TOKER; HUEHN, 2011).

Figura 22. Estrutura do locus FOXP3. O locus FOXP3 é composto por quatro regiões bem conservadas, a região promotora e três regiões não codificadas, denominadas por CNS, que são representadas pelas caixas de cor cinza claro; as caixas de preenchidas com coloração cinza escura indicam as regiões que são codificadas; e as caixas cinzas sem preenchimento representam os éxons não codificados. Adaptado de (TOKER; HUEHN, 2011).

5.3.4.1 Ligação de c-Rel na região do Promotor de FOXP3

A região promotora de FOXP3 apresenta intensa remodelação de cromatina nas Tregs (KIM, H. P.; LEONARD, 2007) e, por ser responsável pelo controle da expressão de FOXP3 – que é induzida pela ativação via TCR e IL-2 (MANTEL et al., 2006) – e por esse aumento da permissibilidade do controle da cromatina nessa região este foi um dos alvos escolhidos para a avaliação do enriquecimento de c-Rel nesta região.

Visto uma média da razão do enriquecimento de iTreg/Naive de 20,15 vezes, evidenciando que c-Rel está, aproximadamente, 20 vezes mais presente nas células iTregs geradas do que nas células T naive, e de acordo com os trabalhos descritos nota-se a

possibilidade de que a subunidade c-Rel seja um componente importante e atuante no controle da expressão de FOXP3 (LONG, M. et al., 2009; RUAN et al., 2009).

5.3.4.1 Ligação de c-Rel na região CNS3 (kb1, kb2 e kb3) do gene FOXP3

A região CNS1 atua como um “sensor” de TGF- β e é associada com a acetilação de histonas. A região CNS2 é descrita como a Região Específica Desmetilada nas Tregs (TSDR) e apresenta sítios propícios para as alterações nas histonas (BARON et al., 2007; FLOESS et al., 2007). Já a região CNS3 é uma região rica em ilhas CpG, que são desmetiladas nas células Tregs (KIM, J. Y. et al., 2007) e vem sendo descrita como o elemento pioneiro para o início da transcrição de FOXP3, com a principal função na geração das Tregs (ZHENG et al., 2010). Esta região foi dividida em três regiões intensificadoras principais, nomeadas de kb1, kb2 e kb3 (LONG, S. A. et al., 2009).

Nossos resultados demonstram um aumento médio de aproximadamente 20 vezes na interação de c-Rel nas células iTregs geradas, quando comparadas com as T naive, nas regiões CNS3kb1, CNS3kb2 e CNS3kb3. Estes dados certificam que a participação de c-Rel pode estar relacionada ao início do processo de remodelação da cromatina, tornando-a descondensada – ou melhor desmetilada – com o intuito de estabilizar a conformação nas sequências reguladoras e permitir a ocupação de c-Rel assim como de outros fatores de transcrição relacionados a resposta via TCR, como os fatores ATF-1 e CREB (KIM, J. Y. et al., 2007; TONE et al., 2008) no gene FOXP3. Sugerindo assim que o componente c-Rel pode ser um dos principais reguladores da indução da expressão de FOXP3 durante o desenvolvimento das Tregs, tanto *in vitro*, como no timo (LONG, S. A. et al., 2009)

6 CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos de experimentos e de padronizações contidos neste relatório, é possível concluirmos que:

- O método de isolamento de células T naive, a partir do sangue de cordão umbilical e a geração de iTregs iniciada pela ativação das células com anticorpos específicos (CD2/CD3/CD28), na presença de TGF- β , IL-2 e atRA é um modelo eficiente para o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo de polarização celular;
- A avaliação da ligação do fator de transcrição c-Rel, nas regiões promotoras de alguns genes relacionados no processo de indução das células T naive para a geração das iTregs, pela técnica de imunoprecipitação de cromatina, nos permite indicar uma possível interação do componente c-Rel com regiões promotoras de genes como IL2RA (CD25), CD69, que são marcadores característicos expressos constitutivamente nas Tregs, assim como em regiões promotoras do próprio gene que codifica c-Rel, indicando que durante o processo de polarização, pode ocorrer um mecanismo de feedback positivo, que possivelmente permite à amplificação e a extensão temporal da atividade desta subunidade;
- A interação de c-Rel, comprovada por imunoprecipitação de cromatina, com as regiões do gene que codifica a proteína FOXP3 (região promotora e CNS3 – kb1, kb2 e kb3) evidenciam um possível papel de c-Rel na regulação da expressão de uma das principais proteínas que controlam as funções das Tregs;
- As padronizações das técnicas de transfecção com diferentes concentrações de siRNA, infelizmente mostraram problemas possivelmente relacionados à baixa eficiência da taxa de transfecção, ou melhor, da taxa de internalização do siRNA nas células. O que nos obrigou a realizar uma nova padronização com diferentes tipos e concentrações de reagentes de transfecção em nossas células modelo – Jurkat – e em nossas células de estudo;
- Os resultados obtidos com a transfecção de siRNA FITC nas células T naive são similares aos resultados apresentados no mesmo experimento em células Jurkat, permitindo que a padronização desta técnica possa ser otimizada pela padronização inicial das condições de tratamento nas células de linhagem, para posterior teste em células T naive;
- São necessários mais experimentos de padronização para determinar tanto a concentração, como o reagente de transfecção ideal (maior porcentagem de células vivas transfectadas e menor número de morte celular - toxicidade), assim como condições de cultura que assegurem a viabilidade das células T naive, para prosseguir com ensaios relacionados à concentração ideal de siRNA a fim de obter o efeito de melhor silenciamento do mRNA de c-

CONCLUSÃO

Rel, para, possivelmente analisar o efeito nos alvos diretos da proteína c-Rel, uma vez que o decaimento do mRNA possibilita a diminuição da tradução do mesmo, e a diminuição da proteína em questão altera a expressão dos diversos genes que estão envolvidos com a atuação deste fator de transcrição.

6.1 Anexo 1.

Aprovação do comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 06 de junho de 2012

Ofício nº 2102/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 4662/2012

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS NO PROCESSO DE GERAÇÃO IN-VITRO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS INDUZIDAS (iTreg) A PARTIR DE CÉLULAS NAIVE DE SANGUE PERIFÉRICO: PAPEL DA VIA CANÔNICA E NÃO-CANÔNICA DE NF- κ B"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 347ª Reunião Ordinária realizada em 04/06/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 datada de 12/04/2012.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

RODRIGO ALEXANDRE PANEFUCCI

Dr. Rodrigo Haddad/Dr. Felipe S. de Araújo/ Ms. Josiane L. dos Santos Schiavinato
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-000 Ribeirão Preto – SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
PWA-00002730; IRB-00002186 e Registro CASHEP/CONEP nº 4
(016) 3802-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

6.2 Anexo 2.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa. A participação é **voluntária**. Após ser esclarecido(a) sobre as informações contidas neste documento, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Nome da Pesquisa: “Análise genômica do papel dos mecanismos epigenéticos de metilação de regiões promotoras durante a geração in vitro de células T regulatórias induzidas (iTreg) a partir de células T naive de sangue de cordão umbilical.”

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci e Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Descrição da Pesquisa: Durante o parto normal, após o nascimento da criança, a placenta é expulsa pelo útero da mãe. Esta placenta juntamente com o cordão umbilical é descartada depois do parto. O sangue que fica preso na placenta e no cordão umbilical após o nascimento do bebê, contém um grupo de células do sangue chamadas células T naive (ou células T virgem), que são descartadas junto.

As células T virgem são capazes de se tornar em outro tipo de célula no nosso organismo, chamada célula T regulatória. As células T virgem também podem se tornar células T regulatórias em experimentos realizados em laboratório de pesquisa. Essa transformação é interessante, pois as células T regulatórias poderão ser utilizadas no tratamento de muitas doenças, como a esclerose múltipla, a artrite reumatoide e o lúpus, diminuindo os danos causados por essas doenças.

Portanto, o objetivo desta pesquisa é estudar como as células T virgem se tornam células T regulatórias, e assim auxiliar no entendimento e desenvolvimento de novos tratamentos que poderão utilizar as células T regulatórias.

Caso a mãe concorde em colaborar com esta pesquisa, a placenta e o cordão umbilical, ao invés de serem descartados, terão seu sangue coletado. Este sangue será enviado ao Laboratório de Hematologia do HCFMRP (que estuda o sangue). Esse laboratório vai tentar transformar as células T virgem em células T regulatórias, e estudar como ocorre essa transformação. Esse sangue será utilizado somente para esta pesquisa e no caso de sobrar sangue, este será descartado.

Nenhum procedimento adicional que possa incomodar a mãe ou o bebê será realizado. Mesmo que a mãe não concorde em participar da pesquisa, o parto será realizado da mesma forma. Esta pesquisa não trará nenhum risco ou benefício à mãe ou ao bebê, no entanto, poderá beneficiar pacientes no futuro, pois este estudo pode ajudar no desenvolvimento ou na modificação de tratamentos. A mãe não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesta pesquisa.

ANEXOS

Caso o paciente não concorde em participar desta pesquisa, isto NÃO irá alterar de forma alguma o seu atendimento neste Hospital.

Assim, se desejar participar desta pesquisa, lhe asseguramos:

- a) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa que participarei;
- b) A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
- c) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- d) O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- e) O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.

