Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

*Análise da expressão gênica promíscua no timo de
camundongos NOD (non obese diabetic) durante a
emergência do Diabetes melitus tipo 1*

Thaís Arouca Fornari

Ribeirão Preto
2008

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

*Análise da expressão gênica promíscua no timo de
camundongos NOD (non obese diabetic) durante a
emergência do Diabetes melitus tipo 1*

Thaís Arouca Fornari

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DA FACULDADE
DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA

ORIENTADOR: PROF. DR. GERALDO A. S. PASSOS

Ribeirão Preto
2008

FORNARI, THAÍS A.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PROMÍSCUA NO TIMO DE
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE *DIABETIC*) DURANTE A EMERGÊNCIA
DO DIABETES MELITUS TIPO 1

RIBEIRÃO PRETO, 2008

154p.il 30 cm

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, USP, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
GENÉTICA

ORIENTADOR: PASSOS, GERALDO A.S.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP com apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- ❖ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio da bolsa de mestrado Processo 05/57231 - 8 e Auxílio à Pesquisa Processo 06/54788 - 4
 - ❖ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
 - ❖ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP
-

Dedico esse trabalho

*Com muito carinho
aos meus queridos pais, Rosane e Francisco, e ao meu irmão
Guilherme, pela certeza de nunca terem me desamparado e
estado ao mesmo tempo longe fisicamente e mais presentes do
que nunca em minha vida. Não existem palavras no universo
capazes de exprimir o que vocês representam em minha vida!
Obrigada pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelas
infinitas orações.*

AMO MUITO VOCÊS!!!!

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos, por seu exemplo de profissionalismo, seriedade, dedicação e comprometimento com aquilo que faz. Agradeço pela confiança que me foi dada, pela paciência e pelo incentivo diário durante minha pós-graduação, me estimulando a superar as dificuldades, o que se tornou imprescindível para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada Geraldo!

Aos colegas e amigos do laboratório de Citogenética e Mutagenese, pelo carinho e disponibilidade em ajudar todas as vezes que precisei, especialmente à Patricia e Ana Paula, pelo auxílio dado em algumas técnicas e à professora Elza Tieme Sakamoto-Hojo por ter permitido e proporcionado condições para o desenvolvimento destas.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários da área de Pós-Graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela agradável convivência e amizade. Em especial, agradeço às secretárias Susie Nalon e Maria Aparecida pelo carinho, dedicação, amizade, disponibilidade e empenho ao longo desses anos.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por proporcionar condições para a realização deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, bem como dos seus alunos que contribuíram com a confecção de lâminas histológicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela disponibilidade e auxílio prestado durante os experimentos utilizando microscopia confocal.

Aos amigos e colegas de trabalho (de todas as épocas) do Grupo de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da FMRP-USP especialmente: Cristina, Cláudia, Márcia, Danielle, Paula, Vanessa, Adriane, Janaína, Guilherme, Monique, Ana Maria, Diane, Paula Sandrin e Ana Lúcia. Agradeço pela convivência, pelo companheirismo e por tudo que aprendi com vocês durante esses anos. Muito obrigada!

À FAPESP pelo apoio técnico e financeiro de suma importância para o desenvolvimento desse projeto.

Finalmente, agradeço a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo desse trabalho proporcionando conhecimento, apoio e carinho. Obrigada a todos!

“Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final. Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver. Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos. Não importa o nome que damos, o que importa é deixar no passado os momentos da vida que já se acabaram.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 O papel do timo no desenvolvimento das células T e na indução da tolerância imunológica	2
1.1.1 Ontogenia do timo	2
1.1.2 Estrutura do timo	4
1.1.3 Migração das células precursoras linfóides para o timo	7
1.1.4 Maturação dos timócitos em células T	8
1.1.5 Indução da Tolerância Imunológica	11
1.2 Expressão Gênica Promíscua no timo	13
1.3 Autoimunidade e doenças autoimunes	18
1.4 A importância dos camundongos NOD na pesquisa do diabetes tipo 1	21
1.5 Análise do transcriptoma	23
1.5.1 Conceito de transcriptoma	23
1.5.2 Métodos de análise do transcriptoma	24
2. HIPÓTESE DO TRABALHO	29
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Linhagem de camundongos NOD	33
4.2 Avaliação da glicemia	33
4.3 Definição de controle e teste	33
4.4 Cultura de timo adulto (ATOC)	34
4.5 Inibição seletiva do transcrito do gene Aire com RNA interferente (RNAi)	34
4.5.1 Monitoramento da transfecção e determinação da sequência de RNAi anti-Aire	34
4.5.2 Inibição seletiva do transcrito do gene Aire em cultura de timo adulto (ATOC)	36
4.6 Avaliação de apoptose e necrose em ATOC por citometria de fluxo	37
4.7 Separação do estroma tímico	37
4.8 Extração de RNA total	38
4.9 Quantificação de RNA total	39
4.10 Avaliação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose	39
4.10.1 Preparação do gel	39
4.10.2 Preparação das amostras de RNA	40
4.11 Reações de transcrição reversa seguida de PCR (RT- PCR)	40
4.12 Preparação das lâminas de cDNA <i>microarrays</i>	42
4.12.1 Biblioteca de cDNAs murinos	42
4.12.2 Amplificação de cDNA para a confecção de <i>microarrays</i>	42
4.12.3 Purificação dos produtos de PCR	43
4.12.4 Confecção das lâminas de <i>microarrays</i>	44
4.12.5 Delineamento das hibridações em <i>microarrays</i>	44

4.12.6	Marcação de sondas de cDNA com o fluorocromo Cy3/Cy5	46
4.12.7	Hibridação das sondas de cDNA com os microarrays	51
4.13	Aquisição de imagens de <i>microarrays</i>	51
4.14	Quantificação e normalização dos dados de <i>microarrays</i>	52
4.15	Nomenclatura dos genes	57
4.16	Análise da expressão gênica promíscua no timo	57
4.17	Análise das regiões cromossômicas de susceptibilidade ao DM-1	58
5.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
6.	RESULTADOS	63
6.1	Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD	63
6.2	Avaliação da integridade das amostras de RNA	65
6.3	Avaliação da expressão do gene Aire e de TRAs no estroma tímico	66
6.4	Avaliação de apoptose e necrose em ATOC	69
6.5	Determinação da sequência e concentração de RNAi anti-Aire para ensaio em ATOC	70
6.6	Análise da inibição do transcrito do gene Aire utilizando RNA interferente	74
6.7	Análise dos genes diferencialmente expressos por agrupamento hierárquico e da significância estatística do padrão de expressão	75
6.8	Determinação da expressão gênica promíscua (PGE) no timo	82
6.9	Análise das regiões cromossômicas de susceptibilidade ao DM-1	96
7.	DISCUSSÃO	100
7.1	Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD	100
7.2	Expressão do gene Aire e de TRAs no estroma tímico	100
7.3	Avaliação da inibição do transcrito do gene Aire com RNA interferente	104
7.4	Expressão gênica promiscua no timo	106
7.5	Regiões cromossômicas de susceptibilidade ao diabetes tipo 1	108
8.	CONCLUSÕES	111
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXOS	129
	Anexo I	130
	Anexo II	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento do microambiente epitelial do timo.....	4
Figura 2. Esquema representativo da estrutura do timo e de todos os seus componentes celulares.....	5
Figura 3. Estrutura e função do timo.....	9
Figura 4. Representação de diversos tecidos e órgãos parenquimais no timo.....	14
Figura 5. Tolerância central e periférica defectivas nos camundongos NOD.....	22
Figura 6. Ilustração dos métodos de marcação de sondas complexas de cDNA para <i>microarrays</i>	26
Figura 7. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para <i>microarrays</i>	45
Figura 8. Preparação da fita simples de cDNA incorporada com amino alil.....	47
Figura 9. Preparação do cDNA marcado com CyDye.....	48
Figura 10. <i>Pipeline</i> utilizado na análise de dados de <i>microarrays</i> em lâminas de vidro..	54
Figura 11. Ilustração da análise da significância estatística utilizando SAM.....	56
Figura 12. Ideograma representativo.....	58
Figura 13. Frequência de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	64
Figura 14. Integridade das amostras de RNA total.....	65
Figura 15. Avaliação da expressão dos genes: <i>Actb</i> , <i>Cd3e</i> , <i>Aire</i> e <i>Col II</i> no estroma tímico.....	67

Figura 16. Avaliação da expressão dos genes: Gad67, Ia-2, Ins-1 e Ins-2 no estroma tímico.....	68
Figura 17. Avaliação da viabilidade em ATOC por citometria de fluxo.....	69
Figura 18. Avaliação da inibição do transcrito do gene Aire utilizando as sequências de RNAi anti- Aire.....	71
Figura 19. Sequência do RNAi anti-Aire que promoveu melhor inibição do transcrito do gene Aire em cultura ATOC.....	71
Figura 20. Avaliação da transfecção dos timos em cultura com microscopia de fluorescência confocal.....	73
Figura 21. Avaliação da expressão do gene Aire em amostras de estroma tímico em cultura ATOC.....	74
Figura 22. Comparação dos perfis de expressão gênica entre camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes em estroma de timos recém removidos.....	77
Figura 23. Comparação dos perfis de expressão gênica entre camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes em estroma de timos em cultura ATOC.....	78
Figura 24. Comparação dos perfis de expressão gênica em camundongos NOD pré-autoimunes em estroma tímico tratado com RNAi Aire, RNAi controle e não tratado (controle).....	79
Figura 25. Comparação dos perfis de expressão gênica em camundongos NOD pré-autoimunes em estroma tímico tratado com RNAi Aire e não tratado (controle).....	80
Figura 26. Comparação dos perfis de expressão gênica em camundongos NOD pré-autoimunes em estroma tímico tratado com RNAi Aire e com RNAi controle.....	81
Figura 27. Gráfico ilustrativo do SymAtlas.....	82
Figura 28. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	84

Figura 29. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	85
Figura 30. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire, RNAi controle e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes.....	86
Figura 31. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes.....	87
Figura 32. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e tratados com RNAi controle de camundongos NOD pré-autoimunes.....	88
Figura 33. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	90
Figura 34. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	91
Figura 35. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire, RNAi controle e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes.....	92
Figura 36. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes.....	93
Figura 37. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e tratados com RNAi controle de camundongos NOD pré-autoimunes.....	94
Figura 38. Imagem típica de hibridização de <i>microarray</i> com sondas fluorescentes (Cy3 e Cy5).....	131

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Primers utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento e seqüências sense e antisense.....	41
Tabela II. Genes diferencialmente expressos (109) de acordo com o programa SAM em amostras de estroma de timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	133
Tabela III. Genes diferencialmente expressos (89) de acordo com o programa SAM em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.....	136
Tabela IV. Genes diferencialmente expressos (122) de acordo com o programa SAM em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e com RNAi controle e não tratados (controle).....	139
Tabela V. Genes diferencialmente expressos (53) de acordo com o programa SAM em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e não tratados (controle)	143
Tabela VI. Genes diferencialmente expressos (370) de acordo com o programa SAM em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e com RNAi controle.....	145
Tabela VII. Genes que codificam antígenos específicos para pâncreas em timo de camundongos NOD.....	95
Tabela VIII. Genes diferencialmente expressos em estroma de timos recém removidos e em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes com representatividade da PGE localizados em regiões coincidentes com idds conhecidas.....	97
Tabela IX. Genes diferencialmente expressos em estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes após tratamento com RNA interferente com representatividade da PGE localizados em regiões coincidentes com idds conhecidas.....	98

Resumo

RESUMO

A tolerância imunológica é a propriedade essencial do sistema imune que controla as reações patológicas contra antígenos do próprio. O timo é visto como o principal órgão envolvido com a indução de tolerância aos antígenos próprios que são expressos pelas células tímicas (tolerância central), enquanto que a indução de tolerância aos antígenos relacionados a outros tecidos (TRAs) tem sido atribuída aos mecanismos de tolerância extratímica (tolerância periférica).

Entretanto, a evidência da expressão de TRAs de órgãos e tecidos parenquimais no timo pelas células medulares epiteliais (mTECs) de camundongos e de humanos a qual foi referida como “expressão gênica promíscua” (PGE) reforçou a concepção de tolerância central de TRAs. O controle molecular dessa expressão tem sido atribuído ao gene Aire (*Auto immune regulator*) que é um regulador de transcrição.

No presente estudo, procurou-se retratar a expressão gênica promíscua no timo de camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) por meio da análise da expressão gênica em grande escala, ou seja, descrevendo seu transcriptoma usando a tecnologia de cDNA *microarrays*.

Para a análise dos dados utilizamos programas de bioinformática dedicados a *microarrays* bem como dados de bancos para a caracterização da PGE e susceptibilidade genética ao diabetes melitus do tipo 1 (DM-1).

Três conjuntos de resultados puderam ser evidenciados. No primeiro conjunto observou-se a ocorrência da PGE de antígenos tecidos/órgãos parenquimatosos (TRAs) em timos recém removidos e em *in vitro* em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes (diabéticos). O segundo conjunto de resultados consistiu na análise do efeito da inativação do transcrito de gene Aire na expressão gênica do timo de camundongos NOD *in vitro* em cultura ATOC. Finalmente, no último conjunto de dados, demonstrou-se que certos genes de TRAs com expressão promíscua, se encontram em regiões cromossômicas de susceptibilidade ao DM - 1 (idds). Como três deles (Il-4, Cd4 e Cdk4) são diretamente relacionados com a patogenia do DM-1 em camundongos foi possível estabelecer um paralelo entre PGE e susceptibilidade genética.

Abstract

Analysis of the promiscuous gene expression in the thymus of NOD (non obese diabetic) mice during onset of type 1 diabetes mellitus.

ABSTRACT

Immunologic tolerance is an essential property of the immune system, which controls immune reactions directed against the body self components. The thymus is seen as the main organ involved with the tolerance induction to self antigens, which are expressed by the thymic cells (central tolerance), while the tolerance induction to the diverse other peripheral tissues and organs is attributed to extra thymic mechanisms (peripheral tolerance).

Nevertheless, the evidence for the expression of peripheral tissue related antigens (TRAs) in the thymus by the medullary thymic epithelial cells (mTECs) of mice and humans, which have been termed to as promiscuous gene expression (PGE), has contributed to the concept of central tolerance to TRAs.

The molecular control of such gene expression has been attributed to the Aire (autoimmune regulator) gene, which plays a role as a transcriptional regulator.