Nome (Pesquisador): _____ Assinatura: _____

Fui devidamente esclarecido e declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que livremente manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Nome (Responsável): _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entrar em contato pelo telefone: 3602-2223:

Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci ou Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Laboratório de Hematologia/Biologia Molecular, Hospital das Clínicas, FMRP-USP

6.3. Anexo 3.

Manuscrito.

The c-Rel subunit participates in important events in the generation of Tregs cells from naïve cord blood T cells.

Vitor Leão¹, Helder Teixeira², Josiane Lilian dos Santos Schiavinato³, Rodrigo Haddad⁴, Felipe Saldanha-Araujo^{3,5}, Amélia Goes Araujo³, Priscila Santos Scheucher³, Dimas Tadeu Covas^{2,3}, Marco Antonio Zago^{2,3} and Rodrigo Alexandre Panepucci^{1,2}

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and for Cell Therapy (INCTC) Center for Cell Therapy (CTC) and Regional Blood Center, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ³Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRPUSP), Ribeirão Preto, SP, Brazil. ⁴Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil. ⁵Faculty of Healthy Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Abstract:

Regulatory T cells (Tregs) are recognized as one of the most important regulatory cells of the immune system, playing key role in control of peripheral tolerance, regulating the homeostasis of the immune system. Tregs may be naturally occurring (nTregs), thymus-derived or induced in the periphery (iTregs) from naïve T cells. iTregs can be generated *in vitro* from naïve CD4⁺ T cells (Tnaïve) of cord blood by the addition of TGF- β and aTRA in the presence of IL-2. Given the iTregs therapeutic potential, there is great interest in understanding the mechanisms involved in their generation. Recent studies indicate an important NF- κ B pathway role in the generation of these cells, particularly c-REL subunit. However, there are insufficient data in the literature on the evaluation of genes potentially regulated by this factor. Thinking about it, we evaluated the c-REL interaction in promoter regions of the genome in Tnaïve and iTregs cells generated *in vitro*. We utilize the methodology chromatin immunoprecipitation using microarrays (ChIP-chip) containing probes against the human genome promoter regions (approximately 21.000 transcripts – RefSeq). Furthermore, comparing the expression of genes with an important role in Tnaïve and iTreg cellular biology. Our results show that the iTreg generation (CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺) was characterized by increased FOXP3 gene expression (FT involved in differentiation) and reduced TNF- α gene expression, pro-inflammatory interleukins, as soon as IFN- γ , IL-1 β (compared to Tnaïve). Finally, we demonstrated that c-REL is bonded to gene promoters as *IL2RA* (CD25), *CTLA4*, *TNFR2*, *IL-10*, *MIR30A*, *CD69*, and *REL*. Our data reveal potential mechanisms of c-REL regulation, during the iTreg generation.

Keywords: 1. iTreg, 2. T Naïve, 3. NF- κ B, 4. c-REL, chromatin immunoprecipitation - ChIP - chip.

INTRODUCTION:

Immune tolerance can be defined as a process that aims to guarantee the homeostasis of the organism, being bipartised in central tolerance (disincentive in the thymus) described by the

way that the thymocytes (cells as yet undifferentiated), are selected as a function of the receptor binding force TCR, causing cell death induced by exacerbated or negligent activation, or lack of binding (GOLDRATH; HEDRICK, 2005; SAKAGUCHI et al., 2001); and in peripheral tolerance that has the purpose of altering the profile of the immune response, being able to highlight the incapacity of activation and proliferation of effector cells, a process called anergy (BARRON et al., 2008) its activation of inhibition mechanism, such as the recognition of receptors such as CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) leading to lymphocyte apoptosis (BLUESTONE, 1997; GREENWALD et al., 2001); change in cytokine production profile; and, finally, the induction of tolerance by T cells with capacity to suppress the immune response, these cells correspond to a heterogeneous population, called regulatory T lymphocytes (Tregs) (CARRIER et al., 2007; CHEN, T. C. et al., 2004); consisting of different subpopulations that are characterized based on several markers (LUGLI et al., 2013).

Tregs are indispensable components of the immune system that act by suppressing the activation and expansion of the effector response of the potentially dangerous autoreactive T cells in the periphery, avoiding the occurrence of autoimmunity and the exacerbated response of effector cells in general (MALOY; POWRIE, 2001; SHEVACH, 2000; YAGI, H. et al., 2004).

Classically, Tregs can be divided into 3 subtypes: those comprising naturally-generated cells in the thymus during the early stages of T-cell development and successively exported to the peripheral tissues by performing their functions in the homeostasis of the immune system (FEUERER et al., 2010; SAKAGUCHI et al., 2001), called natural Tregs (nTregs), which constitute about 1-5% of all CD4 + T cells in human peripheral blood (BAECHER-ALLAN et al., 2001); or peripheral-induced Tregs (pTreg), generated from mature CD4 + cells, after undergoing certain stimuli of some cytokines in the secondary lymphoid organs (PANDIYAN et al., 2007; SHEVACH et al., 2006), and, finally, the in vitro Induced Tregs (iTregs) (ABBAS et al., 2013; SHEVACH, 2006; SHEVACH; THORNTON, 2014), in the cocultivation of CD4 + cells, with mesenchymal stem cells (FEUERER et al., 2009; SCHMITT; WILLIAMS, 2013), and some studies have described the generation of iTregs cells from naive CD4 + T cells by the addition of TGF- β and in the presence of IL-2 in vivo and in vitro (CHEN, W. et al., 2003; FANTINI et al., 2004).

The cell population of Treg that presents greater physiological relevance is the CD4 + CD25 + FOXP3 + population, due to its ability to suppress the activation and expansion of effector T lymphocytes (HORWITZ et al., 2003; SURI-PAYER et al., 1999; WING; SAKAGUCHI, 2010; ZHAO et al., 2006), are responsible, albeit partially, for the crucial role in maintaining immune tolerance and homeostasis of the immune system (DEENICK; MA, 2011) as well as in transplant tolerance (PANDIYAN et al., 2007; WING; SAKAGUCHI, 2010).

Research shows that after lymphocyte activation, or in the Treg generation process (HORWITZ et al., 2003; HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2008; WOOD et al., 2003), several signals are linked to involvement with members of the NF- κ B pathway, such as the c-Rel subunit, because it is centrally involved in the activation of T cells (SCHULZE-LUEHRMANN; GHOSH, 2006), via TCR and coreceptors (Horwitz, et al. 2008a; Horwitz, et al. 2008b), as signaling by CD28 can act as an activator of the NF- κ B pathway with its role related to the control of the expression of genes involved with the mechanisms of T cell polarization (BUNTING et al., 2007; GHOSH; HAYDEN, 2008), such as the presence of the c-Rel subunit in the control of FOXP3 expression (Long, et al. 2009a; Ruan, et al. 2009) or even IL-2 expression (Viseruna, et al. 2010), in the generation of Tregs.

The NF- κ B pathway is formed by a complex of five proteins that act as transcription factors: RelA (p65), RelB, c-REL, NF- κ B1 (p50 and its precursor p105) and NF- κ B2 (p52 and its precursor p100) (HAYDEN; GHOSH, 2004), which associate mutually to form different homo and heterodimer complexes, with reports that the NF- κ B pathway is an essential signal for the development of Tregs, as well as homeostasis, *in vivo*.

The components of NF- κ B, among them the c-Rel subunit, a unique member of this family (GILMORE; GERONDAKIS, 2011) plays an important role in cellular immune activity (GHOSH; HAYDEN, 2008; XIAO et al., 2006) and activation of T cells (BUNTING et al., 2007), regulating the transcription of a plurality of genes, as well as being present in the essential signaling for the development of regulatory T cells *in vivo*.

Studies have shown that mice deficient in c-Rel and NF- κ B1 / p50 have a lower number of Treg cells, both in the thymus and in the periphery of these animals (DEENICK; MA, 2011; VISEKRUNA et al., 2013). In addition, it has been demonstrated in another study that c-Rel

directly regulates naïve T-polarization in Tregs because of its direct relationship with IL-2 production (VISEKRUNA et al., 2013).

This activation leads the c-Rel component to the promoter sites of the FOXP3 gene, which is associated with the initiation of Foxp3 transcription in the precursors of thymic Tregs, maintaining the stability and function of these cells (HSIEH et al., 2010), as well as plays a key role in the proliferation, differentiation and production of IL-2 and IL-2R- α (CD25) expression in Treg cells, crucial molecules for cell division and immune function (BAECHER-ALLAN et al., 2001).

In addition to directly or indirectly inducing FOXP3 gene transcription, c-Rel is also related to the production of cytokines such as IL-2, GM-CSF, IL-3, IFN- γ and IL-21 (GILMORE; GERONDAKIS, 2011; HORI et al., 2003; LUGLI et al., 2013).

With this in mind, we show that the treatment of naïve T cells activated with IL-2, TGF- β and atRA induces the generation of iTregs with the presence of the c-Rel subunit of the NF- κ B pathway acting as a transcription factor or co -factor, binding to several gene promoters of genes that have function described in regulatory T cells.

MATERIAL AND METHODS

Blood from the umbilical cord and collection of peripheral blood samples.

Umbilical cord blood samples (SCU) were obtained by umbilical vein puncture and collected in units of blood bag. Only blood bags judged unsuitable for blood bank activity according to transfusion regulations (volume <90mL or lack of serologic test at collection) were used in this study. The protocols of the study were approved by the Institutional Ethics Committees of the Hospital das Clínicas of the Medical School of Ribeirão Preto and Maternidade do Complexo Aeroporto (Ribeirão Preto, Brazil) (protocol number 7292/2011) and informed consent was obtained from all donors. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Immunomagnetic selection of naïve CD4 + T cells from umbilical cord blood.