In the present study, we searched to picture PGE in the thymus of NOD (non obese diabetic) mice by means of high throughput gene expression, analyzing the transcriptome by the cDNA microarray method. To analyzing data we used bioinformatics programs dedicated to microarrays and specialized data banks to characterize PGE and genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus (DM-1).

Studying pre and autoimmune NOD mice, we evidentiate three sets of results. In the first set, it was observed the occurrence of PGE of parenchymal tissue/organs antigens (TRAs) in fresh thymuses and in thymuses cultured *in vitro* in adult thymus organ cultures (ATOC).

The second set of results consisted in the analysis of the effect of *in vitro* (ATOC) Aire gene silencing on PGE.

Finally, in the third data set, we demonstrated that certain promiscuously expressed genes are positioned in DM-1 genetic susceptibility chromosomal regions (idds). As three of such genes (IL4, Cd4 and Cdk4) are directly associated to the DM-1 pathogenesis in mice, it was possible to establishing a parallel between PGE in the thymus and genetic susceptibility to this autoimmune disease.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel do timo no desenvolvimento das células T e na indução da tolerância imunológica

1.1.1 Ontogenia do timo

O timo deriva de invaginações do ectoderma no pescoço e tórax do embrião em desenvolvimento que formam estruturas chamadas de arcos branquiais (Abbas & Lichtman, 2005).

A origem do desenvolvimento do epitélio do timo tem sido debatida por décadas. Inicialmente, Cordier & Haumont (1980) sugeriram que o compartimento epitelial do timo seria derivado da ectoderme (córtex) e da endoderme (medula).

A hipótese de “origem dual” baseia-se na formação de um rudimento tímico de natureza reticuloepitelial e outro de origem endo-ectodérmica derivadas da terceira bolsa faríngeana e fenda branquial. O retículo do epitélio medular tímico é de origem endodérmica, enquanto que o retículo do epitélio cortical tímico é de origem ectodérmica. Nesta bolsa se formam tubos de células epiteliais que vão crescendo em forma de cordões para baixo até o tórax. Os cordões perdem a comunicação com sua origem e se transformam na medula do timo. Durante sua migração, decorrente de sua aderência ao pericárdio visceral, o rudimento tímico é invadido por vasos sanguíneos que serão os portadores dos precursores de timócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos. As células reticulares epiteliais emitem prolongamentos e formam os septos, corpúsculos de Hassal e as áreas onde vão ser ocupadas pelos linfócitos T em maturação no córtex. Posteriormente, inicia-se a tração pelo pericárdio, que leva o timo até sua posição anatômica no mediastino anterior na maioria dos animais, sendo que o timo se mantém no extramediastino cervical nas aves e branquial nos peixes (van Ewijk *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2005).

Embora num primeiro momento estudos digam que o timo tenha se derivado das células epiteliais de ambas as origens endodérmica e ectodérmica, experimentos em aves e camundongos, via transplante ectópico, tem demonstrado conclusivamente que as células epiteliais tímicas são exclusivamente de origem endodérmica, deste modo, refutando o modelo de “origem dual” de ontogenia epitelial tímica e aceitando um novo modelo de

“origem única” (Anderson & Jenkinson, 2001; Blackburn & Manley, 2004; Barthlott *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Recentemente, análises clonais utilizando embriões com 12 dias de desenvolvimento (Rossi *et al.*, 2006) e experimentos com mapeamentos indicando um progenitor comum para as células corticais e medulares (Bleul *et al.*, 2006), têm conclusivamente mostrado que somente um folheto germinativo contribui para o compartimento epitelial tímico e esse folheto seria a endoderme. Contudo, não se pode excluir sinais de indução e/ou sobrevivência de outro folheto germinativo (Manley *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2004; Boehm & Bleul, 2006).

Em camundongos, o timo surge como estruturas bilaterais da terceira bolsa faríngea no intestino primário embrionário (Manley, 2000; Gordon *et al.*, 2001) e são colonizados por progenitores hematopoéticos por volta do 11.5 dia do desenvolvimento embrionário (Itoi *et al.*, 2001). O primeiro marcador descrito para essa região foi o Foxn1, necessário para o desenvolvimento de células epiteliais tímicas funcionais, para a formação do timo e, portanto, para a formação da diversidade do repertório de células T auto-tolerantes (Nehls *et al.*, 1996; Boehm *et al.*, 2003; Bleul *et al.*, 2006).

Recentemente surgiram evidências da presença de um segundo timo em algumas linhagens de camundongos, chamado cervical, que se desenvolve após o nascimento e tendo o mesmo tamanho de um linfonodo. As células epiteliais no timo cervical também expressam Foxn1, indicando sua relação com o compartimento epitelial do timo torácico (Dooley *et al.*, 2006; Terszowski *et al.*, 2006). Essa descoberta pode mudar todo nosso conhecimento a cerca deste órgão, porém muitos estudos ainda deverão ser realizados a fim de se chegar a conclusões definitivas.

A involução alométrica do timo inicia-se pouco antes do nascimento e a involução absoluta ocorre na puberdade, entretanto o timo adulto continua a receber células precursoras, vindas da medula óssea e a lançar células colonizadoras das áreas T periféricas (Bodey *et al.*, 1997). Esse fenômeno é conhecido e frequentemente associado à idade, sendo caracterizado pela substituição do estroma tímico por tecido adiposo (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2005).

1.1.2 Estrutura do timo

O timo é um órgão linfóide primário em que os precursores de células T derivados da medula óssea se submetem a um processo complexo de maturação no contexto do microambiente tímico, representado por células não linfóides e linfóides e por componentes da matriz extracelular (ECM) (Villa-Verde *et al.*, 1995). É formado por dois lobos (direito e esquerdo), sendo ambos divididos em múltiplos lóbulos por septos fibrosos. Anatomicamente, cada lóbulo é dividido em uma região subcapsular, um córtex, que contém uma densa coleção de linfócitos T em maturação e uma medula, com uma população mais esparsa de linfócitos (tecido conjuntivo frouxo e células reticulares epiteliais), e onde ocorrem os processos finais de maturação dos linfócitos T (Abbas & Lichtman, 2005; Boehm & Bleul, 2006) (Figura 1).

Figura 1. Desenvolvimento do microambiente epitelial do timo. A) Capacidade de desenvolvimento das células TEC progenitoras. À esquerda estão indicadas as quatro bolsas faríngeas (i-iv); a origem comum da paratireóide (amarelo) e do timo (azul) está situada na terceira bolsa faríngeal. À direita, as células suprimidas com o gene funcional *Foxn1* apresentam timopoiese normal. Ao centro, um modelo para a diferenciação das células epiteliais do timo. Se existe ou não progenitoras epiteliais bipotentes para células medulares (MEP) e/ou corticais (CEP) não é sabido. B) Estrutura de um timo adulto encapsulado e dividido pelos septos mesenquimais em lóbulos individuais. CMJ = junção córtico-medular (cortico-medullary junction) (Extraído e modificado de Boehm & Bleul, 2006)

O córtex proporciona um microambiente necessário para a seleção positiva dos timócitos imaturos enquanto que a medula é responsável pela seleção negativa das células T auto-reativas. Os progenitores linfóides entram no timo adulto pela junção córtico-medular e então migram para a região subcapsular antes, porém, retornando pelo córtex em direção a medula (Anderson & Jenkinson, 2001).

Cada um destes compartimentos forma um microambiente estromal especializado que é crucial para controlar a maturação das células T. Este estroma é composto essencialmente de células epiteliais corticais (cTECs) e medulares (mTECs), fibroblastos reticulares, células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea, além de estruturas conhecidas como corpúsculos de Hassal, localizados especificamente na medula tímica e composto de espirais compactas de células epiteliais remanescentes de células em degeneração (Figura 2). O timo tem um suprimento vascular abundante e vasos linfáticos eferentes que drenam para os linfonodos do mediastino (van Ewijk W, 1991; Gray *et al.*, 2002; Abbas & Lichtman 2005).

Figura 2. Esquema representativo da estrutura do timo e de todos os seus componentes celulares. (Extraído e modificado de Human Embriology - <http://www.embryology.ch/anglais/qblood/lymphat03.html>).

A manutenção do microambiente tímico requer interações recíprocas entre timócitos e células estromais, denominadas de “*cross talk*” tímico (van Ewijk *et al.*, 1994; van Ewijk *et al.*, 2000; Germeraard *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2006).

A interação dos precursores de timócitos com o microambiente estromal permite o comprometimento desses com as linhagens celulares T e essencialmente elimina ou permite a supressão de células auto-reativas (Boehm & Bleul, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

As células epiteliais tímicas são os componentes celulares principais do microambiente tímico, e influenciam diferentes aspectos da diferenciação dos timócitos, vias de interações célula-célula e das secreções de fatores solúveis, tais como os hormônios tímicos timulina (*thymulin*), timopoetina (*thymopoietin*) e timosina- $\alpha 1$ (*thymosin- $\alpha 1$*) (Savino, 2006).

Dados recentes mostram que o hormônio do crescimento (GH) modula pleiotropicamente funções tímicas como, por exemplo, aumenta a proliferação de timócitos e de células epiteliais tímicas (Savino, 2007).

Um complexo linfoepitelial localizado corticalmente no timo, as células “nurse” tímicas (TNC), são estruturas multicelulares linfoepiteliais formadas por uma célula epitelial tímica (TEC) que abriga 20-200 timócitos, carregando primeiramente o fenótipo duplo-positivo CD4/CD8, embora timócitos imaturos duplo negativos, bem como, células maduras simples positivas também possam ser encontradas. TNCs criam provavelmente um microambiente especial para a diferenciação e/ou proliferação dos timócitos, com timócitos sendo expostos aos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e aos hormônios tímicos. Tal diferenciação ocorre em paralelo com a migração da célula dentro e fora do complexo (Savino, 2006).

O mesênquima tímico, derivado da crista neural, também pode ser capaz de influenciar diretamente o desenvolvimento dos precursores de células T CD4⁺8⁻ por apresentação de fatores de crescimento solúveis sobre componentes da matriz extracelular (ECM). Além de influenciar o desenvolvimento das células epiteliais tímicas imaturas, e assim ter um papel direto no estabelecimento do microambiente tímico (Jenkinson *et al.*, 2003).

1.1.3 Migração das células precursoras linfóides para o timo

Durante o desenvolvimento fetal, ocorre a geração de todas as células sanguíneas, chamada de hematopoese, ocorre inicialmente em ilhotas sanguíneas do saco vitelino e do mesênquima para-aórtico e depois no fígado fetal que gera precursores de células T de origem mesodérmica, e no baço. Essa função é assumida de modo gradual pela medula óssea, principalmente dos ossos chatos, de forma que, ao atingir a puberdade, a hematopoese ocorre principalmente no esterno, nas vértebras, nos ilíacos e nas costelas. A proliferação e o desenvolvimento de células precursoras na medula óssea são estimulados pelas citocinas, produzidas principalmente pelas células do estroma e macrófagos da medula óssea (Abbas & Lichtman 2005).

Os precursores de células T, ou células imaturas da linhagem de células T, derivados da medula óssea entram no timo na junção cortico-medular, e então migram à região subcapsular da glândula através dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento começa no córtex e, conforme os timócitos vão evoluindo eles migram para a medula tímica, de forma que esta contém principalmente células T maduras. Desta por sua vez, deixam o timo e entram no sangue e nos tecidos linfóides periféricos. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que regulam a migração de linfócitos e outros leucócitos através dos tecidos linfóides periféricos (Blackburn & Manley, 2004; Abbas & Lichtman 2005).

As células do microambiente tímico produzem dois grupos de moléculas, as quimiocinas, incluindo Cxcl12 (Chemokine C-X-C motif ligand 12), a qual preferencialmente atrai timócitos imaturos $CD4^-CD8^-$ e $CD4^+CD8^+$, e Ccl21 (Chemokine C-C ligand 21), que exerce quimioatração para timócitos simples positivos maduros, e as proteínas da matriz extracelular, visto que os timócitos em desenvolvimento expressam os receptores correspondentes. Além disso, embora as quimiocinas e a matriz extracelular possam dirigir a migração dos timócitos por si mesmo, uma função combinada para estas moléculas parece contribuir para os padrões de migração resultantes dos timócitos em seus vários estágios de diferenciação (Savino *et al.*, 2003; Savino *et al.*, 2006).

1.1.4 Maturação dos timócitos em células T

O processo de maturação dos linfócitos consiste numa complexa seqüência de eventos biológicos, compreendendo a proliferação das linhagens celulares precursoras, a expressão diferencial de proteínas de membrana, rearranjos gênicos do receptor de antígeno, a seleção do repertório de linfócitos maduros, e conseqüente morte celular programada dos linfócitos não selecionados e finalmente a migração celular. Durante cada um desses estágios, as células sofrem significativas mudanças celulares e genéticas (Abbas & Lichtman, 2005).

A maturação inicial caracteriza-se por um aumento da produção de todas as células sanguíneas na medula óssea e por uma alta atividade mitótica, estimulada principalmente pela interleucina 7 (IL-7) que é produzida pelas células do estroma da medula óssea e do timo e pelos ligantes Notch (Harman *et al.*, 2005; Zamisch *et al.*, 2005). A atividade proliferativa cessa depois que os genes para os receptores de antígeno são expressos. Tais genes surgem por um processo de recombinação somática gerando diversidade do repertório dos linfócitos após junção de segmentos gênicos diferentes.

A interação entre células estromais e linfóides dentro do microambiente tímico é um fator crítico para formar a correta especificidade antigênica do repertório de células T, assim como para capacitá-lo a responder à apresentação de antígenos estranhos pelas moléculas de MHC e não responder a antígenos próprios (Barthlott *et al.*, 2006).

Os timócitos imaturos corticais recém-chegados ao timo contêm os genes de TRs na configuração germinativa e, portanto, ainda não expressam o TCR, CD3, as cadeias ζ e os co-receptores CD4 e CD8. Essas células são chamadas de timócitos duplo-negativos (DN) e se submetem à múltiplos ciclos de proliferação e de progresso ao estágio duplo-negativo CD4⁻CD8⁻ (DN), aproximadamente 5% do total de timócitos, com discretos passos de maturação distinguidos pela expressão de marcadores de superfície celular CD44^{high}CD25⁻ (DN1), CD44^{high}CD25⁺ (DN2), CD44^{low}CD25⁺ (DN3), e CD44^{low}CD25⁻ (DN4). As proteínas do complexo recombinase (Rag-1 e Rag-2) são expressas pela primeira vez nesse estágio, e os rearranjos V(D)J se iniciam. Durante a transição da fase DN para duplo-positiva CD4⁺CD8⁺ (DP), aproximadamente 85% dos timócitos se redistribuem à região cortical (Ramialison *et al.*, 2002). O rearranjo dos genes da

cadeia α e a expressão do heterodímero TCR $\alpha\beta$ ocorrem na população $CD4^+CD8^+$, exatamente antes ou durante a migração dos timócitos do córtex para a medula (Figura 3).