UCB mononuclear cells were isolated after centrifugation through Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The isolated cells were washed twice with 0.5%

PBS-ACD and used for the negative immunomagnetic test selection of naive T cells (CD4 + CD25-CD45RA +) using CD4 + T cell isolation Kit II, according to the recommendations (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, all UCB cells (except CD4 + T cells) were depleted using a mixture of antibodies (CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, TRC γ / DR and Glycophorin A) bound to magnetic microspheres, using magnetic columns and a QuadroMACS magnet (Miltenyi Biotec). Only samples of CD4 + T cells without purity above 80%, as determined by flow cytometry, were used in this work.

In vitro generation of human iTregs.

Naive T cells (CD4 + CD25-CD45RA +) were activated with anti-human CD2 / CD3 / CD28 beads (1 bead ratio for every 2 cells) in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA), and 3 x 10⁵ cells / well were plated in 24-well plates. The complete medium was supplemented with IL-2 (50 U / ml), TGF- β 1 (5 ng / ml) and atRA (100 nM). Cells were stimulated for a total of 5 days.

Flow cytometry

Isolated naive T cells and the generated cells, as described above, were immunophenotypically assessed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) and analyzed by FlowJo 10.0.4 software. (Treestar, Inc., San Carlos, CA). Aliquots of cells isolated with about 1x10⁵ cells were separated and incubated with anti-CD4, anti-CD25 and anti-CD45RA antibodies conjugated to fluorophores: fluorescein isothiocyanate (FITC), R-phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC) or peridinin chlorophyll protein (PerCP) and analyzed. And the cell population generated (1.2x10⁶ cells) were immunophenotypically characterized by the use of anti-CD4 surface antibodies (RPA-T4 [PerCP]), CD25 (M-A251 [APC]), CD127 (HIL- M21 [FITC]), (BD Pharmingen, San Jose-CA, USA). For intracellular labeling, after surface labeling, cells were fixed and permeabilized using the Human FOXP3 Human Buffer Kit (BD Pharmingen, San Jose-CA, USA), and the use of the anti-human antibody FOXP3 (PCH101 [PE]) (eBiosciences (San Diego, CA, USA) and samples containing cells with the iTreg profile were counted and subjected to subsequent assays.

RNA extraction.

Naive T cells and iTregs were collected and resuspended in 250 µl of PBS + DEPC, completely mixed with 750 µl Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80 ° C. Total RNA was obtained according to with the manufacturer's instructions, and the RNA was quantified using a NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare) at 260nm.

qPCR in real time.

Total RNA was reverse transcribed using the Reverse Transcript of cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Evaluations were performed by an ABI Prism 7300 Sequence Detection System using primers designed in a particular way. The thermocycling conditions of the qPCR were: 2min at 50°C, 10min at 95°C, followed by 40 cycles of 95 for 15 sec and 60 for 1 min, with the dissociation curve. PCR reactions were performed in triplicate. The endogenous GAPDH gene was used to normalize the sample amplification curve (Applied Biosystems). The method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate the expression, in relation to the median ΔCt value of the control samples.

Statistical analysis.

Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) and P values were calculated using the paired or unpaired Student's t test. All statistical analyzes were done using Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, <http://www.graphpad.com>), significant values are expressed as * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

Immunoprecipitation of Chromatin - ChIP-chip and ChIP-qPCR

Chromatin immunoprecipitation was performed using the commercial Magna ChIP G kit (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, crosslinking the samples of approximately 1×10^7 cells was performed with 1% formaldehyde in the final volume of the medium, followed by addition of 125 mM (final volume) glycine. Samples were washed with PBS with the addition of the protease inhibitor cocktail and the cell pellet was frozen at -80 ° C. Samples were then resuspended in cell lysis buffer containing protease inhibitors for 15 minutes, centrifuged and the cell pellet was resuspended by the addition of nuclear lysis buffer with protease inhibitors. This solution was subjected to the DNA fragmentation process by sonication through the Sonics VibraCell VCX130 with a 3mm probe, 30 pulses of 30 seconds duration, with a 30% amplitude and 60 seconds of rest, with all steps

in ice in order to avoid protein denaturation. The size of the fragments obtained from this fragmentation was about 200-600bp. The chip assay was performed on the supernatants, with the addition of 10 μ g of anti-c-REL antibody (Santa Cruz), with the magnetic beads. Following the washing, extraction and isolation steps, the DNA was isolated and subsequently used in qPCR (ChIP-qPCR) with primers from promoter regions designed in a personalized manner (PRIMERS SEQUENCE) and hybridized on microarray slides containing 244 Thirty-one probes (Human Promoter ChIP-on-chip Microarray 2x 244K Set, Agilent, G4495A-014706 & 14707), which required the processing of the terminal portions of DNA, amplification and labeling with fluorescently labeled nucleotides (Cyanine 3-dUTP and Cyanine 5 -dUTP) of the samples and hybridization to the microarray slides. Scanning was performed according to the equipment procedures and data analysis was performed using the Agilent Genomic Workbench 7.0 software.

Results

Purity of the Tnaïve

The protocol for the isolation of Tnaïve from umbilical cord blood, standardized in our laboratory, is well established and reproducible, as described in the item materials and methods, which is used in the four umbilical cord blood bags used to obtain the results. We evaluated the percentage of CD4 + CD25-CD45RA + cells (Figure 1), where we obtained a purity of 80.46% within the 4 pockets that make up the “pool” of Tnaïve samples used in the ChIP-chip.

Figure 1. Evaluation by flow cytometry of the purity of CD4 + CD25-CD45RA + T cells obtained by immunomagnetic selection of the isolation of cells from umbilical cord blood. Representative plot of the expression plot of the CD4 and CD25 markers, as well as the CD45RA expression. Image taken from the FlowJo software 10.0.4.

Immunophenotypic characterization of generated iTregs

As with the isolation protocol, the generation process of iTreg cells from umbilical cord naive T cells was standardized in previous studies conducted in our laboratory, so the four naive T samples obtained after isolation were maintained in culture for iTreg generation. The results of the expression of the FOXP3 and CD127 markers within the CD4 + CD25 + population

(activated cells) isolated by the gate of the lymphocyte population were evaluated by histogram as shown in Figure 2. Of the four samples maintained in cell culture, the mean expression of the FOXP3 marker was 98.42% and the mean absence of CD127 expression was 98.24%, thus being considered iTreg and used for the ChIP-chip experiments.

Figure 2. Flow cytometry analysis of the generation of iTreg, with markers CD4, CD25, FOXP3 and CD127. Dot plot representative of size by internal complexity with gate in the lymphocyte region (upper left); dot plot showing the populations of the cells generated and analysis of the expression of FOXP3 and CD127 markers of CD4 + CD25 + cells. Events outside the gate "lymphocytes" represent dead cells, cell debris, or not considered. Image taken from FlowJo software 10.0.4.

Immunoprecipitation of Chromatin (ChIP-qPCR and ChIP-chip)

c-Rel binding in the IL2RA promoter regions (CD25)

Considering the IL2RA gene (CD25), the exported image of the software (Figure 3) allows visualizing the location of the gene on chromosome 10 and the analysis of the enrichment of the immunoprecipitated material with c-REL for Tnaïve and iTreg cells, shows that c- REL promotes the binding, near the transcription site, with more intensity in the iTreg (shown by red dots and lines in the lower flap of the image) compared to Tnaïve samples (gray and green dots).

These results were substantiated by validation of immunoprecipitation using c-REL-bound chromatin in qPCR assays, with primers specific for the IL2RA promoter region. The results, in duplicate, were normalized by the values obtained by the Input samples, demonstrating that enrichment of the c-REL subunit in the investigated region is approximately 11.7 folds higher in the iTreg than in the Tnaive samples (Figure 4).

Figure 3. Analysis of data obtained from c-REL ChIP-chip in the IL-2R α promoter region. Location of the promoter of the gene on chromosome 10 and evident enrichment demonstrated in the iTreg (bottom flap) cells, in comparison to the enrichment observed in naive cells. Points in red indicate higher enrichment, gray dots indicate no relative enrichment, and green dots indicate decrease in binding compared to input samples. Image taken from Agilent Genomic Workbench 7.0 software

Figure 4. Comparison of c-REL enrichment in the IL-2RA promoter region. Results by qPCR of chromatin immunoprecipitation with anti c-REL antibody demonstrating the enrichment of subunit binding in the Tnaïve and iTreg samples. Results normalized by the input of each sample.

c-Rel binding in the promoter regions of REL

ChIP-chip results obtained by investigating the enrichment of c-REL binding in the promoter of the REL gene (encodes the c-REL subunit), located on chromosome 2, shows that there is a greater bond strength (enrichment) in the iTreg samples (shown by red dot peaks), which is not observed in the Tnaïve samples (shown by the predominance of gray and green markings) (Figure 5).

Figure 5. Analysis of data obtained from c-REL ChIP-chip in the promoter region of c-REL. Localization of the gene promoter on chromosome 2 and demonstrated enrichment in the iTreg (bottom flap) cells, contrasting with enrichment observed in naïve cells. Points in red indicate higher enrichment, gray dots indicates no enrichment, green dots indicate decrease of binding compared to Input samples. Image taken from Agilent Genomic Workbench 7.0 software.

c-Rel binding in the promoter regions of REL

ChIP-chip results obtained by investigating the enrichment of c-REL binding in the promoter of the REL gene (encodes the c-REL subunit), located on chromosome 2, shows that there is a greater bond strength (enrichment) in the iTreg samples (shown by red dot peaks),

which is not observed in the Tnaive samples (shown by the predominance of gray and green markings) (Figure 5).