Figura 3. Estrutura e função do timo. Dividido em duas regiões, córtex e medula, povoados por diferentes subtipos celulares epiteliais tímicos (TECs). Nos adultos, os precursores de células T entram no timo pela junção cortico-medular, e começam então um programa altamente complexo de diferenciação, o qual está ligado à migração através do estroma tímico. Os subtipos diferentes de timócitos são encontrados conseqüentemente em regiões espacialmente restritas do timo. O córtex tímico foi separado em quatro regiões: *Região 1*, junção cortico-medular, local de entrada dos precursores de células T; *Região 2*, células diferenciadas em DN2 as quais se submetem a expansão clonal proliferativa; *Região 3*, inicia-se os rearranjos V(D)J dos genes TRs em células no estágio DN3; *Região 4*, transição de DN para o estado de DP ($CD4^+CD8^+$). Células DP migram do córtex para a medula tímica, onde se diferenciam em simples positivas (SP $CD4^+$ ou $CD8^+$). A seleção positiva ocorre no córtex entre as TECs corticais (cTECs), e a seleção negativa ocorre principalmente na medula, entre as TECs medulares (mTECs) e células dendríticas (DCs). Células SP que completaram o programa de diferenciação saem da medula tímica em direção à periferia. [Extraído e modificado de Blackburn & Manley, 2004].

A recombinação V(D)J dos receptores de células T é um evento molecular essencial na maturação destas células. É um processo de recombinação sítio específica da molécula de DNA que só ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento dos linfócitos T e B. A geração de grande diversidade nas regiões variáveis do receptor de antígeno de linfócitos T é crucial para que os organismos possam reconhecer e responder contra, virtualmente, todo e qualquer antígeno estranho.

Cada locus TCR consiste de segmentos gênicos de regiões variáveis (V), *joining* (J) e constante (C), e para as cadeias β e δ incluem segmentos gênicos de diversidade (D). De modo geral, o rearranjo dos segmentos gênicos, ocorre através da ligação de um segmento J a um dos segmentos D, formando uma união D-J, posteriormente um dos segmentos gênicos V se liga ao segmento D-J unidos. Toda sequência de DNA interveniente aos segmentos gênicos que se ligaram passam por um processo de deleção (Paul, 1993). Os segmentos gênicos rearranjados são transcritos em um RNA primário, que se torna um RNA maduro após o seu processamento. O rearranjo D-J e V-DJ ocorre entre os segmentos gênicos da cadeia β e δ de TCR; entre os segmentos gênicos da cadeia α e γ onde não há segmentos D, ocorre apenas o rearranjo V-J (Abbas & Lichtman, 2005).

As primeiras células que expressam os TCRs estão no córtex tímico, e essa expressão é baixa em comparação com a célula T madura. Em virtude da expressão de seus complexos TCR completos, as células duplo-positivas podem responder ao antígeno e ficam sujeitas à seleção positiva e negativa. A maioria das células DP, as quais constituem cerca de 80% daquela população, morre por negligência porque não reconhecem moléculas disponíveis de MHC expressas por células estromais tímicas (Abbas & Lichtman, 2005; Savino, 2006).

As células que passam com sucesso pelos processos de seleção amadurecem em células T CD4⁺ ou CD8⁺ e são chamadas de timócitos simples positivos (SP), e compreendem aproximadamente 10% dos timócitos no timo (Ramialison *et al.*, 2002). Assim, os estágios de maturação das células T podem ser rapidamente distinguidos pela análise da expressão das moléculas CD4 e CD8. Essa maturação fenotípica é acompanhada da maturação funcional (Abbas & Lichtman, 2005).

Finalmente, os timócitos maduros com positividade única (células T CD4 e CD8 restritas ao MHC) entram na medula do timo e deixam esse órgão pelos

vasos sanguíneos para colonizar os tecidos linfóides periféricos (Haks *et al.*, 1998). Apenas 15% dos timócitos que vivem no timo nesta fase vão formar a maioria do repertório de células T periféricas (Savino, 2006).

1.1.5 Indução da Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica aos antígenos próprios envolve processos de seleção negativa e positiva de linfócitos T que se desenvolvem no timo, fenômeno também chamado de “educação tímica dos linfócitos T” (Abbas & Lichtman, 2005).

Células T imaturas provenientes da medula óssea passam pelo processo de maturação intratímica constituído pelos estágios de duplo-negativas ($CD4^- CD8^-$), duplo-positivas ($CD4^+ CD8^+$) e simples positivas ($CD4^+$ ou $CD8^+$). Durante estes estágios ocorre também a recombinação V(D)J dos $TCR\alpha/\beta$. A tolerância imunológica, por sua vez, depende de interações entre TCR dos timócitos e o complexo peptídeo MHC próprio das células estromais tímicas (Anderson *et al.*, 2006).

A seleção positiva é o processo na qual os timócitos DP (no córtex) que apresentam TCR completo na superfície, se ligam com baixa avidéz (fracamente) ao complexo peptídeo MHC próprio e são estimulados a sobreviver. Os timócitos cujos receptores não reconhecem as moléculas de MHC próprias morrem por apoptose. Isso assegura que as células T maduras sejam restritas ao MHC próprio. Na seleção positiva também há restrição de moléculas de classe I ou de classe II do MHC com os subtipos de linfócitos T, assegurando que as células T $CD8^+$ citotóxicas sejam específicas a peptídeos expostos pelas moléculas de MHC de classe I, enquanto que as células T $CD4^+$ auxiliares ligam-se às moléculas de MHC de classe II associadas ao peptídeo (Abbas & Lichtman, 2005; Anderson *et al.*, 2006). As moléculas CD4 e CD8 funcionam como co-receptores do TCR durante a seleção positiva e reconhecem as moléculas de MHC enquanto que o complexo TCR reconhece o complexo peptídeo MHC. Os sinais liberados pelo complexo TCR e os co-receptores funcionam simultaneamente no sentido de promover a sobrevivência dos timócitos (Abbas & Lichtman, 2005).

Em contraste, a seleção negativa é a eliminação por apoptose dos timócitos cujos TCRs ligam-se com avidéz (fortemente) ao antígeno próprio apresentado pela molécula de MHC própria de células dendríticas ou de mTECs. A avidéz do reconhecimento do antígeno depende da afinidade do TCR e da

concentração do peptídeo que a célula T reconhece. Este processo elimina células T em desenvolvimento que são fortemente auto-reativas contra antígenos próprios ubíquos, que são os antígenos próprios expressos pelas mTECs, antígenos relacionados a tecidos (TRAs) (Abbas & Lichtman, 2005).

Existe uma distinção no papel das células TECs. As células corticais não só auxiliam na atração dos precursores linfóides do sangue para o timo como também controlam a diferenciação dos timócitos ao estágio em que eles expressam em sua superfície o receptor de células T $\alpha\beta$ completo. Consequentemente, os peptídeos próprios e as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) encontram afinidade suficiente nessas células sendo assim selecionadas positivamente. Posteriormente, os timócitos se movem para a medula. As mTECs apresentam moléculas MHC que expressam peptídeos que representam muitos tecidos do parênquima. Os timócitos que apresentarem alta afinidade pelos complexos serão negativamente selecionados ou deletados (Holländer, 2007).

De fato, todos os grupos de células apresentadoras de antígenos (APCs), assim como as corticais tímicas (cTECs), medulares tímicas (mTECs), células dendríticas (DCs) e macrófagos tem suas funções na apresentação de grupos de peptídeos próprios, e especialização nas suas habilidades para suportar as seleções positiva e negativa, contribuindo para a diversidade do quadro de antígenos próprios no timo (Klein & Kyewski, 2000a; Kyewski & Derbinski, 2004; Anderson *et al.*, 2006).

O processo de seleção e a maturação do repertório de células T são de grande importância, pois induzem a tolerância dessas células ao que é próprio. A aquisição dessa tolerância é dependente da interação entre receptor de célula T (TCR - Tcell receptor) e ligantes peptídeos-MHC próprios. Logo a diversidade de antígenos próprios acessível a esse repertório no timo é quem vai determinar a extensão e especificidade dessas células (Klein & Kyewski, 2000b).

1.2 Expressão Gênica Promíscua no timo

A discriminação do próprio/não-próprio é uma propriedade essencial do sistema imune que dirige uma variedade de mecanismos efetores contra agentes patogênicos enquanto ignora os constituintes próprios do organismo. Somente quando a tolerância ao próprio está finalmente balanceada é que a integridade do corpo é garantida (Kyewski & Derbinski, 2004).

A tolerância imunológica é a propriedade essencial do sistema imune que controla as reações patológicas contra antígenos do próprio. O timo é visto como o principal órgão envolvido com a indução de tolerância aos antígenos próprios que são expressos pelas células tímicas (tolerância central), enquanto que a indução de tolerância aos antígenos relacionados a outros tecidos (TRAs) tem sido atribuída aos mecanismos de tolerância extratímica (tolerância periférica).

A evidência da expressão de TRAs de órgãos e tecidos parenquimais no timo de camundongos e de humanos foi referida como “expressão gênica promíscua” (PGE) (Jolicœur *et al.*, 1994; Sospedra *et al.*, 1998; Derbinski *et al.*, 2001; Gotter *et al.*, 2004; Kyewski & Derbinski, 2004), o que reforçou a concepção de tolerância central de antígenos tecidos específicos.

Entretanto, a descrição do fenômeno da expressão promíscua de genes de TRAs pelas células tímicas medulares epiteliais (mTECs), que expressam moléculas que normalmente caracterizam outros tecidos (Figura 4), iniciou uma nova fase na pesquisa em imunogenética que se ocupa da reavaliação das bases moleculares da tolerância central das células T na prevenção da autoimunidade (Kyewski & Derbinski, 2004).

Figura 4. Representação de diversos tecidos e órgãos parenquimais no timo murino é garantida pela expressão dos antígenos tecido específicos (TRAs) pelas células epiteliais (TECs), fenômeno chamado expressão gênica promiscua (Extraído e modificado de Kyewski & Derbinski, 2004).

Atualmente, é reconhecido que ao invés de seletivo, este tipo de expressão é o mais amplo possível, com diversa ontologia e podendo envolver até 10% de todos os genes do camundongo e, muito provavelmente do homem (Kyewski & Derbinski, 2004).

Ao contrário do que se assume, as mTECs não formam um esqueleto estático, mas de maneira similar ao epitélio estratificado da pele ou dos intestinos, têm um “turnover” com meia-vida de 3 a 4 semanas (Booth *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2003; Boehm *et al.*, 2003). Isto torna as mTECs um compartimento tímico altamente dinâmico, e que apesar disso, o espectro dos antígenos próprios expressos não se altera segundo o que observa Kyewski e Derbinski (2004). Os timócitos que entram na medula do timo sempre encontrarão um espectro completo de “genes promíscuos” apesar da geração contínua de mTECs.

O controle molecular da expressão gênica promíscua no timo também deve ser investigado. O gene *Aire* (*Autoimmune regulator*) que é um regulador da transcrição (Pitkänen *et al.*, 2003) controla a expressão de um conjunto de genes de TRAs em mTECs, com uma tendência a genes que cuja expressão é preferencial de células diferenciadas (Anderson *et al.*, 2002 e 2005; Derbinski *et al.*, 2005; Derbinski & Kyewski, 2005; Barthlott *et al.* 2006; Kont *et al.*, 2008).

Mesmo assim, os genes que são controlados por *Aire* são altamente diversos com relação à estrutura e função, o que dificulta conclusões sobre seu modo de ação detalhado. Dados recentes indicaram que *Aire* contém domínios de ligação com DNA (Kumar *et al.*, 2001), mas controla a transcrição de maneira independente da posição de promotores.

O gene *Aire* codifica uma proteína de 552 aminoácidos expressa principalmente no timo, e em menor extensão nos linfonodos, além de ter sido encontrado em alguns outros tecidos (Zuklys *et al.*, 2000; Halonen *et al.*, 2001; Adamson *et al.*, 2004).

O sequenciamento genômico comparativo indica que a organização gênica é altamente conservada em humanos e camundongos sendo caracterizada por 14 éxons distantes 13kb do DNA genômico, por uma região promotora TATA box associada a sítios CpG e por um elemento controlador localizado *upstream* do primeiro éxon. Os genes *Aire* de ambos são altamente homólogos e as respectivas proteínas contém estruturas peculiares similares (Blechs Schmidt *et al.*, 1999).

Uma parte dos transcritos de TRAs, porém parecem ser independentes da expressão de *Aire* (Derbinski *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2005), e este gene também regula positiva e negativamente a transcrição de uma gama de genes nas TECs, que não codificam para TRAs. O significado deste controle no timo foi observado em estudos com animais *Aire-knockout*, onde a ausência desse gene promove o aparecimento de auto-anticorpos, especialmente para o olho e o estômago (Devoss *et al.*, 2006; Gavanescu *et al.*, 2007), sendo suficiente para causar autoimunidade. Em outro estudo, análises de camundongos *Aire*^{-/-} mostram que a expressão de algumas TRAs é reduzida ou ausente em células mTECS deficientes de *Aire* e a seleção negativa dos timócitos é prejudicada (Liston *et al.*, 2004a).

Entretanto, a significância destes achados para a compreensão com precisão da ação de Aire *in vivo* ainda não está clara. É preciso que haja evidências diretas de co-regulação dos genes de TRAs (expressão promíscua) devido à seqüências consenso em suas regiões de promotores/*enhancers*, nas quais atuaria a proteína Aire ou mesmo outros complexos reguladores da transcrição (Kyewski & Derbinski, 2004).

Um estudo recente mostrou que as TRAs seguem o padrão de expressão do gene Aire durante o desenvolvimento normal do timo e sua involução. Uma baixa expressão do gene começa a ser detectada por volta do dia 13,5 do desenvolvimento embrionário e aumenta significativamente no dia 15,5. A maior taxa de expressão do gene acontece no 11º após o nascimento e gradualmente decresce (Kont *et al.*, 2008).

O Grupo de Imunogenética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto vem trabalhando com culturas de timo fetal (FTOC, Fetal Thymus Organ Culture) e adulto (ATOC, Adult Thymus Organ Culture) procurando compreender melhor a ação do gene Aire *in vitro*.