In addition to the results obtained by ChIP-chip, new qPCR assays were performed in duplicate, this time using primers specific for the c-REL promoter region (Figure 6). These assays provided results consistent with the above data, demonstrating that the relative enrichment of c-REL in this promoter in iTreg was certain to be 6.8 times higher than that found for the Tnaive samples (samples were normalized with respective Input samples).

Figure 6. Comparison of c-REL enrichment in the c-REL promoter region. Results by qPCR of chromatin immunoprecipitation with anti c-REL antibody demonstrating the enrichment of subunit binding in the Tnaive and iTreg samples. Results normalized by the Input of each of each sample.

C-Rel binding in the CTLA4 promoter regions

The possibility of c-REL is related to the promoters of the development of a CTLA4 gene promoter region (located on the long arm of chromosome 2), which encodes the cytotoxic T lymphocyte associated antigen. The results demonstrate that, in IGBT cells, there is a single enrichment of c-REL, this is a source of low-amplitude black-and-white or green information. (Figure 7)

Figure 7 Analysis of data obtained from c-REL chip-chip in the promoter region of the CTLA4 gene. Location of gene on chromosome 2 in iTreg User Processing (as a substitute), unlike in naive cells. Highlighted points, higher highlight, white points, higher number of points, higher number of entry points compared as input samples. Image taken from Agilent Genomic Workbench 7.0 software.

C-Rel binding in the TNFR2 promoter regions

Investigating a new relationship between c-REL and the TNFR2 gene, which encodes one of the tumor necrosis factor receptor classes, were the interesting results (Figure 8). Such

data show that enrichment of c-REL in this promoter occurs in both cells and in iTreg, but when compared to the data of the two samples in the case of iTreg, this improvement is more evident.

Figure 8. Analysis of data obtained from c-REL chip-chip in the promoter region of the TNFR2 gene. Location of the promoter of the gene on chromosome 1 full screen in the iTr cells (bottom flap), contrast in the nucleus in the naive cells. Points in red and higher highlight, white dots blank, red dots increase the binding of the input as samples Input. Image taken from Agilent Genomic Workbench software

C-Rel binding in the IL10 promoter regions

Among the ChIP-chip results, we found a possible relationship between c-REL and the IL10 gene, which encodes an interleukin 10, located in the long arm of chromosome 1, where we obtained the result of a great enrichment of c-REL in this region. The samples of iTreg, although not found in the sample filling pattern, should be considered according to Figure 9.

Figure 9. Analysis of data obtained from c-REL chip-chip in the promoter region of IL10 gene. Location of the promoter of the gene on chromosome 1 and increase added on the iTreg (bottom flap) cells, compared to the positive effect on Tnaive cells. Points in red and higher highlight, white dots blank, red dots increase the binding of the input as samples Input. Image taken from Agilent Genomic Workbench 7.0 software.

C-Rel binding in the promoter regions of MIR-30A

Also, for a miR-30a coding promoter region, a small non-coding RNA (microRNA) that regulates post-transcriptional gene expression by the degradation or inhibition of messenger RNA, there is a relationship with a c-REL, according to our experiment, because it presents results with an intense iTreg binding of the c-REL binding to the promoter region of this gene, located in the long arm of chromosome 6, and in the Tnaive samples no enrichment was noticed of the c-REL binding in this promoter (Figure 10).

Figure 10. Analysis of data obtained from c-REL chip-chip in the promoter region of the MIR30A gene. Localization of the gene promoter on chromosome 6 and increasing to iTreg cells (lower flap), compared to the performance observed in Tnaive cells. Points in red and higher highlight, white dots blank, red dots increase the binding of the input as samples Input. Image taken from Agilent Genomic Workbench 7.0 software.

C-Rel binding in the CD69 promoter regions

And, the chromatin immunoprecipitation results, by qPCR, enrichment of c-REL in the CD69 promoter region, a membrane protein, known as an initial marker of lymphocyte activation. The results presented demonstrate a greater binding of c-REL, this promoter region in iTreg cells, when compared as Tnaive samples, with a ratio of 2.36 times more when compared with Tnaive (Figure 11).

Figure 11. Comparison of c-REL enrichment in the CD69 promoter region.

Analysis of gene expression

In order to compare with the other factors, TNAive and iTreg were extracted from the RNAs and performed as cDNA conversions of each sample, Tnaive and iTreg, originating from the 4 umbilical cord blood bags. The relative gene expression indicators (Pfaffl, 2001) of the factors TNF- α , INF- γ , IL-1 β , FOXP3, TGF- β in qPCR reactions were evaluated in duplicate. The Graphics Prism 5, using the software in forameas through software, using the test and comparing the graphics and cells in the significant method.

Compared with the relative expressions of the FOXP3 gene between iTreg and Tnaive, a higher level of approximately 16-fold was observed in the iTreg images when compared to the Tnaive samples (Figure 21), with a statistical difference ($p = 0,0130$). The results obtained from the qPCR tests for TNF- α gene expression (Tumor Necrosis Factor) demonstrated a

reduction at the 85% level when compared with the relative expression levels of the Tnaive samples. This combination of results was statistically significant, with $P = 0.0013$.

Another result of decreasing the level of gene expression of samples, as compared to the Tnaive samples, was throughout the analysis of the gene expression of $\text{INF-}\gamma$. With all the statistics of $P < 0.0001$, the results of the samples of. They showed a decrease of 97% in the expression level when compared to Tnaive samples. Another result of decreasing the level of gene expression of samples, as compared to the Tnaive samples, was throughout the analysis of the gene expression of $\text{INF-}\gamma$.

With all the statistics of $P < 0.0001$, the results of the samples of. They showed a decrease of 97% in the expression level when compared to Tnaive samples. In addition, the levels of gene expression for a 1β interleukin ($\text{IL-1}\beta$) were published with cells. The results obtained were more than 89% when compared with Tnaive, these data obtained statistical significance of $P = 0.0002$. Finally, $\text{TGF-}\beta 1$ (anti-inflammatory cytokines) gene expression levels were present in cell samples, providing results measured over time. , 5% when compared to Tnaive samples. All results were statistically significant, with $P < 0.0001$.

Figure 12. Comparison of relative expression of TNF- α , INF- γ , IL-1 β , FOXP3, TGF- β T naive and iTreg *** in a statistically significant comparison ($p < 0.05$). $P < 0.0001$

Discussion

The aim of the present work was to study the interaction of c-REL with some promoter regions of the genome in Tnaïve cells and in iTregs generated in vitro, in order to correlate this NF- κ B subunit with some factors present in these cells and, which, not, to evaluate the changes, both positive and negative, that are entailed in this process of differentiation. For this, we initially established the efficacy and reproducibility of the isolation and generation protocol of the study cells, which we used in the laboratory.

It is known that umbilical cord blood is a potent initial source for the isolation of Treg due to its high percentage of Tnaïve (Szabolcs, et al. 2003) The cells are immunophenotypically characterized by flow cytometry as a cell of CD4 + CD25-CD45RA + cells, and that the cell differentiation genes have achieved with these cells in a high degree of purity of this population. With this it is necessary and with favorable results for the execution of past experiences throughout the world.

The regulatory profile of T cells is described, molecularly, with the expression of some factors, and in Treg, FOXP3 is considered the most important constituent (Feuerer, et al. 2009; Fontenot, et al. 2003), recognized as one of the controllers of the functions of regulatory cells, being one of the markers of identification of the same. The role of FOXP3 goes beyond the initiation and maintenance of the Tregs suppressor function, but also acts as a transcriptional suppressor, preventing the production of several pro-inflammatory cytokines and cytolytic proteins by the Tregs (Zhou, et al. 2009).

Some studies have shown that CD4 + CD25^{hi} cells have a greater expression of FOXP3 (almost in their entirety), and that the CD4 + CD25 + population also has this marker (Roncador, et al. 2005). Loss of expression of FOXP3 is known to cause these cells to convert to Th17 (Yang, et al. 2008) and thus secrete proinflammatory cytokines such as IL-17 and INF- γ (Komatsu, et al. 2009), corroborating the role of FOXP3 acting as a possible inhibitor of the production of several pro-inflammatory cytokines and cytolytic proteins by the Tregs themselves (Zhou, et al. 2009).

In a later analysis of the iTreg generated in this study through flow cytometry characterizations, we pointed out the high expression of FOXP3, a result that strengthened our analysis of gene expression, in which it demonstrated a high level of expression of FOXP3 by qPCR. In addition to this immunophenotyping of FOXP3, the expression of CD127 of these cells was measured, in order to characterize the iTreg of the CD4 + CD25 + FOXP3 + CD127-profile, it was also observed, by flow cytometry, absence of this marker in our cells. The molecular marker CD127 (IL-7 receptor) shows its decreased expression in T lymphocytes after activation. It is known that the transcription factor FOXP3 interacts with the CD127 promoter resulting in decreased expression of this marker in Tregs cells (Liu, et al. 2006a).