Os estudos sobre expressão gênica no timo, incluindo expressão promíscua, normalmente são planejados para utilizar amostras frescas, recentemente coletadas por cirurgia, o que deve refletir a situação *in vivo* em curto prazo.

Entretanto, as culturas do órgão *in vitro* que são baseadas no uso de timo fetal (FTOC) ou de timo adulto (ATOC) apresentam grandes vantagens pois preservam a arquitetura e a constituição celular originais do timo *in vivo* (DeLuca *et al.*, 1995).

Nosso grupo de pesquisa aliou este recurso com a tecnologia dos cDNA *microarrays* e conseguiu demonstrar que ocorre maturação de células T por meio da detecção da recombinação V(D)J de receptores de células T (TRVB8.1) e modulação da expressão gênica em FTOCs numa escala de transcriptoma evidenciando a participação de genes essenciais implicados no desenvolvimento do timo (Cardoso *et al.*, 2006).

Outro trabalho empregando cDNA *microarrays* na tentativa de observar a ocorrência de expressão promíscua em FTOCs de camundongos Balb-c foi realizado pelo mesmo grupo. Comparando o tempo de gestação e a duração das culturas, foi possível determinar a época da emergência da indução de genes de

TRAs os quais representaram 57 diferentes órgãos parenquimais e 7 órgãos linfóides. Mostrou-se pela primeira vez que FTOC também reproduz a expressão gênica promíscua (Sousa Cardoso *et al.*, 2006).

Como estas observações foram realizadas no timo da linhagem Balb-c que não apresenta, pelo que se sabe, doenças auto imunes, o presente trabalho procurou mensurar a expressão gênica promíscua em linhagens autoimunes na tentativa de apontar genes de TRAs que uma vez desregulados poderão ocasionar falha na tolerância central.

Neste trabalho aprofundaram-se as análises sobre expressão gênica promíscua no timo da linhagem isogênica autoimune NOD (*Non Obese Diabetic*) procurando apontar genes cujo descontrole nos níveis de expressão poderão estar implicados na manifestação de autoimunidade. O timo desta linhagem foi estudado *in vivo* e em cultura (ATOC) para a observação das variações da expressão gênica promíscua por meio da tecnologia dos cDNA *microarrays*. O timo em cultura ATOC também serviu de sistema modelo para a inibição do transcrito do gene Aire sobre a expressão promíscua de genes de TRAs por meio da técnica de RNA interferente (RNAi).

O fenômeno do RNAi foi primeiramente observado no final da década de 1980, representando atualmente uma técnica potente no silenciamento da expressão de genes por meio da degradação de seu RNA mensageiro (Caplen *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2005). O processo envolve diversas etapas, do qual fazem parte a clivagem de um RNA dupla-fita em porções menores de 21-28 nucleotídeos por uma enzima RNase-III denominada Dicer. As fitas simples de RNAi geradas pela degradação, são incorporadas a um complexo multiprotéico chamado RISC (*RNA-inducing silencing complex*), que serve como base para o reconhecimento do RNA mensageiro (RNAm) complementar alvo, que por sua vez é degradado por uma enzima Slicer do complexo, uma proteína posteriormente reconhecida e denominada Argonauta-2. O RNAi exibe uma eficácia de longo alcance, pelo fato de estar protegido pelo complexo RISC, sendo então preservado facilitando assim a degradação de RNAs mensageiros em subseqüentes reações endonucleolíticas.

Diversos pequenos tipos de RNAs dupla-fita artificiais têm sido inseridos em uma grande variedade de células e organismos diferentes, sendo, portanto a técnica de RNAi amplamente utilizada como um método para o silenciamento de

genes específicos. Assim, essa tecnologia apresenta um vasto potencial como ferramenta para determinar funções de genes, e como forma de terapia para patologias caracterizadas por expressão aberrante de proteínas celulares, como doenças infecciosas, desordens genéticas, neoplasias e disfunções imunológicas.

1.3 Autoimunidade e doenças autoimunes

A possibilidade de que o sistema imune de um indivíduo possa reagir contra antígenos autólogos e causar dano tecidual foi apreciada por imunologistas desde quando a especificidade do sistema imune para antígenos estranhos foi reconhecida. Hoje sabe-se que os eventos-chave no desenvolvimento de autoimunidade são o reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos auto-reativos, a ativação destas células para proliferarem e se diferenciarem em células efectoras e os seus produtos (Abbas & Lichtman, 2005).

As doenças autoimunes são condições patológicas em que o sistema imune age sobre si mesmo e causa sérios danos teciduais através de mecanismos ainda desconhecidos (Kamradt & Mitchison, 2001; Tarner & Fathman, 2001). Essas doenças surgem a partir da interação de três componentes: genético, ambiental e regulatório que resultam numa falha na auto-tolerância (Fathman *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005). Tal falha na tolerância central impediria a expressão gênica promíscua de genes TRAs que se encontrariam desregulados em tal situação.

Desordens autoimunes comuns em humanos como diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico refletem a combinação de muitos fatores genéticos suportados por resultados de doenças autoimunes em modelos animais (Jiang *et al.*, 2005).

O uso da terapia gênica no combate de doenças autoimunes em humanos tem sido estudado e pode ser uma área promissora da pesquisa no tratamento dessas doenças. A inserção de um DNA em células hospedeiras poderia procurar corrigir um dos três efeitos: defeito genético dado por um gene defectivo ou ausente; inserção de genes que codificam moléculas anti-inflamatórias, como citocinas (IL-4, IL-10 ou TGF- β) ou ainda interferência com processos de sinalização envolvendo reações autoimunes, como sinalização por TCR ou vias de co-estimulação ou apoptose (Tarner & Fathman, 2001).

O alto percentual de doenças em pares discordantes de gêmeos monozigóticos demonstram o papel central dos fatores ambientais na etiologia das doenças autoimunes. Estudos em modelos animais têm mostrado claramente que infecções podem dar início a doenças autoimunes (Bach, 2005). Associações entre viroses e o desenvolvimento do diabetes tipo 1 têm sido feitas. As viroses são consideradas fatores ambientais de risco porque induzem fortes respostas imunes e podem infectar o pâncreas e as células β (Gianani & Sarvetnick, 1996; Filippi & von Herrath, 2005; von Herrath *et al.*, 2007).

O diabetes melitus é uma doença metabólica multi sistêmica decorrente do comprometimento da produção de insulina resultante da destruição das células β . Vários mecanismos podem contribuir para a destruição dessas células incluindo reações mediadas por linfócitos $CD4^+$ reativos. Inicialmente ocorre necrose celular e infiltração linfocitária ($CD4^+$ e $CD8^+$) gerando lesões conhecidas como insulite. O camundongo NOD (*Non Obese Diabetic*), modelo para estudo da doença, desenvolve insulite espontânea também mediada por linfócitos T, seguida por diabetes manifesto (Abbas & Lichtman, 2005).

Como em humanos, o progresso da doença em camundongos NOD é definida em pelo menos dois estágios. No primeiro deles, a infiltração das ilhotas do pâncreas pelas células T auto-reativas começa depois dos 4 meses de idade e torna-se progressivamente mais extensa mas, poupa ainda uma parte das células β produtoras de insulina. Esse estado pré-diabético pode persistir por meses (anos em pacientes), o ataque autoimune se mantém sob controle e relativamente não destrutivo. No segundo estágio, tipicamente entre 15 a 25 semanas de idade, eventos desconhecidos provocam insulite que progride para a destruição das células β (Castaño & Eisenbarth, 1990; Serreze & Leiter, 1994).

O diabetes tipo 1 tem influência genética e ambiental no seu desenvolvimento. O diabetes autoimune em NOD apresenta muitas características genéticas e patofisiológicas com o diabetes humano. Em ambas as espécies, os genes do MHC e outros não-MHC contribuem para a susceptibilidade da doença. Cerca de 20 regiões não-MHC conhecidas como *idd* (*insulin dependent diabetes*) têm sido associadas ao risco da doença em camundongos NOD (Maier & Wicker, 2005).

Essas regiões de susceptibilidade podem afetar a habilidade da deleção clonal de células T precursoras auto-reativas no timo (Liston *et al.*, 2004b), a

habilidade de apresentar auto-antígenos e selecionar células T auto-reativas (Stratmann *et al.*, 2003), a tolerância periférica e a atividade das células T ou moléculas com potencial regulatório (Salomon *et al.*, 2000; Kreuwel *et al.*, 2001) ou a agressividade da lesão (Lyons *et al.*, 2000a).

Uma das estratégias para localizar um gene de grande efeito na susceptibilidade a um distúrbio baseia-se no conceito de ligação genética. Esse conceito refere-se ao fato de que dois *loci* gênicos situados muito próximos num mesmo cromossomo tendem a ser herdados juntos (ligados). Desse modo, se um determinado marcador genético, cuja localização já é conhecida, for sempre herdado junto com a doença pelos membros afetados de uma mesma família, muito provavelmente o gene da doença terá sua localização nas vizinhanças desse marcador (Aune *et al.*; 2004). Estudos de *linkage* no genoma total demonstra que múltiplas doenças auto-imunes exibem *loci* de susceptibilidade comum (Wanstrat & Wakeland, 2001). Uma alternativa para o estudo de genes envolvidos em doenças complexas, cujo modo de transmissão não é conhecido, são os estudos de associação. A associação com o marcador investigado ocorre quando o gene ou o *locus* em desequilíbrio de ligação com o marcador estão envolvidos na patofisiologia da doença. A maior vantagem dos estudos de associação é que eles podem detectar genes com efeitos modestos (Michelon & Vallada, 2004). Estudos de expressão dos *loci* de susceptibilidade que foram identificados por *linkage* são raros, até o momento. Nosso grupo recentemente publicou um artigo associando a tecnologia dos cDNA *microarrays* com dados de *linkage*, na investigação de genes diferencialmente expressos de células B (CD19⁺) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (SLE) (Trevisan *et al.*; 2006). Esse estudo sugeriu que regiões cromossomais previamente identificadas como *loci* de susceptibilidade ao SLE são de fato transcritos por células B de pacientes. Até o momento não foi realizada essa associação com diabetes mellitus do tipo 1.

Estudos de *linkage* em camundongos têm sido confirmados por estratégias congênicas em diabetes tipo 1 e outras doenças autoimunes. Muitas regiões inicialmente encontradas apresentam-se como sítios de muitos genes de susceptibilidade, como por exemplo, o sinal de *linkage* no cromossomo 3 de camundongos cuja dissecação resultou na descoberta de 4 *loci* de susceptibilidade (Podolin *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2000b; Penha-Gonçalves *et al.*, 2003).

A caracterização do perfil de expressão gênica pode identificar milhares de genes expressos que podem ter sua transcrição regulada por padrões que identificam uma doença. Assim, a investigação de novos genes potencialmente envolvidos com a determinação da doença pode ser conduzida de modo mais rápido e amplo.

1.4 A importância dos camundongos NOD na pesquisa do diabetes tipo 1

A linhagem NOD (*Non Obese Diabetic*) é um importante modelo para estudo da emergência do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1). Desde seu aparecimento ocorrido há mais de 20 anos, estudos com esta linhagem têm proporcionado muitas idéias e resultados sobre a complexidade dos processos envolvidos com doenças autoimunes. Os camundongos NOD representam um excelente modelo de doença autoimune sendo muito úteis para dissecar os mecanismos de tolerância, pois desenvolvem espontaneamente diabetes autoimune muito similar ao diabetes autoimune do tipo 1 humana, incluindo a presença de autoanticorpos pâncreas específicos, células T CD4+ e CD8+ autoreativas e sintonia de grupos de ligação (linkage) com regiões de cromossomos humanos (Atkinson & Leiter, 1999; Anderson & Bluestone, 2005).

Experimentalmente, uma tolerância central defectiva têm sido implicada em pelo menos parte do processo patológico em camundongos NOD (Anderson & Bluestone, 2005) e essa falha parece ser causada por defeito intrínseco no processo de apoptose nos timócitos de NOD durante a seleção negativa (Kishimoto & Sprent, 2001; Liston *et al.*, 2004b; Zucchelli *et al.*, 2005) (Figura 5).

Figura 5. Tolerância central e periférica defectivas nos camundongos NOD. A figura ilustra defeitos em vários processos tolerogênicos que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD. (Extraído e modificado de Anderson & Bluestone, 2005).

Além do camundongo NOD outro roedor, o rato BB (*BioBreeding*) também é usado como modelo para estudo do diabetes tipo 1. A razão pela preferência por modelos animais é devido ao fato de eles terem um genoma definido, terem mais reagentes monoclonais para a análise dos componentes do sistema imune além de menor custo. Além do mais, os resultados encontrados em NOD podem ser extrapolados para humanos (Atkinson & Leiter, 1999).

O camundongo NOD surgiu a partir da linhagem do camundongo Suíço (Swiss) durante um experimento de seleção no Japão em que cruzamentos entre irmãos foram mantidos para que uma linhagem toda desenvolvesse catarata. Porém, além de não apresentarem catarata, os camundongos tiveram seu índice glicêmico alterado e linhagens susceptíveis a não susceptíveis a doenças autoimunes foram selecionadas (Makino *et al.*, 1980; Atkinson & Leiter, 1999).

A incidência do diabetes espontâneo em NOD é de 60% a 80% em fêmeas e de 20% a 30% em machos. Essa incidência da doença aumenta quando o camundongo é mantido em ambiente relativamente livre de patógenos e decresce dramaticamente em condições normais de manutenção (Singh & Rabinovitch, 1993; Bowman *et al.*, 1994). O início do diabetes ocorre entre 12 a 14 semanas de idade em fêmeas e um pouco depois em machos. Estudos histológicos mostram que os infiltrados celulares são notados nas ilhotas até aproximadamente 3 a 4 semanas de idade quando os animais começam a demonstrar a peri-insulite (Anderson & Bluestone, 2005).

O camundongo NOD também está propenso a desenvolver outras síndromes autoimunes como: sialite (Hu *et al.*, 1992), tireoidite autoimune (Many *et al.*, 1996), polineuropatia periferal autoimune (Salomon *et al.*, 2001) e prostatite (em machos).

1.5 Análise do transcriptoma

1.5.1 Conceito de transcriptoma

Em analogia ao termo genoma o qual se refere ao conjunto de genes de uma determinada espécie, criou-se o termo transcriptoma para se referir ao conjunto de RNAs, ou seja, os transcritos de uma célula num dado momento de seu ciclo. Como são os RNAs os responsáveis pela codificação da síntese de proteínas e, portanto, os mais importantes no estudo da expressão do genoma,

geralmente entende-se que o transcriptoma é o conjunto dos RNAm. Mas é oportuno lembrar que tanto os RNAs transportadores (RNAt) e os RNAs ribossômicos (RNAr) devem ser incluídos no conceito do transcriptoma apesar de não serem codificadores de proteínas.