Experiments carried out by our research team (unpublished data) established the iTreg generation protocol by adding IL-2, which guarantees the proliferation and survival of lymphocytes, TGF- β , and participates in the process of differentiation initiation of Treg and Th17 lymphocytes and of atRA, which stimulates the constitutive expression of FOXP3, whereas they characterize the cells generated not only by the use of these markers, but by the expression of CD69, CD127, TNFR2, GITR, CTLA-4, LAP and FOXP3. However, it has been demonstrated that most Treg cells present the immunophenotypic profile CD4 + CD25 + FOXP3 + CD127- (Shen, et al. 2009), being for this reason the characterization of only these markers in the population of cells generated.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is an invaluable method for the study of interactions between specific proteins or modified forms of proteins and regions of genomic DNA (Carey, et al. 2009; Spencer, et al. 2003), for example to be used to determine whether a transcription factor interacts with a candidate target gene, as well as to monitor the presence of histones with post-translational modifications at specific genomic sites (Zeng, et al. 2006).

With this in mind, it was possible to identify enrichment of c-REL in the promoter region of the ILR2A gene, which encodes the IL-2R α receptor, also known as CD25. This is an indispensable marker for the maintenance of cell growth and survival related to the IL-2 molecule (Sakaguchi, et al. 2007), in addition to representing a key molecule in cellular homeostasis, and can act as an indicator (alarm signal) of excessive activation of T cells, increasing the number of Treg cells (Amado, et al. 2013), which in turn constitutively express the receptor, depriving the other cells of producing IL-2, in addition to depriving neighboring cells of this interleukin (Maloy and Powrie 2005). The enrichment of c-RELS confirmed by ChIP-chip and validated by qPCR, in addition to the results of the expression of this marker by flow cytometry, demonstrates that c-REL may play an important role in the control of differentiation and the production of T cell cytokines, and may be responsible for regulating, for example, the expression of IL-2R- α (CD25) in T cells, since these are crucial for cell proliferation and immune function (Gerondakis, et al. 2014).

In order to find out more information about the relation of c-REL in the possible regulatory roles of the regulatory phenotype, and as knowledge of studies that consolidate this idea, using c-REL deficient mice, who observed that they had the generation of compromised Treg (Deenick, et al. 2010; Gilmore and Gerondakis 2011; Isomura, et al. 2009; Reinhard, et al. 2011), we decided to investigate the involvement of c-REL in the enrichment of the promoter region encoding it (REL gene) and it was contacted, both by ChIP-chip and by validation in qPCR, that it binds strongly to the promoter region in the iTreg, as well as being able to directly mediate the upregulation of some genes such as CD25, c-REL may be involved in regulating the coding gene itself, corroborating the idea that c-REL may play a role in amplifying or support the transcriptional response of genes that are redundantly targeting all NF- κ B proteins, such as in the c-REL subunit itself (Bunting, et al. 2007).

With the idea that the NF- κ B pathway may be a sensor of peripheral inflammatory events (Long, et al. 2009b), for being regulator of the innate and adaptive immune response (Bonizzi and Karin 2004) and additionally that an excessive inflammatory response may increase the activation of the NF- κ B pathway through the production of cytokines, such as that of TNF- α (Long, et al. 2009b), we investigated the enrichment of c-REL in the promoter of the TNFR2 gene, which encodes the tumor necrosis factor receptor.

TNF- α is a cytokine involved in systemic inflammation, and has well-documented pro-inflammatory effects (Housley, et al. 2011) and, as our studies are not expressed in large numbers by the Tregs, which in turn were defined, by Chen et al., as suppressive CD4 + CD25 + FOXP3 + cells expressing the TNFR2 receptor (Chen, et al. 2010) and, as demonstrated by our results, by the enrichment of c-REL in the promoter region of the TNFR2 gene, we affirm that c-REL can act as transcription factor of this receptor with the probable role of regulating the generation of Treg, since via NF- κ B is active, possibly due to the large amount of TNF- α , contained in the inflammatory environment.

Based on the same thought regarding Treg cell activation stimuli, we sought to investigate the c-REL relationship in the promoter of the CTLA4 gene, which encodes a receptor that plays a role contrary to that of CD28 (a molecule that stimulates effector T cells - inflammatory), i.e., CTLA-4 inhibits the activation of T cells (Allison and Krummel 1995; Krummel and Allison 1995).

Knowing that in Treg, CTLA-4 is constitutively expressed and that this molecule is important in the control of autotolerance and therefore in susceptibility to autoimmune diseases (Kristiansen, et al. 2000; Takahashi, et al. 2000), and additionally that c-REL is enriched in the promoter region of the gene encodes this receptor, we can say that c-REL, again can present a regulator profile of the regulatory profile in the iTreg.

In addition to these segments, occupancy of c-RELS at IL10 gene promoter sites, which encode interleukin IL-10, an immunosuppressive molecule, whose Treg production is required for protection in several autoimmune and infectious disease models, were measured. studied as an important suppressive mechanism in the function of Tregs mainly on mucosal surfaces (Shevach and Thornton 2014). We also evaluated the enrichment of c-REL in the promoter of the gene encoding microRNA miR-30a, a microRNA that has been described as relevant in regulating the regulatory phenotype of Treg (Zhou, et al. 2008).

As in both promoter regions there was enrichment of c-REL binding, leading to the belief that c-REL may also be related to the transcription of these important factors for the maintenance of the regulatory function of the iTreg. We performed a final analysis regarding the enrichment of c-REL in a promoter region, this time of the CD69 gene, which encodes a membrane protein known as an initial marker of lymphocyte activation (Cambiaggi, et al. 1992;

Cebrian, et al. 1988; Mardiney, et al. 1996). This protein is rapidly expressed after cellular activation via TCR, due to the presence of transcription factors such as the NF- κ B pathway (Gonzalez-Amaro, et al. 2013).

According to the results obtained in this analysis, from qPCR to the CD69 promoter region, with the immunoprecipitated material, it can be said that enrichment of c-REL may be related to the role of transcriptional activator of genes encoding FOXP3, IL -2 and TGF- β , which in turn induces the differentiation of regulatory T cells (Martin and Sanchez-Madrid 2011), or indirectly with the expression of TGF- β , and suppresses the production of proinflammatory cytokines of IL- 17 and IFN- γ (Radulovic, et al. 2013).

In addition to these ChIP-chip experiments, we determined the gene expression profile, in the Tnaïve and iTreg, for some factors that may evidence the regulatory phenotype of the iTreg, among these factors a pro-inflammatory cytokine, interferon gamma IFN- γ). This cytokine is produced predominantly by natural killer cells and by CD4 Th1 and CD8 of cytotoxic T lymphocytes, effector T cells and not in regulatory cells (Green, et al. 1969), which confirms the data obtained by the analysis of the expression, where the relative expression of this molecule by the iTreg is noted. In addition, it is known that naïve T cells that secrete high levels of IFN- γ tend to differentiate into Th1 (helper) cells and do not present a regulatory profile (Curtsinger, et al. 2012; Swanson, et al. 2001).

In conjunction with the analysis of proinflammatory cytokines, we evaluated the gene expression of IL-1 β in the study cells. This molecule acts as a signal through cellular receptors (Krendel, et al. 2009), its systemic presence may be related to the development of fever (Li and Flavell 2008; Wan and Flavell 2008). Our results confirm the data in the literature, since the levels of IL-1 β gene expression in iTreg were low, thus excluding a possible pro-inflammatory profile of these cells. This cytokine is known to play a central role in the differentiation of CD4 + T cells into Th17 cells, a subset of IL-17, IL-22 and IL-26 secreting lymphocytes with effector cell profile (Dignan, et al. 2000; Powrie, et al. 1994a; Sakaguchi, et al. 2005).

The family of anti-inflammatory cytokines TGF- β , of which TGF- β 1 is most expressed in humans, is involved in processes such as embryogenesis (Ma, et al. 1998; Thornton and Shevach 2000), carcinogênese (Shin, et al. 2008; Thornton, et al. 2000) and immune response (Nestorowicz, et al. 1998; Thornton and Shevach 1998).

TGF- β plays a crucial role in the regulation of the immune system by T cell regulatory activity (Shevach 2008), furthermore, this molecule also has an inhibitory effect on the growth and activation of cells (Chen & Konkel, 2010), preventing the activation of inflammatory responses (Belladonna, et al. 2009; Takahashi, et al. 1998a; Takahashi, et al. 1998b; Thornton and Shevach 1998).

However, the results of our analysis of the gene expression of TGF- β by iTreg do not corroborate the fact that absence of this factor, in the homeostasis of the immune system, promotes the development of autoimmune diseases, which with its presence becomes possible to reverse them in in vivo models (DiDonato, et al. 2004; Lin, et al. 2004; Rosenzweig, et al. 2008).

Conclusion

Our results allow us to conclude that during the in vitro differentiation of Naïve T cells into iTregs, transcription factors of the NF- κ B family containing the c-REL subunit bind to the promoters of genes classically related to the phenotype and function of these cells, including genes such as IL2RA (CD25), CTLA4, TNFR2, IL10 and CD69. These results indicate that in addition to regulating FOXP3 expression, c-REL would have a direct participation in the transcriptional induction of genes characteristically expressed in iTregs. Moreover, the binding of c-REL to its own promoter indicates that during this process a positive feedback mechanism would be working, allowing the amplification and temporal extension of its regulatory functions. In addition, potential transcriptional induction of microRNAs, such as miR-30a (identified as induced in iTregs in parallel complementary studies in our group), suggests that c-REL may be involved in a complex regulatory network capable of indirectly inhibiting microRNA targets, as identified in the preliminary analyzes performed in this study.

References

- 1 Amarnath, S. 2013 c-REL in GVHD biology: a missing link. *Eur J Immunol* 43(9):2255-8.
- 2 Amarnath, S., et al. 2007 Endogenous TGF-beta activation by reactive oxygen species is key to Foxp3 induction in TCR-stimulated and HIV-1-infected human CD4+CD25- T cells. *Retrovirology* 4:57.
- 3 Apostolou, I., et al. 2008 Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *J Clin Immunol* 28(6):619-24.
- 4 Battaglia, M., et al. 2006 Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 177(12):8338-47.
- 5 Belladonna, Maria L., et al. 2009 TGF- β and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends in Molecular Medicine* 15(2):41-49.
- 6 Benoist, C., and D. Mathis 2012 Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9):a007021.

- 7 Bonizzi, G., and M. Karin 2004 The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25(6):280-8.
- 8 Bryn, T., et al. 2008 LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. *Int Immunol* 20(2):235-45.
- 9 Bunting, K., et al. 2007 Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-REL. *J Immunol* 178(11):7097-109.
- 10 Cambiaggi, C., et al. 1992 Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics* 36(2):117-20.
- 11 Carey, M. F., C. L. Peterson, and S. T. Smale 2009 Chromatin immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb Protoc* 2009(9):pdb prot5279.
- 12 Cebrian, M., et al. 1988 Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168(5):1621-37.
- 13 Chen, C. H., et al. 2003a Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca2+ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 197(12):1689-99.
- 14 Chen, F., et al. 2003b Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem J* 371(Pt 2):257-63.
- 15 Chen, G., et al. 2011 The NF-kappaB transcription factor c-REL is required for Th17 effector cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187(9):4483-91.
- 16 Chen, W., et al. 2003c Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12):1875-86.
- 17 Chen, X., et al. 2010 Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol* 40(4):1099-106.
- 18 Chikuma, S., and J. A. Bluestone 2007 Expression of CTLA-4 and FOXP3 in cis protects from lethal lymphoproliferative disease. *Eur J Immunol* 37(5):1285-9.
- 19 Costello, R., and C. Lipcey 1993 Involvement of the different members of the NF-kB transcription factor family in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 7(5):764-5.
- 20 Curtsinger, J. M., et al. 2012 Autocrine IFN-gamma promotes naïve CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J Immunol* 189(2):659-68.
- 21 Davidson, D., B. Schraven, and A. Veillette 2007 PAG-associated FynT regulates calcium signaling and promotes anergy in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 27(5):1960-73.
- 22 de Rezende, L. C., et al. 2010 Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58(3):179-90.
- 23 Deenick, E. K., et al. 2010 c-REL but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol* 40(3):677-81.
- 24 Deenick, E. K., et al. 2011 Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol* 23(1):111-8.
- 25 DiDonato, M., et al. 2004 Mechanical synchrony: role of surgical ventricular restoration in correcting LV dyssynchrony during chamber rebuilding. *Heart Fail Rev* 9(4):307-15.
- 26 Dignan, R., et al. 2000 Influence of HLA matching and associated factors on aortic valve homograft function. *J Heart Valve Dis* 9(4):504-11.
- 27 Fantini, M. C., et al. 2004 Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172(9):5149-53.
- 28 Feuerer, M., et al. 2010 Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13):5919-24.
- 29 Feuerer, M., et al. 2009 Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10(7):689-95.
- 30 Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky 2003 Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4):330-6.
- 31 Fontenot, J. D., et al. 2005 A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6(11):1142-51.
- 32 Gerondakis, S., et al. 2014 NF-kappaB control of T cell development. *Nat Immunol* 15(1):15-25.
- 33 Ghosh, S., and M. S. Hayden 2008 New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11):837-48.
- 34 Gilmore, T. D., and S. Gerondakis 2011 The c-REL Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* 2(7):695-711.
- 35 Gonzalez-Amaro, R., et al. 2013 Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* 19(10):625-32.
- 36 Green, J. A., S. R. Cooperband, and S. Kibrick 1969 Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes. *Science* 164(3886):1415-7.

- 37 Grigoriadis, G., et al. 2011 c-REL controls multiple discrete steps in the thymic development of Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *PLoS One* 6(10):e26851.
- 38 Hauer, J., et al. 2005 TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):2874-9.
- 39 Hayden, M. S. 2004 Signaling to NF- B. *Genes & Development* 18(18):2195-2224.
- 40 Hori, S. 2010 c-REL: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment? *Eur J Immunol* 40(3):664-7.
- 41 Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi 2003 Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 81:331-71.
- 42 Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray 2003 The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 74(4):471-8.
- 43 — 2008a Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 29(9):429-35.
- 44 Horwitz, D. A., et al. 2008b Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur J Immunol* 38(4):912-5.
- 45 Housley, W. J., et al. 2011 Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol* 186(12):6779-87.
- 46 Hsieh, C. H., H. Y. Li, and J. C. Chen 2010 Nitric oxide and interleukin-1beta mediate noradrenergic induced corticotrophin-releasing hormone release in organotypic cultures of rat paraventricular nucleus. *Neuroscience* 165(4):1191-202.
- 47 Hsieh, C. S. 2009 Kickstarting Foxp3 with c-REL. *Immunity* 31(6):852-3.
- 48 Isomura, I., et al. 2009 c-REL is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med* 206(13):3001-14.
- 49 Kahn-Perles, B., et al. 1997 Temporal and subunit-specific modulations of the Rel/NF-kappaB transcription factors through CD28 costimulation. *J Biol Chem* 272(35):21774-83.
- 50 Karin, M., and A. Lin 2002 NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3(3):221-7.
- 51 Komatsu, N., et al. 2009 Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):1903-8.
- 52 Krendel, M., et al. 2009 Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 20(1):86-94.
- 53 Kristiansen, O. P., Z. M. Larsen, and F. Pociot 2000 CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 1(3):170-84.
- 54 Krummel, M. F., and J. P. Allison 1995 CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182(2):459-65.
- 55 Li, M. O., and R. A. Flavell 2008 TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134(3):392-404.
- 56 Lin, H., et al. 2004 A porous silicon-palladium composite film for optical interferometric sensing of hydrogen. *Langmuir* 20(12):5104-8.
- 57 Liu, W., et al. 2006a CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203(7):1701-11.
- 58 Liu, Y. J., et al. 2006b [The role of CD4+ CD25+ T cell and FOXP3 in hso acute graft rejection]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 45(10):835-8.
- 59 Long, M., et al. 2009a Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31(6):921-31.
- 60 Long, S. A., et al. 2009b Functional islet-specific Treg can be generated from CD4+CD25- T cells of healthy and type 1 diabetic subjects. *Eur J Immunol* 39(2):612-20.
- 61 Lopez-Cabrera, M., et al. 1995 Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem* 270(37):21545-51.
- 62 Lugli, E., et al. 2013a Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest* 123(2):594-9.
- 63 Lugli, E., et al. 2013b Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat Protoc* 8(1):33-42.
- 64 Luo, X., et al. 2007 Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naïve CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8):2821-6.
- 65 Ma, Y., et al. 1998 Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 161(3):1516-24.

- 66 Maccario, R., et al. 2005 Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90(4):516-25.
- 67 Maloy, K. J., and F. Powrie 2005 Fueling regulation: IL-2 keeps CD4⁺ Treg cells fit. *Nat Immunol* 6(11):1071-2.
- 68 Mardiney, M., 3rd, M. R. Brown, and T. A. Fleisher 1996 Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 26(4):305-10.
- 69 Martin, P., and F. Sanchez-Madrid 2011 CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Sci Signal* 4(165):pe14.
- 70 Nestorowicz, A., et al. 1998 Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism. *Hum Mol Genet* 7(7):1119-28.
- 71 Pekalski, M. L., et al. 2013 Postthymic expansion in human CD4 naïve T cells defined by expression of functional high-affinity IL-2 receptors. *J Immunol* 190(6):2554-66.
- 72 Powrie, F., et al. 1996 A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 183(6):2669-74.
- 73 Powrie, F., et al. 1994a Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 179(2):589-600.
- 74 Powrie, F., et al. 1994b Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1(7):553-62.
- 75 Prevosto, C., et al. 2007 Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92(7):881-8.
- 76 Radulovic, K., et al. 2013 The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine. *PLoS One* 8(6):e65413.
- 77 Reinhard, K., et al. 2011 c-REL promotes type 1 and type 17 immune responses during *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 41(5):1388-98.
- 78 Ridgway, W. M., H. L. Weiner, and C. G. Fathman 1994 Regulation of autoimmune response. *Curr Opin Immunol* 6(6):946-55.
- 79 Riley, J. L., C. H. June, and B. R. Blazar 2009 Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30(5):656-65.
- 80 Risso, A., et al. 1991 CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol* 146(12):4105-14.
- 81 Roncador, G., et al. 2005 Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 35(6):1681-91.
- 82 Rosenzweig, H. L., et al. 2008 NOD2, the gene responsible for familial granulomatous uveitis, in a mouse model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(4):1518-24.
- 83 Ruan, Q., and Y. H. Chen 2012 Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol* 946:207-21.
- 84 Ruan, Q., et al. 2009 Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-REL enhanceosome. *Immunity* 31(6):932-40.
- 85 Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli 2003 Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* 11(6):1563-74.
- 86 Sakaguchi, H., et al. 2005 Direct visualization of the formation of single-molecule conjugated copolymers. *Science* 310(5750):1002-6.
- 87 Sakaguchi, S., and F. Powrie 2007 Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317(5838):627-9.
- 88 Sakaguchi, S., et al. 2001 Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
- 89 Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara 2007 Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S116-23.
- 90 Saldanha-Araujo, F., et al. 2011 Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res* 7(1):66-74.
- 91 Schmidt-Suppran, M., et al. 2004 Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13):4566-71.
- 92 Schulze-Luehrmann, J., and S. Ghosh 2006 Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 25(5):701-15.