Recentemente foram incluídos os microRNAs no conceito de transcriptoma por representarem uma classe distinta de RNAs que controlam a expressão gênica ao nível da síntese e/ou degradação dos RNAm (Sevignani *et al.*, 2006).

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual, um conjunto diversificado de proteínas é mobilizado como resultado da expressão diferencial dos respectivos genes. Portanto, pode-se dizer que durante o desenvolvimento o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica ao nível do conjunto de RNAm, definido como transcriptoma. Sabe-se hoje que o transcriptoma das células e tecidos é reflexo da razão entre a biossíntese de RNAm (transcrição) e sua degradação, muitas vezes causada pelos microRNAs (Sevignani *et al.*, 2006).

Além disso, o transcriptoma é variável entre os diferentes tipos de células, tecidos e órgãos de um dado indivíduo, sendo que as próprias condições fisiológicas normais, como as diferentes fases do ciclo celular, ou patológica, como por exemplo, infecções ou neoplasias, influenciam no chamado perfil do transcriptoma (Passos *et al.*, 2000).

A comparação da expressão gênica por mensuração dos níveis de RNAm de células em condições normais e patológicas está resultando em diagnósticos por “*fingerprints*” o que poderá ajudar a identificar disfunções moleculares com maior precisão, para uma posterior intervenção terapêutica (Xiang & Chen, 2000).

1.5.2 Métodos de análise do transcriptoma

Cópias de RNAm na forma de DNA (DNA complementar ou simplesmente cDNA) clonadas em vetores plasmidiais de *E.coli* e o sequenciamento a partir da extremidade 3'-OH, perfazendo 0,3 a 1,5 kb, confere ao que chamamos de “*Expressed Sequence Tags*” (ESTs) ou em português, Etiqueta de Sequência Expressa. As ESTs proporcionaram um avanço significativo na decifração do genoma funcional humano, de camundongos e outros organismos.

Mais recentemente o Brasil deu uma contribuição importante no sequenciamento de cDNAs pela tecnologia das seqüências ORESTES (*Open-Reading Frame ETSSs*) (Dias Neto *et al.*, 2000). Tais seqüências correspondem a

porções mais internas em direção à extremidade 5' dos RNAm, o que fez os pesquisadores conhecerem mais sobre a estrutura do transcriptoma humano.

Um grande progresso tem ocorrido nos últimos anos na caracterização de clones de cDNA de humanos, camundongos e outros organismos-modelo. Os clones de cDNA e suas seqüências formam a base para a técnica de arranjos em membranas de alta densidade (*microarrays*) para a análise de expressão gênica em grande escala (Duggan *et al.*, 1999; Lipshutz *et al.*, 1999).

Várias técnicas para a análise do transcriptoma analisando expressão de mRNA estão disponíveis atualmente como SAGE (análise em série da expressão gênica, do inglês Serial Analysis of Gene Expression) (Ye *et al.*, 2002). Entretanto, estes métodos possuem desvantagens, quando o objetivo é analisar expressão em grande escala. Porém, o problema apresentado por estas técnicas pode ser solucionado por meio da tecnologia de *microarrays* (Jordan, 1998; Passos *et al.*, 2000; van Hal *et al.*, 2000; Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003).

A tecnologia dos cDNA *microarrays* mostrou ser uma ferramenta poderosa e muito difundida nos estudos de expressão gênica com aplicações no estudo de vários organismos tanto em situações normais como patológicas (Whitney & Becker, 2001) além de expressar centenas de genes simultaneamente e fornecer assinaturas moleculares das atividades celulares nos estudos de doenças multigênicas como é o caso das doenças autoimunes (Fathman *et al.*, 2005). Aliando-se a disponibilidade das bibliotecas de cDNA com a robótica de alta precisão na deposição de pequenas amostras em superfícies sólidas, tornou-se possível a preparação dos *arrays* (arranjos) de clones de cDNA, produtos de PCR (reação de polimerização em cadeia) e oligonucleotídeos em membranas de nylon ou em lâminas de vidro (Passos *et al.*, 2000).

Pelo conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder importantes questões, tais como, quantos genes e quais suas intensidades de expressão estão envolvidos num determinado processo biológico. Além disso, reflete o perfil transcricional de milhares de genes em resposta a um estímulo farmacológico ou a uma resposta imune entre outros (Kurella *et al.*, 2001).

As sondas utilizadas nas hibridações com os *microarrays* (sondas de cDNA derivadas das amostras de RNA em estudo) podem ser marcadas com radioatividade (^{33}P) quando utiliza-se como plataforma membranas de nylon ou com fluorocromos (Cy3 e Cy5) quando utiliza-se lâminas de vidro (Figura 6).

Como definiu Jordan (1998), as seqüências de cDNA fixadas no *microarray* são chamadas de alvo e o RNA extraído das células (cDNAs marcados) chamado de sonda. E neste trabalho, seguiremos esta definição, mas sabemos que vários laboratórios definem as seqüências depositadas no *array* como sondas.

Figura 6. Ilustração dos métodos de marcação de sondas complexas de cDNA para *microarrays*. A) Método fluorescente usando Cy3 e Cy5 e lâmina de vidro e B) Método radioativo usando ^{33}P e membranas de náilon. (Extraído e modificado do livro Mutagênese Ambiental: Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003).

O presente trabalho representa um esforço no sentido de esclarecer se a expressão gênica promíscua no timo de uma linhagem isogênica de camundongos, a qual também é autoimune e reproduz o diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1), ou seja, a linhagem NOD, pode ser associada com o fenômeno da autoimunidade.

Hipótese do Trabalho

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

- 1) A linhagem de camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*), que reproduz diabetes melitus do tipo 1, apresenta expressão descontrolada de antígenos relacionados a tecidos (TRAs) em células epiteliais do timo (expressão gênica promíscua) durante a transição do estado pré-autoimune para o estado autoimune .
- 2) A expressão gênica promíscua de TRAs no timo inclui genes de susceptibilidade ao diabetes melitus do tipo 1.
- 3) Dada a preservação das propriedades morfofisiológicas do timo adulto em cultura (ATOC), o fenômeno da expressão gênica promíscua (PGE) também poderá ser reproduzido neste sistema modelo.
- 4) A expressão do gene Aire (*Auto immune regulator*) em células epiteliais do timo poderá ser associada à expressão de um conjunto TRAs.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivo amplo: Comparar a expressão gênica promíscua de TRAs no timo de camundongos NOD (pré-autoimunes vs autoimunes) e avaliar o efeito da inativação do transcrito do gene Aire neste tipo de expressão.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a expressão gênica diferencial de TRAs (expressão gênica promíscua) no estroma do timo da linhagem isogênica NOD (*non obese diabetic*) durante a transição do estado pré-autoimune → autoimune usando a tecnologia dos cDNA *microarrays*.
- 2) Avaliar e comparar os níveis de expressão do gene Aire no estroma do timo de camundongos NOD usando a técnica de RT-PCR.
- 3) Avaliar quais genes têm seu padrão de expressão alterado após a inativação do transcrito do gene Aire usando o sistema de RNA interferente *in vitro* em cultura de timo (ATOC) dos camundongos NOD.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem de camundongos NOD

A linhagem NOD (*Non Obese Diabetic*) foi adquirida junto ao biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP). Os animais foram transferidos para nosso Laboratório no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP em mini isoladores “Alesco” sob condições “SPF” (*Single Patogen Free*) devidamente autoclavados e isentos de impurezas com entrada de ar filtrado, e foram mantidos sob as mesmas condições, incluindo os mini isoladores, em câmara isoladora “Alesco” também com entrada de ar filtrado (filtro de 0,45 μ) e a temperatura constante de 25°C, ciclo de iluminação de 12 horas, com maravalha, água e ração *ad libitum* previamente autoclavadas.

Um preparado polivitamínico suplementar Glicopan pet (Vetnil, São Paulo, Brasil) previamente filtrado e estéril foi fornecido juntamente com a água para compensar as perdas ocorridas durante a autoclavagem da ração.

4.2 Avaliação da glicemia

Para a análise da glicemia foi utilizado o aparelho Accu Check – Active Kit (Roche Diagnóstica Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). A leitura do valor glicêmico é dada por meio da aplicação de uma gota de sangue (2 μ L) no papel reativo o qual é em seguida inserido no leitor óptico. O resultado é expresso em concentração de glicose em mg/dL. Animais cujos valores de glicemia excederam a 250 mg/dL foram considerados diabéticos.

4.3 Definição de controle e teste

O presente trabalho pretende avaliar a modulação da expressão gênica que ocorre durante a transição do estado pré-autoimune → autoimune, ou seja, transição animal sadio → animal diabético. Portanto, foram considerados como controle os animais sadios ou pré-diabéticos que apresentaram índice glicêmico < 250 mg/dL e teste aqueles que apresentaram índice glicêmico $\geq$ 250 mg/dL e desenvolveram, portanto, diabetes (estado autoimune).

4.4 Cultura de timo adulto (ATOC)

Animais da linhagem NOD adultos foram sacrificados por anestesia profunda com éter e os timos foram imediatamente removidos intactos e transferidos para filtros de polycarbonato Millipore 0,45 μ sobre um bloco de “grids” de plástico (Upjohn, Kalamazoo, MI) e mantidos em placas de cultura (24 wells) contendo 2,0 mL de meio Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium HEPES modification (DMEM) e Nutrient Mixture F-10 HAM (HAM F-10) (Sigma-AldrichTM), adicionados de 20% de soro fetal bovino (GIBCO[®]), estreptomicina (100 μ g/mL), penicilina (250 U/mL), gentamicina (10 μ g/mL) e bicarbonato de sódio (1,2 g/L). As culturas ATOC foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera com 5% de CO₂ (Whalen *et al.*, 1999) num período entre 20 a 24 horas de cultura. Posteriormente, foi feita a separação das células tímicas para a obtenção das células epiteliais tímicas (TECs) e em seguida a extração de RNA total. O procedimento foi feito tanto para as amostras controle (pré-autoimunes) quanto para as amostras testes (autoimunes).

4.5 Inibição seletiva do transcrito do gene Aire com RNA interferente (RNAi)

4.5.1 Monitoramento da transfecção e determinação da sequência de RNAi anti-Aire

O ensaio de inibição do transcrito do gene Aire em timos de animais pré-autoimunes em cultura ATOC foi realizado usando o TriFECTaTM - Dicer-Substrate RNAi kit da IDT - Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) com sequências de RNA interferente. O kit inclui três sequências diferentes de RNAi anti-Aire, as quais devem ser previamente testadas buscando a melhor eficiência de inibição do transcrito no modelo de estudo. Além das sequências anti-Aire, outras três sequências estavam incluídas no kit: 1) RNA irrelevante marcado com Cy3 usado para medir a eficiência de transfecção (microscopia de fluorescência confocal), 2) uma sequência duplex de RNAi irrelevante (controle negativo), o qual não é capaz de alterar a expressão gênica nas células em estudo e 3) um controle positivo, constituído de uma sequência de RNAi anti-Hprt (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), um gene constitutivo, utilizada para avaliar se o processo de transfecção e o sistema modelo são adequados para inibição com RNAi.

O método escolhido para a transfecção dos timos em cultura foi o de lipofecção utilizando o Hiperfect Transfection Reagent® da Qiagen (Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

Para se determinar qual o melhor duplex para o inibição do transcrito do gene Aire realizou-se um experimento piloto utilizando as três seqüências anti-Aire e as demais seqüências controle que foram testadas nas concentrações de 10, 50 e 100 nM. Finalmente amostras de cDNA oriundas dos timos tratados com estes RNAs foram submetidas a reações de PCR (método de RT-PCR) para a escolha da melhor seqüência.

As reações de RT-PCR do experimento piloto para a seleção da seqüência de RNAi anti-Aire a ser adotada foram feitas a partir de 2 µg de cada amostra de RNA que foram convertidas a cDNA utilizando a enzima SuperScript II® (Invitrogen). Retirou-se 5 µL do produto da reação e a amplificação foi feita em diluições sucessivas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128) em cada reação de RT-PCR semiquantitativa. Foram usados os seguintes pares de primers nas seqüências sense e antisense respectivamente: Aire (5' CATCCTGGATTTCTGGAGGA 3' e 5' GCTCTTTGAGGCCAGAGTTG 3') e Hprt (5' GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG 3' e 5' CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT 3'). Um volume final de 25 µl de uma reação típica de RT-PCR, contendo 200µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4 a 25°C), 10 µM de cada primer e 2 U de Taq DNA polimerase, foi submetida a ciclagem térmica. Trinta e cinco ciclos foram realizados, cada um com três passos. Para o gene Aire foi desnaturação: 94°C, 30 segundos; anelamento: 57°C, 30 segundos; extensão: 72°C, 30 segundos e para o gene Hprt foi desnaturação: 94°C, 30 segundos; anelamento: 60°C, 30 segundos; extensão: 72°C, 30 segundos. Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5 % em paralelo ao lado de um marcador de peso molecular de 50 pb (Promega, EUA).

Para a determinação da concentração bem como da eficiência da transfecção fez-se uso da microscopia de fluorescência confocal onde a seqüência duplex selecionada foi testada em diferentes concentrações: 10nM, 50nM e 100 nM.

A avaliação da transfecção dos timos utilizando microscopia de fluorescência confocal foi realizada no Departamento de Biologia Celular e

Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob a supervisão do Prof. Dr. Klaus Hartfelder e foi feita após a confecção de lâminas contendo cortes histológicos dos timos transfectados com a seqüência de um RNAi marcada com Cy3.

Os timos foram extraídos e submetidos em cultura ATOC conforme descrito no item 4.5.2 e após 24 horas foram imersos em Tissue Freezing Medium (TBSTM – Triangle Biomedical Sciences) e congelados até serem cortados num criostato (Microtome Cryostat HM 505E) no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - FORP. Os cortes foram feitos com espessura de 20 µm e em seguida as lâminas foram confeccionadas. Posteriormente foram analisados em um *software* (Leica TCS – SP2) de microscopia de fluorescência confocal que por sua vez permitiu uma série de outros cortes longitudinais de menor espessura, tornando possível assim a visualização da fluorescência no tecido e consequentemente a eficiência da transfecção.

4.5.2 Inibição seletiva do transcrito do gene Aire em cultura de timo adulto (ATOC)

A cultura ATOC foi montada numa placa de 24 *wells* contendo 2,0 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium HEPES modification (DMEM) e Nutrient Mixture F-10 HAM (HAM F-10) (Sigma-AldrichTM), adicionados de 20% de soro fetal bovino, estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (250 U/mL), gentamicina (10 µg/mL) e bicarbonato de sódio (1,2 g/L). A placa foi mantida na estufa a 37°C durante a preparação do RNAi. O RNAi foi diluído em 20 µL de meio Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α-MEM) sem soro. Para cada timo em cultura foi feita uma diluição individual. Para a concentração determinada (50nM) foram utilizados 6µL do RNAi escolhido (seqüência 1). Adicionou-se 1 µL de Hiperfect Transfection Reagent ao RNAi diluído e após homogeneização incubou-se a reação por 10 minutos em temperatura ambiente permitindo a formação dos complexos de transfecção RNAi-Lipofectamina. Após a incubação, os complexos foram adicionados ao meio de cultura da placa e a cultura foi mantida a 37°C em estufa com atmosfera com 5% de CO₂ (Whalen *et al.*, 1999) por 24 horas.

Foram utilizados 3 controles: 1) timo sem RNAi contendo apenas o meio de cultura (controle); 2) timo em presença de um RNAi irrelevante (controle

negativo), sem a capacidade de silenciamento; 3) timo em presença de um RNAi anti-Hprt (controle positivo) para monitorar a funcionalidade do experimento de silenciamento. Foram utilizados 3 timos em cada condição controle, bem como para a condição do experimental RNAi anti-Aire.

4.6 Avaliação de apoptose e necrose em ATOC por citometria de fluxo

Os timos removidos dos animais NOD pré-autoimunes após submetidos à cultura *in vitro* ATOC em placas de 24 wells por 24 horas foram transferidos para outra placa contendo 1 mL de colagenase II, 100U/mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium HEPES modification (DMEM) (Sigma-AldrichTM) por 30 minutos. Após esse tempo, os timos foram então macerados em uma rede de nylon com o auxílio de um embolo de seringa, e as suspensões de células foram então quantificadas por meio do aparelho Coulter. A quantidade de 1×10^6 células foi utilizada para o ensaio em cada tubo. Posteriormente as células foram lavadas em 3 mL de PBS 1X, e o botão de células foi obtido após centrifugação a 400xg, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e a seguir foram adicionados 100µL/tubo de tampão de *Annexin Binding Buffer* diluído 1:10 em PBS, e 1µL de cada marcador, anexina V e iodeto de propídeo (PI) provenientes do *ApoScreenTM Annexin V-FITC KIT* (Birmengham, AL35260 USA). As amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi adicionado 50µL de PBS para leitura no citômetro. Foram utilizados 2 timos para cada um dos tempos verificados (0 e 24 horas).

4.7 Separação do estroma tímico

Adaptou-se o protocolo descrito por Gray *et al.* (2002). O procedimento de separação de estroma tímico, o qual é formado pelas células corticais e pelas medulares (TECs) inicia-se após a retirada dos timos recém removidos e em cultura ATOC de animais pré-autoimunes e autoimunes. Nesse protocolo deve-se utilizar um *pool* de timos usando-se de 2 a 3 timos por amostra. O mesmo foi feito para os timos em cultura ATOC no experimento de inibição do transcrito do gene Aire utilizando RNAi. Os timos foram fragmentados em pequenos blocos de 3 mm³ e colocados em um becker contendo 40 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium HEPES modification (DMEM) e Nutrient Mixture F-10 HAM (HAM F-10) (Sigma-AldrichTM). Os fragmentos foram agitados num agitador magnético

por 30 minutos a 4°C. Isto permite que os timócitos se desloquem do estroma migrando para o meio de cultura. Decorridos os 30 minutos, os fragmentos de estroma foram removidos com auxílio de pinça e colocados num tubo Falcon de 15 mL juntamente com 10 mL de EDTA 5 mM. Procurando remover o meio que ainda se encontrava nos tecidos centrifugou-se a 2000xg a temperatura ambiente por 5 minutos. Os fragmentos foram removidos e transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e iniciou-se a extração de RNA total.

4.8 Extração de RNA total

A fim de prevenir da contaminação por ribonucleases durante a extração e manuseio dos RNAs, toda a vidraria, tubos plásticos, espátulas e pinças utilizadas foram previamente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado usando luvas de látex sem talco e descartáveis.

As amostras de RNA total foram extraídas do estroma de timos recém removidos e de culturas ATOC tanto de animais pré-autoimunes quanto de autoimunes bem como as amostras provenientes do experimento de inibição do transcrito do gene Aire. Para tal, utilizou-se o Trizol® Reagent (Invitrogen).

Após a obtenção do estroma tímico, este foi rompido até a separação das células TECs e estas foram suspensas em 200 µL de solução salina 0,9% estéril e em seguida foi adicionado 1 mL de Trizol. O material foi homogeneizado com o auxílio de um micro homogeneizador do tipo Potter e posteriormente com um pipetador procurou-se dissociar os fragmentos do tecido ainda restantes. As amostras foram deixadas em repouso durante 5 minutos a temperatura ambiente promovendo a dissociação nucleoproteica. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguindo-se por agitação em Vórtex durante 15 segundos e posterior repouso por mais 3 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000xg a 4°C, recolhendo-se a fase aquosa sobrenadante e transferindo-a para um novo tubo.

Para a precipitação do RNA total foram adicionados ao sobrenadante 3 volumes de isopropanol gelado e a mistura deixada a -20°C por pelo menos 18 horas.

O RNA total foi coletado por centrifugação a frio (7500xg por 5 minutos) e o precipitado foi lavado duas vezes com 1000 µL de etanol 70 % também a frio. O

excesso de etanol foi removido do precipitado de RNA por evaporação em tubo aberto tomando cuidado para não ressecar as amostras. Finalmente as amostras de RNA foram dissolvidas em 13 μ L de água Milli-Q estéril.

O grau de pureza das preparações de RNA total foi calculado por medidas espectrofotométricas (Genequant – Amersham Pharmacia Biotech) calculando as razões entre as absorbâncias; $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ indicando que a preparação estava livre de proteínas e $A_{220}/A_{260} \sim 0,7$ livre de fenol. A integridade das preparações foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo seguindo protocolo convencional.

4.9 Quantificação de RNA total

O precipitado de RNA total era dissolvido em 13 μ L de água Milli-Q previamente tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato). A solução de RNA era então diluída 100X e submetida a dosagens em espectrofotômetro usando luz ultravioleta (Genequant – Amersham Pharmacia Biotech). As dosagens tiveram como base a seguinte estimativa: 1U de $A_{260} = 40 \mu\text{g RNA/mL}$.

4.10 Avaliação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose

4.10.1 Preparação do gel

A qualidade das preparações de RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose sob condições denaturantes. Um volume total de 35 mL de agarose fundida em água Milli-Q autoclavada (1,5% de agarose) foi misturado a 10 mL de formaldeído 37% e 11 mL de tampão de migração MOPS 5X concentrado (20,6g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionados 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0; volume final ajustado para 1000 mL). O gel foi solidificado em suporte de acrílico que inicialmente foi tratado com NaOH 0,5 M por 10 minutos, assim como a cuba e o pente para a eliminação de RNAase sendo posteriormente lavados com água Milli-Q autoclavada.

4.10.2 Preparação das amostras de RNA

Durante o tempo de solidificação do gel, as amostras de RNA foram desnaturadas na seguinte mistura: 4,5 µL de solução de RNA (2 µg RNA); 2 µL de tampão MOPS 5X; 3,5 µL de formaldeído 37% (Merck, Alemanha) e 10 µL de formamida. A mistura foi então incubada por 15 minutos a 65°C. Após esse tempo, o tubo foi colocado imediatamente no gelo. Adicionou-se 1 µL de brometo de etídeo diluído 1:10 (solução estoque 10mg/mL) e 2 µL de dye loading solution (1/10 do volume). Após eletroforese a 80V durante 90 minutos as bandas de RNAr 28 S, 18 S e 5 S foram visualizadas em transluminador UV e fotografadas com câmera digital.

4.11 Reações de transcrição reversa seguida de PCR (RT- PCR)

Reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 µg de RNA total, 1 µL de oligo (dT) e 1 µL de DNTP mix 10nM em um volume final de 20 µL, segundo instruções do fabricante. As amostras permaneceram a 65°C durante 5 minutos e depois foram colocadas imediatamente no gelo e foi dado um *spin* para que se evitasse a evaporação da amostra após a abertura do tubo. Em seguida, acrescentou-se 4 µL de buffer 5x first-strand, 2 µL de dTT e 1 µL de RNAsin e deixou-se por 2 minutos a 42°C. Adicionou-se 1 µL de enzima Superscript II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) e a reação permaneceu a 42°C por 50 minutos, e depois a 70°C por 15 minutos.

As soluções de cDNAs foram assim diluídas: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256 e misturadas ao mix e a primers específicos de PCR compondo um volume final de 25 µl contendo: 200µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mMTris-HCl (pH 8,4 a 25°C), 10 µM de cada primer e 2 U de Taq DNA polimerase.

As reações de PCR foram realizadas num aparelho Master Cycler Gradiente (Eppendorf) e preparadas em um volume final de 25 µL de uma reação típica de PCR. O protocolo de ciclagem térmica para amplificação foi: 1 x 94°C durante 5 minutos; 30 x : desnaturação a 94°C, 30 segundos; anelamento temperatura de acordo com o primer (Tabela I), 30 segundos; extensão a 72°C, 30 segundos. Após os ciclos as reações permaneceram a 72° por 10 minutos e em seguida por mais 10 minutos a 4°C. A duração do programa foi de 3 horas e

15 minutos. Os primers utilizados foram definidos utilizando-se o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) observando as respectivas localizações em exons diferentes.

As soluções de cDNAs provenientes do experimento de inibição do transcrito do gene Aire foram diluídas (1:1 a 1:2048) e as reações de PCR foram realizadas sob as mesmas condições do experimento descrito no item 5.5.1.

Tabela I. Primers utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento e seqüências sense e antisense.

Gene	Tm	Primer Sense	Primer Antisense
Aire	57°C	5' CATCCTGGATTTCTGGAGGA 3'	5' GCTCTTTGAGGCCAGAGTTG 3'
Actb	60°C	5' ATGGATGACGATATCGCT 3'	5' ATGAGGTAGTCTGTCAGG 3'
CD3e	57°C	5' GATGCGGTGGAACACTTTCT 3'	5' ACTGTCCTCGACTTCCGAGA 3'
Col II	57°C	5' GCCAAGACCTGAAACTCTGC 3'	5' GCCATAGCTGAAGTGGGAAGC 3'
Gad67	61°C	5' TGCAACCTCCTCGAACGCGG 3'	5' CCAGGATCTGCTCCAGAGAC 3'
Ia-2	60°C	5' AGACAGGGCTCCAGATTTTGC 3'	5' GCATGGTCATAGGGTAGGAAG 3'
Ins-1	60°C	5' CAGCCCTTAGTGACCAGC 3'	5' TCTCCAGCTGGTAGAGGG 3'
Ins-2	61°C	5' CAGCCCTAAGTGATCCGC 3'	5' TCTCCAGCTGGTAGAGGG 3'

Para a análise dos produtos gênicos amplificados, uma alíquota de 10 µL da reação de PCR foi misturada com 2 µL de loading buffer e separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo também brometo de etídio. A corrida eletroforética procedeu-se a 80 V durante 90 minutos. Como marcador de pesos moleculares utilizou-se o DNA do fago ØX174 digerido com Hae III. As bandas foram visualizadas por iluminação UV de um transiluminador e o gel fotografado usando uma câmera digital.

4.12 Preparação das lâminas de cDNA *microarrays*

4.12.1 Biblioteca de cDNAs murinos

Nosso laboratório mantém uma biblioteca de cDNA murino (Biblioteca MTB IMAGE), com cerca de 9.000 clones de timo provenientes do “IMAGE Consortium” (<http://image.llnl.gov/>). São clones com seqüências “expressed sequence tags” (EST), cujos tamanhos moleculares variam de 500 a 1.500 pb, e está totalmente caracterizada, cujos clones estão seqüenciados e catalogados. Os clones estão identificados com seus respectivos “accession numbers” (Acc) no GenBank, Clone ID, o nome do gene e a posição de cada clone nas placas de 384 poços em planilhas do programa Excel® Microsoft. Conservamos esta biblioteca em *E. coli* em placas de microtitulação (384 poços) a -80°C (material gentilmente cedido pela Dra. Catherine Nguyen, do INSERM-TAGC ERM 206, Marseille, França).

4.12.2 Amplificação de cDNA para a confecção de *microarrays*

Os clones de *E. coli* da biblioteca de cDNA IMAGE murina, repicados em placas de 384 poços contendo meio de cultura 2X LB + ampicilina foram incubados durante 16 horas, na proporção de 5 µL da cultura original diluídos em 45 µL de meio de cultura 2X LB (volume final em cada poço: 50 µL). A seguir uma alíquota de 8µL da cultura foi transferida para outra placa de 384 poços, contendo 72 µL de água deionizada estéril, e esta placa incubada a 95° C por 10 minutos para lise das células. Após centrifugação a 4000xg por 5 minutos foi retirado 10µL do sobrenadante e adicionado a 40µL de um mix para PCR contendo tampão da reação de PCR (10X), solução de dNTP (2mM), primers com seqüências consenso aos três vetores presentes na biblioteca (10µM), primer LBP 1S (5'TGTGGATTGTGAGCGGATAA3') e primer 1AS (5'GGGTTGAATTAGCGGAACG3'), Taq polimerase (5U/µL) e água deionizada estéril q.s.p 50 µL. O programa para amplificação dos insertos teve como base o descrito por Menossi *et al.*, (2000): 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos (94°C, por 30 segundos; 55°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), seguida por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e 5 minutos a 4 °C. Foi realizada em um aparelho termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), em placas de PCR seladas com adesivo laminado para evitar evaporação.

Cerca de 2 amplificações PCR de cada clone foram realizadas, sempre totalizando 50µL de volume.

A avaliação da qualidade dos produtos amplificados pela PCR foi feita em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídio (10mg/mL) a 80V, durante 15 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transluminador U.V. e fotografados em câmera digital.