- 93 Seddiki, N., et al. 2006 Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7):1693-700.
- 94 Sen, R., and D. Baltimore 1986a Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47(6):921-8.
- 95 — 1986b Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5):705-16.
- 96 Shen, L. S., et al. 2009 CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clin Immunol* 131(1):109-18.
- 97 Shevach, E. M. 2008 Immunology. Regulating suppression. *Science* 322(5899):202-3.
- 98 — 2009 Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5):636-45.
- 99 Szabolcs, P., et al. 2003 Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 31(8):708-14.
- 100 Takahashi, K., et al. 1998a Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):L47-54.
- 101 Takahashi, T., et al. 1998b Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10(12):1969-80.
- 102 Takahashi, T., et al. 2000 Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192(2):303-10.
- 103 Thornton, A. M., and E. M. Shevach 1998 CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188(2):287-96.
- 104 — 2000 Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164(1):183-90.
- 105 Tian, B., D. E. Nowak, and A. R. Brasier 2005a A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC Genomics* 6:137.
- 106 Tian, B., et al. 2005b Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J Biol Chem* 280(17):17435-48.
- 107 Vang, K. B., et al. 2010 Cutting edge: CD28 and c-REL-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J Immunol* 184(8):4074-7.
- 108 Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman 2008 How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8(7):523-32.
- 109 Visekruna, A., et al. 2010 c-REL is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. *Eur J Immunol* 40(3):671-6.
- 110 von Boehmer, H., et al. 2003 Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 191:62-78.
- 111 Wan, Y. Y., and R. A. Flavell 2008 TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 28(6):647-59.
- 112 Wing, K., et al. 2002 Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106(2):190-9.
- 113 Xiao, G., et al. 2006 Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(4):281-93.
- 114 Yang, X. O., et al. 2008 Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29(1):44-56.
- 115 Yong, Z., et al. 2007 Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 17(2):120-9.
- 116 Yu, Y., et al. 2013 c-REL is an essential transcription factor for the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Eur J Immunol* 43(9):2327-37.
- 117 Zeng, P. Y., et al. 2006 In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques* 41(6):694, 696, 698.
- 118 Zheng, H., et al. 2008 Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood* 111(4):2476-84.
- 119 Zheng, L., et al. 2007a A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms. *J Immunol* 179(12):8035-41.
- 120 Zheng, S. G., et al. 2007b IL-2 is essential for TGF-beta to convert naïve CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178(4):2018-27.

- 121 Zheng, Y., et al. 2007c A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* 178(4):2163-70.
- 122 Zheng, Y., et al. 2007d Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445(7130):936-40.
- 123 Zheng, Y., and A. Y. Rudensky 2007 Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8(5):457-62.
- 124 Zheng, Y., et al. 2003 Combined deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function. *J Exp Med* 197(7):861-74.
- 125 Zheng, Y. X., et al. 2007e [Effect of Rapamycin on CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in allo-transplantation tolerance model]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 23(4):327-30.
- 126 Zhou, X., et al. 2009 Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21(3):281-5.
- Zhou, X., et al. 2008 Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 205(9):1983-91.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. **Nat Immunol**, v. 14, n. 4, p. 307-8, Apr 2013.
- ALROQI, F. J.; CHATILA, T. A. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 16, n. 4, p. 27, Apr 2016.
- AMADO, I. F. et al. IL-2 coordinates IL-2-producing and regulatory T cell interplay. **J Exp Med**, v. 210, n. 12, p. 2707-20, Nov 18 2013.
- AMARNATH, S. c-Rel in GVHD biology: a missing link. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 9, p. 2255-8, Sep 2013.
- AMARNATH, S. et al. Endogenous TGF-beta activation by reactive oxygen species is key to Foxp3 induction in TCR-stimulated and HIV-1-infected human CD4+CD25- T cells. **Retrovirology**, v. 4, p. 57, 2007.
- ANNACKER, O. et al. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. **Immunol Rev**, v. 182, p. 5-17, Aug 2001.
- ASANO, M. et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 387-96, Aug 1 1996.
- BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, Aug 1 2001.
- BARON, U. et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 9, p. 2378-89, Sep 2007.
- BARRON, L. et al. Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance. **J Immunol**, v. 180, n. 5, p. 2762-6, Mar 1 2008.
- BATTAGLIA, M. et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. **J Immunol**, v. 177, n. 12, p. 8338-47, Dec 15 2006.
- BENOIST, C.; MATHIS, D. Treg cells, life history, and diversity. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 9, p. a007021, Sep 2012.
- BLOM, B.; SPITS, H. Development of human lymphoid cells. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 287-320, 2006.
- BLUESTONE, J. A. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? **J Immunol**, v. 158, n. 5, p. 1989-93, Mar 1 1997.
- BONIZZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 6, p. 280-8, Jun 2004.

- BONOMO, A. et al. Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. **J Immunol**, v. 154, n. 12, p. 6602-11, Jun 15 1995.
- BRYN, T. et al. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. **Int Immunol**, v. 20, n. 2, p. 235-45, Feb 2008.
- BUNTING, K. et al. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-Rel. **J Immunol**, v. 178, n. 11, p. 7097-109, Jun 1 2007.
- CAMBIAGGI, C. et al. Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. **Immunogenetics**, v. 36, n. 2, p. 117-20, 1992.
- CAREY, M. F.; PETERSON, C. L.; SMALE, S. T. Chromatin immunoprecipitation (ChIP). **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2009, n. 9, p. pdb prot5279, Sep 2009.
- CARRIER, Y. et al. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. **J Immunol**, v. 178, n. 1, p. 179-85, Jan 1 2007.
- CEBRIAN, M. et al. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. **J Exp Med**, v. 168, n. 5, p. 1621-37, Nov 1 1988.
- CHAPLIN, D. D. 1. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S442-59, Feb 2003.
- _____. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, Feb 2010.
- CHEN, T. C. et al. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. **J Immunol**, v. 172, n. 10, p. 5900-7, May 15 2004.
- 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, Dec 15 2003.
- COSTELLO, R. et al. The role of NF-kappa B1 (p50/p105) gene expression in activation of human blood T-lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules. **Cell Growth Differ**, v. 4, n. 11, p. 947-54, Nov 1993.
- COSTELLO, R.; LIPCEY, C. Involvement of the different members of the NF-kB transcription factor family in B-chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 7, n. 5, p. 764-5, May 1993.
- DE REZENDE, L. C. et al. Regulatory T cell as a target for cancer therapy. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 58, n. 3, p. 179-90, Jun 2010.

DEENICK, E. K. et al. c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 677-81, Mar 2010.

DEENICK, E. K.; MA, C. S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 361-7, Dec 2011.

FANTINI, M. C. et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J Immunol**, v. 172, n. 9, p. 5149-53, May 1 2004.

FEUERER, M. et al. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 13, p. 5919-24, Mar 30 2010.

FEUERER, M. et al. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. **Nat Immunol**, v. 10, n. 7, p. 689-95, Jul 2009.

FLOESS, S. et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. **PLoS Biol**, v. 5, n. 2, p. e38, Feb 2007.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003.

FONTENOT, J. D. et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1142-51, Nov 2005.

FONTENOT, J. D. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 329-41, Mar 2005.

GERONDAKIS, S. et al. NF-kappaB control of T cell development. **Nat Immunol**, v. 15, n. 1, p. 15-25, Jan 2014.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 11, p. 837-48, Nov 2008.

GILMORE, T. D.; GERONDAKIS, S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. **Genes Cancer**, v. 2, n. 7, p. 695-711, Jul 2011.

GOLDRATH, A. W.; HEDRICK, S. M. Central tolerance matters. **Immunity**, v. 23, n. 2, p. 113-4, Aug 2005.

GONZALEZ-AMARO, R. et al. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? **Trends Mol Med**, v. 19, n. 10, p. 625-32, Oct 2013.

GRACA, L. et al. Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4+CD25+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 27, p. 10122-6, Jul 6 2004.

- GREEN, E. A. et al. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 10878-83, Sep 16 2003.
- GREENWALD, R. J. et al. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. **Immunity**, v. 14, n. 2, p. 145-55, Feb 2001.
- GRIGORIADIS, G. et al. c-Rel controls multiple discrete steps in the thymic development of Foxp3+ CD4 regulatory T cells. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26851, 2011.
- HAUER, J. et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 8, p. 2874-9, Feb 22 2005.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev**, v. 18, n. 18, p. 2195-224, Sep 15 2004.
- HIMMEL, M. E. et al. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2001-8, Mar 1 2013.
- HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. **Adv Immunol**, v. 81, p. 331-71, 2003.
- HORWITZ, D. A.; ZHENG, S. G.; GRAY, J. D. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 4, p. 471-8, Oct 2003.
- _____. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. **Trends Immunol**, v. 29, n. 9, p. 429-35, Sep 2008.
- HSIEH, C. S. et al. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. **Nat Immunol**, v. 7, n. 4, p. 401-10, Apr 2006.
- HSIEH, H. L. et al. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF-kappaB pathways. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 88, 2010.
- HUEHN, J.; BEYER, M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. **Semin Immunol**, v. 27, n. 1, p. 10-8, Feb 2015.
- IIZUKA-KOGA, M. et al. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. **J Autoimmun**, v. 83, p. 113-121, Sep 2017.
- ISOMURA, I. et al. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 3001-14, Dec 21 2009.