4.12.3 Purificação dos produtos de PCR

Para obtenção de uma eficiente fixação dos insertos de cDNA amplificados tanto nas membranas de náilon ou nas lâminas de vidro é necessária a remoção de nucleotídeos não incorporados e primers da reação de PCR (Hegde *et al.*, 2000). Utilizamos a purificação dos produtos de PCR por precipitação com etanol.

Os produtos de PCR (50 µL) foram transferidos para placas de cultivo com fundo em “U” e foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3M pH 4,8 em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, os produtos das duas PCR foram agrupados, totalizando 100 µL, que foram transferidos para esta mesma placa. Após a adição de 100 µL de etanol absoluto, as placas foram incubadas por 16 horas (overnight) a -20°C. Após este tempo, as placas foram centrifugadas a 4000xg por 60 minutos a 2-8°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspense em 100 µL de etanol 70%. As placas foram novamente centrifugadas a 4000xg por 30 minutos a 2-8°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e a placa secou à temperatura ambiente overnight. Após a placa seca, o pellet foi ressuspense em 50 µL de água deionizada autoclavada.

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

As placas foram secas em forno a 42°C e adicionou-se 27 µL de solução de espotagem (DMSO 50% - dimetil sulfoxido) por poço da placa. Em seguida, estas placas foram levadas ao freezer - 20°C e os produtos foram congelados e descongelados por 3 vezes para uma melhor dissolução do DNA concentrado. Posteriormente, os clones foram passados para as placas do robô, e estocadas a 4°C até a deposição dos produtos de PCR em lâminas de vidro.

4.12.4 Confecção das lâminas de *microarrays*

Amostras de produtos de PCR dos clones de cDNA já purificados foram preparadas para deposição em lâminas de vidro adicionando-se mesmo volume (1:1) de reagente D (GE Health Care) e transferidas para microplacas de 384 poços (Genetix). Utilizando um robô *Array Spotter Generation III* (Amersham Biosciences), as amostras foram depositadas por um conjunto de canetas que deposita um volume de 0,9 nL da amostra baseada na ação de capilaridade em superfície de lâminas de vidro (PN UltraGaps 40015 Corning, USA) completando 2 x 4.500 pontos / lâmina (cada lâmina é então composta por 4.500 seqüências de cDNA diferentes depositadas em duplicata perfazendo 9.000 pontos). Após a deposição de cada conjunto de amostras, as canetas são lavadas automaticamente em uma estação de lavagem que utiliza sucessivamente água purificada (18 megohm/cm), etanol absoluto (Merck), solução 0,2 M de KOH e água novamente. As canetas foram secas com nitrogênio 5.0 analítico antes das próximas amostras serem carregadas. A câmara de deposição das amostras em lâminas do robô *Array Spotter Generation III* possui temperatura e umidade controladas. A umidade relativa de deposição das amostras deve estar em torno de 55% e a temperatura em torno de 25°C. Além disso, a sala em que se encontra o robô é mantida com ar limpo (sala limpa classe 10.000).

Após a deposição e secagem de todas as amostras nas lâminas, o DNA foi fixado por *cross-linking* por meio de irradiação ultravioleta a 500 mJ de energia (Hoefer UV Crosslinker).

4.12.5 Delineamento das hibridações em *microarrays*

Uma escolha chave em um projeto que envolve a tecnologia de microarray é utilizar comparações que podem ser diretas ou indiretas, isto é, estabelecer comparações dentro ou entre as lâminas. Existem três principais tipos de delineamento: 1) inversão de corantes (dye-swap), 2) experimentos em volta (looping) e 3) RNA de referência (Figura 7). Mas, não existe um delineamento experimental ideal para todas as situações, ou seja, diferentes desenhos experimentais são necessários para contextos experimentais diferentes. Qualquer que seja o tipo de desenho utilizado será requerido o mesmo número de hibridações, e a decisão sobre o tipo de delineamento deve considerar a pergunta do trabalho.

Figura 7. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para *microarrays*. A, B e C- amostras controle; A', B' e C'- amostras teste; R – pool de RNA de referência.

O *pool* de RNA é a amostra de referência mais utilizada atualmente. Nos experimentos com *microarrays* do presente trabalho adotou-se a estratégia do RNA de referência ao invés do *dye-swap*, pois para realizar os experimentos com troca de corantes seria necessário marcar a mesma amostra de RNA com os dois corantes (Cy3 e Cy5). Porém, tal abordagem passa a ser inviável, pois a quantidade de RNA seria insuficiente para a repetição das hibridações.

O *pool* de RNA de referência neste caso foi uma mistura “equimolar” de RNA total de timos de camundongos C57BL/6 adultos cujas amostras foram extraídas exatamente nas mesmas condições das experimentais.

O uso de RNA de referência passou a ser uma abordagem bastante adequada eliminando assim a necessidade de repetir as marcações de uma mesma amostra com dois corantes (*dye-swap*) e, conseqüentemente evitando as diferenças de incorporação. As amostras de timo de NOD foram marcadas com o corante Cy3 e um RNA de referência (timo de C57BL/6) com Cy5.

As hibridações com cDNAs oriundos de RNA referência são importantes para os cálculos de normalização, pois reflete a estimativa da quantidade de material depositado em cada ponto do *microarray* (alvo).

4.12.6 Marcação de sondas de cDNA com o fluorocromo Cy3/Cy5

Amostras de RNA (cDNA) foram marcadas utilizando o Kit Cyscribe Post- Labelling (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) segundo as instruções do fabricante. As reações envolvem a preparação do cDNA em dois passos. No primeiro passo ocorre a síntese da primeira fita de cDNA com a incorporação de nucleotídeos amino-alil dUTP modificados, com posterior degradação da cadeia de RNAm e purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres e oligômeros (Figura 8). No segundo passo, o cDNA é marcado com formas reativas de ésteres NHS Cy3 que se ligam aos nucleotídeos modificados e após um processo de purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX para eliminação de Cy3 Dye não incorporado as sondas estão prontas para hibridação (Figura 9).

Figura 8. Preparação da fita simples de cDNA incorporada com amino alil usando os reagentes do kit “CyScribe Post Labelling” (GE Healthcare) (Extraído e modificado do manual de instruções do kit).

Figura 9. Preparação do cDNA marcado com CyDye utilizando os reagentes do kit “CyScribe Post Labelling” (GE Healthcare) (Extraído e modificado do manual de instruções do kit).

Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP

Em um tubo Eppendorf de 1,5 μ L imerso em gelo picado foram adicionados 10 μ g de RNA total, 1 μ L de primers randômicos, 3 μ L de oligo (dT) e 0,5 μ L de controle denominado “spike mix” para o Universal ScoreCard em um volume total de 11 μ L (Proporção de 2 μ L de spike mix para cada 1 μ g de RNA marcado). A reação foi cuidadosamente montada e incubada a 70°C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada a 4°C durante 5 minutos. A extensão da cadeia de cDNA foi realizada utilizando 4 μ L de tampão 5X CyScript, 2 μ L de DDT 0,1 M, 1 μ L de nucleotídeo “mix”, 1 μ L de AA-dUTP (a quantidade de um tubo contendo AA-dUTP liofilizado foi ressuspenso em 30 μ L de água livre de nucleases e mantido a -20°C por no máximo 30 dias), 1 μ L de transcriptase reversa CyScript, em um volume final de reação de 20 μ L. A reação foi incubada a 42°C por 90 minutos. Procedemos à degradação do RNAm adicionando 2 μ L de NaOH 2.5 M com incubação a 37°C durante 15 minutos, posteriormente foi adicionado 20 μ L de HEPES 2M.

a) Purificação do cDNA com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 μ L foram adicionados 500 μ L de solução “capture buffer” em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com aminoalil não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600 μ L de etanol 80%. A centrifugação foi feita a 13800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13800xg por 10 segundos para retirada do excesso de etanol 80% da amostra. O tubo coletor foi descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 μ L. Foi adicionada a coluna 60 μ L de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13800xg por 1 minuto.

b) Incorporação de Cy3 e Cy5

A amostra de cDNA marcada com aminoalil purificado foi adicionada a um tubo com a alíquota de CyDye NHS éster e ressuspensa várias vezes. O material foi centrifugado a 13800xg por 1 minuto e incubado, no escuro, durante 1 hora. Posteriormente, foi adicionado 15 µL de hidroxilamina 4M seguida de incubação no escuro, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

c) Purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 µL foram adicionados 500 µL de solução “capture buffer” em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com CyDye não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600 µL da solução “wash buffer”. A centrifugação foi feita a 13800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13800xg por 10 segundos para retirada do excesso da solução “wash buffer” da amostra. O tubo coletor foi descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 µL. Foi adicionado a coluna 60 µL da solução “elution buffer” pré-aquecido à 65°C e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13800xg por 1 minuto.

d) Quantificação do CyDye incorporado no cDNA

Após a purificação foi feita a monitoração de incorporação dos fluorocromos por meio de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 2100, GE Healthcare Bio-Sciences) em comprimento de onda a 550 nm para Cy3 e 650 nm para o Cy5 usando cubetas de quartzo e amostras diluídas 100X.

Para hibridações com os dois fluorocromos foram adicionados os cDNA marcado com Cy3 e Cy5 em um tubo de microcentrífuga protegido da luz. A solução de cDNA foi evaporada em um aparelho “Speed Vacuum”. A seguir o cDNA foi dissolvido em 6 µL de água livre de nuclease e denaturado a 95°C por 2

minutos. A solução foi imediatamente resfriada no gelo por 30 segundos. A essa reação adicionou-se 1,5 µL de A₈₀ (1mg/mL) e incubou-se a 75 °C por 45 minutos, estando assim pronta para o processo de hibridação.

4.12.7 Hibridação das sondas de cDNA com os microarrays

As lâminas de *microarrays* foram hibridadas utilizando um processador automático de lâminas, *Lucidea Automated Slide Processor* – ASP (Amersham Biosciences) que permite a hibridação e lavagens de lâminas em câmaras independentemente controladas (12 lâminas por vez). Este aparelho inclui um software que automatiza a injeção de amostras líquidas e soluções de lavagens ou ar dentro das câmaras e possui parâmetros de controle de temperatura e velocidade de injeção e circulação destas soluções no interior das mesmas.

As sondas de cDNA marcadas com Cy3 e Cy5 foram hibridadas por 15 horas a 42°C. As condições de lavagens foram: 1XSSC/0,2%SDS (2 x 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC/0,2% SDS (2 x 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC (2 x 20 segundos à temperatura ambiente). A última lavagem das lâminas foi feita com isopropanol, sendo em seguida aquecidas a 42°C, e novamente lavadas com isopropanol. Após as lavagens as lâminas foram aquecidas a 60°C para secagem e posteriormente foram colocadas no *Array Scanner* (GE Helathcare Bio-Sciences) para obtenção das imagens.

4.13 Aquisição de imagens de *microarrays*

As lâminas foram colocadas no aparelho *Array Scanner* (GE Helathcare Bio-Sciences) e as imagens obtidas tiveram como parâmetros de leitura para as duas cores, o comprimento de onda de excitação do laser de 532 nm para o verde e 633 nm para o vermelho para cada *spot*. A leitura da lâmina gera dois arquivos com imagens separadas para os dois canais de cores (Cy3 e Cy5) e uma terceira imagem sobrepondo Cy3 e Cy5 visualizadas usando o software *ImageQuant* (GE Healthcare Bio-Sciences) (Figura 38 – Anexo I).

4.14 Quantificação e normalização dos dados de *microarrays*

As intensidades das imagens de hibridação dos arrays foram transformadas em valores numéricos por meio do programa Spotfinder (<http://www.tigr.org/software>) que também analisa a qualidade de pontos e calcula o background. O programa se baseia na sobreposição de grades que delimitam os spots gerados pela aquisição das imagens das lâminas, tornando possível a quantificação do sinal emitido. Permite ainda a geração de arquivos de extensão .TAV que serão utilizados durante a normalização dos dados. Dois parâmetros foram considerados para o controle de qualidade neste programa: os pontos de boa qualidade apresentam valores superiores e/ou igual a 1 valor background mais 1 valor desvio padrão.

Em seguida, os dados foram normalizados. A normalização dos dados retira os erros experimentais sistemáticos por balancear a intensidade dos dois fluorocromos. Esses erros podem ocorrer devido à diferença de incorporação dos corantes, problemas durante a deposição dos clones na lâmina ou ainda durante a aquisição das imagens nos dois canais. Para esses ajustes foi utilizada a plataforma R (www.r-project.org) juntamente com o pacote AROMA (<http://www.maths.lth.se/help/R/aroma/>), que retém as funções necessárias à normalização dos dados de microarrays. Portanto, após a retirada do background pelo programa Spotfinder, os dados foram importados para o ambiente R e transformados para o formato de dados “M versus A”, onde M é igual a $\log_2(R/G)$ e A é igual a $1/2 \cdot \log_2(R \cdot G)$. Em seguida, os métodos de normalização “print-tip Lowess” e “absolute median deviation (MAD) re-scaling” foram aplicados respectivamente. O primeiro método aplica uma regressão linear nos dados, para corrigir erros espaciais que possam ter sido gerados durante os experimentos. O segundo re-escala as razões de log para cada microarray, de maneira que cada slide adquira a mesma distribuição dos dados, de acordo com a MAD, capaz de estimar com robustez a variância de uma amostra.

Utilizando o pacote LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (Smyth *et al.*, 2005) foi aplicado o método Bayesiano empírico para análise estatística da expressão diferencial.

A plataforma R irá gerar arquivos de extensão .MEV que serão utilizados no programa TIGR MEV (The Institute for Genomic Research MultiExperiment Viewer - <http://www.tm4.org/mev.html>) que inclui o programa SAM (Significance

Analysis of Microarrays) (Tusher *et al.*, 2001) utilizado para a detecção dos genes diferencialmente expressos (Smyth, 2004). O programa TIGR MEV gera um *heat map* para os valores. O *heat map* é composto por um código de cores a fim de facilitar a associação visual dos níveis de expressão gênica.

O programa SAM representa uma evolução dos *softwares* de análise estatística para a tecnologia de *microarrays* e encontra-se disponível no endereço (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>). A análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, que são adaptados para a detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. Na figura 10, observamos o *pipeline* desenvolvido para análise dos dados.

Figura 10. Pipeline utilizado na análise de dados de *microarrays* em lâminas de vidro.