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, May 1 1999.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JORDAN, M. S. et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 301-6, Apr 2001.

KAHN-PERLES, B. et al. Temporal and subunit-specific modulations of the Rel/NF-kappaB transcription factors through CD28 costimulation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 35, p. 21774-83, Aug 29 1997.

KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat Immunol**, v. 3, n. 3, p. 221-7, Mar 2002.

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, Jul 9 2007.

KIM, J. Y. et al. Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 362, n. 1, p. 44-50, Oct 12 2007.

KOMATSU, N. et al. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 6, p. 1903-8, Feb 10 2009.

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, Jan 1 2009.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 392-404, Aug 8 2008.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p. 1701-11, Jul 10 2006.

LONG, M. et al. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 921-31, Dec 18 2009.

LONG, S. A. et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 407-15, Feb 2010.

LONG, S. A. et al. Functional islet-specific Treg can be generated from CD4+CD25- T cells of healthy and type 1 diabetic subjects. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 2, p. 612-20, Feb 2009.

- LU, L. et al. Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-beta and retinoic acid. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15150, 2010.
- LUGLI, E. et al. Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. **Nat Protoc**, v. 8, n. 1, p. 33-42, Jan 2013.
- LUO, X. et al. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 8, p. 2821-6, Feb 20 2007.
- MAGGI, P. et al. The role of immune reconstitution in the onset of subclinical atheromasic lesions. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 52, n. 4, p. 524-5, Dec 1 2009.
- MAHIC, M. et al. Human naturally occurring and adaptive regulatory T cells secrete high levels of leukaemia inhibitory factor upon activation. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 4, p. 391-6, Oct 2008.
- MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol**, v. 2, n. 9, p. 816-22, Sep 2001.
- _____. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1071-2, Nov 2005.
- MANTEL, P. Y. et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. **J Immunol**, v. 176, n. 6, p. 3593-602, Mar 15 2006.
- MARDINEY, M., 3RD; BROWN, M. R.; FLEISHER, T. A. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. **Cytometry**, v. 26, n. 4, p. 305-10, Dec 15 1996.
- MAREK-TRZONKOWSKA, N. et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. **Diabetes Care**, v. 35, n. 9, p. 1817-20, Sep 2012.
- MAYER, E. et al. Cord blood derived CD4+ CD25(high) T cells become functional regulatory T cells upon antigen encounter. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29355, 2012.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 4-9, Feb 1997.
- OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 4, p. a000034, Oct 2009.
- OHKURA, N.; HAMAGUCHI, M.; SAKAGUCHI, S. FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 3, p. 158-66, Mar 2011.

- PACHOLCZYK, R. et al. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 249-59, Aug 2006.
- PANDIYAN, P. et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 12, p. 1353-62, Dec 2007.
- PAREL, Y.; CHIZZOLINI, C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. **Autoimmun Rev**, v. 3, n. 3, p. 215-20, Mar 2004.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.
- PLITAS, G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. **Cancer Immunol Res**, v. 4, n. 9, p. 721-5, Sep 2 2016.
- REINHARD, K. et al. c-Rel promotes type 1 and type 17 immune responses during Leishmania major infection. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 5, p. 1388-98, May 2011.
- RILEY, J. L.; JUNE, C. H.; BLAZAR, B. R. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 656-65, May 2009.
- RISSO, A. et al. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. **J Immunol**, v. 146, n. 12, p. 4105-14, Jun 15 1991.
- RODRIGUEZ-PINILLA, S. M. et al. TCR-gamma expression in primary cutaneous T-cell lymphomas. **Am J Surg Pathol**, v. 37, n. 3, p. 375-84, Mar 2013.
- ROMAGNANI, S. et al. Properties and origin of human Th17 cells. **Mol Immunol**, v. 47, n. 1, p. 3-7, Nov 2009.
- RONCADOR, G. et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 6, p. 1681-91, Jun 2005.
- RUAN, Q. et al. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 932-40, Dec 18 2009.
- SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. **Mol Cell**, v. 11, n. 6, p. 1563-74, Jun 2003.
- 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, Aug 1 1995.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev**, v. 182, p. 18-32, Aug 2001.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; MIYARA, M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S116-23, Nov 2007.

SALDANHA-ARAUJO, F. et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Res**, v. 7, n. 1, p. 66-74, Jul 2011.

SCHIAVINATO, J. et al. TGF-beta/atRA-induced Tregs express a selected set of microRNAs involved in the repression of transcripts related to Th17 differentiation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3627, Jun 15 2017.

SCHMITT, E. G.; WILLIAMS, C. B. Generation and function of induced regulatory T cells. **Front Immunol**, v. 4, p. 152, 2013.

SCHULZE-LUEHRMANN, J.; GHOSH, S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. **Immunity**, v. 25, n. 5, p. 701-15, Nov 2006.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p. 1693-700, Jul 10 2006.

SEKIYA, T. et al. Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. **Microbes Infect**, v. 18, n. 6, p. 378-386, Jun 2016.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921-8, Dec 26 1986a.

_____. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705-16, Aug 29 1986b.

SHEN, L. S. et al. CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. **Clin Immunol**, v. 131, n. 1, p. 109-18, Apr 2009.

SHEVACH, E. M. Regulatory T cells in autoimmunity*. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 423-49, 2000.

_____. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 195-201, Aug 2006.

SHEVACH, E. M. et al. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. **Immunol Rev**, v. 212, p. 60-73, Aug 2006.

SHEVACH, E. M.; THORNTON, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. **Immunol Rev**, v. 259, n. 1, p. 88-102, May 2014.

SMALE, S. T. Hierarchies of NF-kappaB target-gene regulation. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 689-94, Aug 2011.

- SOLIGO, M. et al. CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF-kappaB-dependent mechanism. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 2, p. 503-13, Feb 2011.
- SPENCER, V. A. et al. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. **Methods**, v. 31, n. 1, p. 67-75, Sep 2003.
- SURI-PAYER, E. et al. Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenicity of anti-H/K ATPase-reactive T cells. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 2, p. 669-77, Feb 1999.
- SZABOLCS, P. et al. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. **Exp Hematol**, v. 31, n. 8, p. 708-14, Aug 2003.
- TEH, H. S. et al. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. **Nature**, v. 335, n. 6187, p. 229-33, Sep 15 1988.
- THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J Exp Med**, v. 188, n. 2, p. 287-96, Jul 20 1998.
- _____. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J Immunol**, v. 164, n. 1, p. 183-90, Jan 1 2000.
- TIAN, B.; NOWAK, D. E.; BRASIER, A. R. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. **BMC Genomics**, v. 6, p. 137, 2005.
- TIAN, L.; HOLMGREN, R. A.; MATOUSCHEK, A. A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 12, p. 1045-53, Dec 2005.
- TING, H. A. et al. Notch ligand Delta-like 4 induces epigenetic regulation of Treg cell differentiation and function in viral infection. **Mucosal Immunol**, Jul 23 2018.
- TOKER, A.; HUEHN, J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. **Sci Signal**, v. 4, n. 158, p. pe4, 2011.
- TONE, Y. et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. **Nat Immunol**, v. 9, n. 2, p. 194-202, Feb 2008.
- TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 7, n. 6, p. 515-21, Dec 2007.
- TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S24-32, Feb 2010.

- WISEKRUNA, A. et al. Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 3, p. 606-18, Mar 2013.
- WANG, H. Q.; SHAO, Z. H. [Advances of studies on T follicular helper cells]. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 17, n. 5, p. 1384-9, Oct 2009.
- WANG, J.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatory T cells by retinoic acid. **J Immunol**, v. 183, n. 6, p. 4119-26, Sep 15 2009.
- WANG, Y.; SU, M. A.; WAN, Y. Y. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. **Immunity**, v. 35, n. 3, p. 337-48, Sep 23 2011.
- WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat Immunol**, v. 8, n. 3, p. 277-84, Mar 2007.
- WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 7-13, Jan 2010.
- WOOD, K. J. et al. Regulatory cells in transplantation. **Novartis Found Symp**, v. 252, p. 177-88; discussion 188-93, 203-10, 2003.
- XIAO, G. et al. Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 4, p. 281-93, Aug 2006.
- YAGI, H. et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**, v. 16, n. 11, p. 1643-56, Nov 2004.
- YAGI, Y. et al. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. **J Vet Med Sci**, v. 66, n. 4, p. 381-7, Apr 2004.
- YANG, X. O. et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 44-56, Jul 18 2008.
- YU, Y. et al. c-Rel is an essential transcription factor for the development of acute graft-versus-host disease in mice. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 9, p. 2327-37, Sep 2013.
- ZHAO, D. M. et al. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 3925-32, May 15 2006.
- ZHENG, S. G. et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. **J Immunol**, v. 178, n. 4, p. 2018-27, Feb 15 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHENG, Y. et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. **Nature**, v. 463, n. 7282, p. 808-12, Feb 11 2010.

ZHENG, Y. et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 936-40, Feb 22 2007.

ZHOU, C. et al. [Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes in patients after kidney transplantation]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 34, n. 9, p. 874-8, Sep 2009.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646-55, May 2009.

ZHOU, X. et al. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 281-5, Jun 2009.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: of mice and men. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 209-26, 2006.