A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações, como por exemplo, pool de órgãos (X_c) e o timo (X_p), e o desvio padrão de cada gene, calculados a partir de repetição experimental. A diferença relativa $d(i)$ na expressão gênica é então definida pela equação 1:

EQUAÇÃO 1

$$d(i) = \frac{X_p(i) - X_c(i)}{S(i) + S_0}$$

$\left\{ \begin{array}{l} d(i) = \text{diferença relativa} \\ X_p(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes no timo} \\ X_c(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes no pool de órgãos} \\ S(i) = \text{desvio padrão de medidas repetidas de expressão} \\ S_0 = \text{constante positiva} \end{array} \right.$

Onde $X_p(i)$ e $X_c(i)$ são definidos como níveis médios da expressão do gene nos estados p (timo) e c (pool de órgãos), respectivamente. A dispersão gene-específica $S(i)$ é o desvio padrão de medidas repetidas de expressão, e a constante positiva S_0 no denominador da equação acima, servem para certificação de que a variância de $d(i)$ é independente da expressão gênica. Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão, utilizou-se um gráfico de dispersão $d(i)$, em relação à diferença relativa esperada $d_E(i)$. Para uma grande maioria de genes $d(i) \cong d_E(i)$, mas alguns genes são representados por pontos distantes da linha $d(i) \cong d_E(i)$. As alterações das expressões dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar (Δ) é então considerado significativo (Figura 11).

O limiar (Δ) determina dois cortes horizontais, ou seja, o menor valor de $d(i)$ indica que o gene seja considerado significativamente induzido (hiperexpresso), e o valor menos negativo de $d(i)$ indica que o gene está significativamente reprimido (hipoexpresso).

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Freqüência de Descobertas Falsas (FDR), um método inicialmente idealizado por Benjamini & Hochberg (1995) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças

significativas estão intimamente relacionados com o limiar Δ . À medida que o valor de Δ diminui, o número de genes significativamente alterados aumenta à custa de um aumento de um FDR. Essa determinação do nível de significância pelo limiar providencia cortes assimétricos para genes induzidos e genes reprimidos. Essa assimetria é desejável, posto que os genes induzidos e genes reprimidos podem se comportar de maneira diferente em alguns experimentos. Ao utilizar o SAM, o usuário pode escolher o limiar Δ mais conveniente com base no nível de significância estimado pelo FDR e no número de genes com os quais se pretende trabalhar.

O programa estabelece, de forma automática, uma ligação entre o número de acesso das seqüências utilizadas com as páginas de informações sobre o clone em questão, situados no banco de dados S.O.U.R.C.E. (Stanford Online Universal Resource for Clones and ESTs) que compila informações de vários bancos de dados públicos (UniGene, dbEST, Swiss-Prot, GeneMap99, RHdb, GeneCards e LocusLink) (<http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>).

Figura 11. Ilustração da análise da significância estatística dos genes modulados (induzidos e reprimidos) usando o programa SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Comparação entre a distância relativa observada $d(i)$ e esperada $dE(i)$.

O programa SAM permite ainda o agrupamento hierárquico, porém, o mais importante na elaboração deste agrupamento é a decisão sobre qual medida de similaridade será adotada, a necessidade de se transformar a escala dos valores de expressão (normalmente transformada em escala logarítmica) e a dependência dos genes entre si. O agrupamento hierárquico nos permite a definição de grupos de genes com o mesmo padrão de expressão, seja ele de indução ou de repressão.

Todas as informações citadas acima foram retiradas do trabalho de Tusher *et al.* (2001), do manual do software SAM e de relatórios técnicos publicados na página de Robert Tibshirani (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>).

4.15 Nomenclatura dos genes

Neste trabalho, optou-se por seguir a nomenclatura usual para genes de camundongos, ou seja, o símbolo do gene em inglês com a primeira letra maiúscula e as seguintes minúsculas (exemplo: Aire para **A**utoimmune **r**egulator). Os nomes dos genes estão em inglês, pois toda a literatura e os bancos de dados internacionais como Source, GenBank *etc.* estão neste idioma. Além disso, todos os arquivos da biblioteca de cDNA estão em inglês.

4.16 Análise da expressão gênica promíscua no timo

Os agrupamentos gênicos gerados durante o processamento dos dados no programa TIGR MEV foram analisados em termos de Expressão Gênica Promíscua (PGE) para avaliar a representatividade dos órgãos e sistemas. A análise foi feita utilizando o banco de dados GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) que permite a visualização da expressividade de cada gene em um gráfico de barras paralelas que apresenta 60 tecidos, que representam por sua vez 17 sistemas do organismo. Visando a homogeneização dos dados optou-se por considerar como tecidos representados por um determinado gene, apenas aqueles tecidos que obtiveram expressividade superior à linha da mediana que se encontra presente em cada gráfico. Após a organização dos dados em sistemas, gerou-se uma planilha contendo o número de genes que caracterizavam cada sistema em particular e, posteriormente, gerou-se um gráfico que passou a demonstrar a representatividade de cada sistema nos agrupamentos definidos. Procurou-se ainda destacar a

representatividade dos genes no pâncreas em relação às demais glândulas e ressaltar os genes que foram mais expressos nesse órgão seja na condição de induzido ou reprimido no agrupamento em questão.

4.17 Análise das regiões cromossômicas de susceptibilidade ao DM-1

Após serem analisados em termos de expressão gênica promíscua (PGE) utilizando o banco de dados GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>), os genes encontrados em todos os agrupamentos foram submetidos a uma análise em relação à localização cromossômica. O intuito foi procurar estabelecer uma relação direta entre a localização destes e de genes estabelecidos como de susceptibilidade ao diabetes tipo 1(DM-1).

Inicialmente foi feito uma busca no banco de dados do MGI *Mouse Genome Informatics* (<http://www.informatics.jax.org>) para a descoberta dos genes *idds* (diabetes dependente de insulina) relacionados ao diabetes tipo 1 já descritos e mapeados. Considerou-se apenas aqueles cuja nomenclatura obedecia ao seguinte critério: *insulin dependent diabetes susceptibility (idds)*. Cada gene relacionado oferece um ideograma (Figura 12) capaz de informar a região cromossômica em que ele se encontra.

Figura 12. Ideograma representativo da *idd10* e os genes que se encontram nesta região. (cromossomo 3 na região E3)(Extraído e modificado do NCBI Map Viewer - [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=10090&chr=3&MAPS=assembly,genes,mgir&cmd=focus&fill=40&query=uid\(9560452\)&QSTR=110712%5Bgene%5Fid%5D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=10090&chr=3&MAPS=assembly,genes,mgir&cmd=focus&fill=40&query=uid(9560452)&QSTR=110712%5Bgene%5Fid%5D)).

Repertoriando todas as regiões idds, fizemos a localização dos genes promíscuos de TRAs.

O banco de dados MGI fornece ainda uma lista de genes relacionados à patogenia do DM-1 tanto em camundongos quanto em humanos. Da mesma forma, procurou-se saber se os genes promíscuos de TRAs estão inclusos neste conjunto.

Delineamento Experimental

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD

Durante o andamento deste trabalho adequamos a manutenção dos camundongos NOD em condições SPF (*single pathogen free*) em nosso próprio laboratório, o que possibilitou o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) entre os camundongos provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP).

Foram adquiridos camundongos fêmeas NOD com idade média de 2 meses. A glicemia destes animais foi analisada periodicamente o que possibilitou separá-los em 2 grupos distintos, ou seja, o dos pré-autoimunes (com idade $\leq 4,5$ meses) e os autoimunes com idade $> 4,5$ meses de idade. A figura 13 mostra a frequência do surgimento de animais autoimunes (diabéticos) nos dois grupos com idades distintas.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados animais autoimunes com idade máxima de 5,5 meses, quando então eram sacrificados para remoção do timo. A frequência de surgimento de DM-1 observada foi de aproximadamente 30%. Possivelmente, se esses animais fossem observados por mais tempo, a frequência de DM-1 poderia ser ainda maior. Mas como ocorre involução tímica com a idade dos camundongos havendo substituição do estroma por tecido adiposo (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2005), não pudemos estudar animais com mais de 5,5 meses de idade.

Figura 13. Frequência de camundongos NOD (fêmeas) pré-autoimunes e autoimunes segundo a idade em meses.

6.2 Avaliação da integridade das amostras de RNA

As amostras de RNA total obtidas a partir de estroma tímico, recém removidos e em cultura ATOC, depletado de timócitos dos camundongos NOD e de camundongos C57BL/6 para o *pool* de referência, foram analisadas em relação a sua integridade por eletroforese em gel de agarose 1,5% denaturante. É possível observar pela figura 14 a presença de bandas de RNAs ribossômicos 28 S e 18 S e tRNA + RNA 5S, comprovando assim a boa qualidade das amostras em termos de integridade.

Figura 14. Integridade das amostras de RNA total avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% denaturante. A) Estroma de timos recém removidos; B) Estroma de timos em cultura ATOC; C) Estroma tímico em cultura ATOC transfectados com RNA interferente anti-Aire; D) Estroma de timos de C57BL/6 para o *pool* de referência.

6.3 Avaliação da expressão do gene Aire e de TRAs no estroma tímico

Após a obtenção de cDNA provenientes das amostras do estroma tímico dos camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes, de timo recém removidos e em cultura ATOC, foram realizados experimentos de PCR para avaliação do gene Aire, cujo RNAm foi alvo do tratamento utilizando-se a técnica de RNA interferente; o gene Cd3e (antígeno Cd3 cadeia epsilon) foi usado para a verificação da contaminação de timócitos nas amostras; genes descritos na literatura considerados TRAs como: Gad67 (Ácido glutâmico descarboxilase 1), Ia-2 (proteína tirosina fosfatase associada ao insulinoma), Ins-1 (Insulina I) e Ins-2 (Insulina II) também foram avaliados, além do pró-colágeno II (Col II) e do gene Actb (Beta - actina) usado como controle (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Avaliação da expressão dos genes Actb, Cd3e, Aire e Col II. A) Estroma de timo recém removido de NOD pré-autoimune; B) Estroma de timo recém removido de NOD autoimune; C) Estroma de timo em ATOC de NOD pré-autoimune; D) Estroma de timo em ATOC de NOD autoimune; E) Timócitos (Resultado típico); C+ = Controle Positivo; C - = Controle Negativo.

Figura 16. Avaliação da expressão dos genes Gad67, Ia-2, Ins-1 e Ins-2. A) Estroma de timo recém removido de NOD pré-autoimune; B) Estroma de timo recém removido de NOD autoimune; C) Estroma de em ATOC de NOD pré-autoimune; D) Estroma de timo em ATOC de NOD autoimune; C+ = Controle Positivo; C - = Controle Negativo.

6.4 Avaliação de apoptose e necrose em ATOC

Para o ensaio de apoptose e necrose, com o objetivo de analisar a viabilidade celular em ATOC nos animais NOD pré-autoimunes foram realizados ensaios de anexina V e PI. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo, sendo utilizado o timo nos tempos: 0 e 24 horas (Figura 17).

Figura 17. Autofluorescência das células de timo total de camundongos NOD e marcação de Anexina V para ensaio de apoptose, e PI para necrose, nos tempos 0 e 24 horas.

6.5 Determinação da seqüência e concentração de RNAi anti-Aire para ensaio em ATOC

Para realização dos ensaios de RNAi anti-Aire e determinação da seqüência que melhor promoveu a inibição do transcrito deste gene, utilizou-se uma linhagem de células mTECs, de camundongos C57BL/6, que possibilitou a escolha da seqüência de forma rápida e eficiente. O resultado da inibição foi mensurado por meio de RT-PCR semiquantitativa nas concentrações de 2.5, 5 e 10nM, recomendada pelo kit para ensaio com células em cultura (Figura 18), sendo possível determinar a seqüência 1 (Figura 19) como aquela que obteve o maior grau de inibição do transcrito do gene Aire e, portanto, escolhida para os passos posteriores.

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose de produtos de RT-PCR semiquantitativa para a detecção do transcrito do gene Aire. PCRs realizadas com as seguintes amostras: mTEC na ausência de RNA interferente e mTEC em presença das três diferentes seqüências de RNAi anti-Aire, cada uma em três concentrações (2.5, 5.0 e 10.0 nM). * RNAi e concentração escolhidos para a continuação dos experimentos. B = Controle negativo

Figura 19. Seqüência 1 do RNAi anti-Aire, utilizada nos experimentos de inibição do transcrito do gene Aire em timos de camundongos NOD pré-autoimunes em cultura ATOC.

Uma vez definida a melhor sequência, determinou-se a concentração ideal de RNAi anti-Aire para a inibição do transcrito deste gene no timo em cultura ATOC. As concentrações utilizadas na cultura foram maiores por se tratar de uma transfecção em órgão e não em células em cultura.

Utilizando a microscopia de fluorescência confocal determinou-se a concentração que apresentou um melhor resultado na transfecção sendo escolhida aquela que apresentou maior fluorescência e consequentemente uma melhor transfecção. O melhor resultado foi a de concentração igual a 50nM (Figura 20).

Figura 20. Avaliação da transfecção dos timos em cultura com RNAi-Cy3. A) 10nM; B) 50nM; C) 100nM. (microscopia de fluorescência confocal aumento 40X).

6.6 Análise da inibição do transcrito do gene Aire utilizando RNA interferente

Após determinação da sequência e da concentração adequadas, a inibição do transcrito do gene Aire em cultura de timo adulto (ATOC) foi realizada e as soluções de cDNAs das amostras: controle, controle negativo, controle positivo e do RNAi anti-Aire, foram submetidas a reações de PCR em diluições de 1:1 a 1: 2048. A partir de uma determinada diluição a amostra tratada com um RNA interferente para o gene Aire não apresenta mais expressão detectável para o gene em questão (Figura 21). Partindo-se desse dado, considerou-se a inibição do transcrito do gene Aire e deu-se sequência à análise do fenômeno de PGE utilizando-se na tecnologia de *microarrays*.

Figura 21. Avaliação da expressão do gene Aire em amostras de estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes em cultura ATOC de 24horas com RNAi na concentração de 50nM; Controle = (meio MEM na ausência de RNAi); C- = controle negativo (MEM + RNAi irrelevante); C + = controle positivo (MEM + RNAi anti-Hprt).

6.7 Análise dos genes diferencialmente expressos por agrupamento hierárquico e da significância estatística do padrão de expressão

Os 4500 valores numéricos quantitativos já normalizados, representando o conjunto de genes analisados de cada uma das variáveis foram submetidos ao programa SAM *multiclass*. Esse tipo de análise apontou seqüências diferencialmente expressas segundo um valor de exclusão. A partir do qual os genes são considerados induzidos. Além disso, o programa SAM fornece um FDR (Frequência de Descobertas Falsas) que nos orienta na escolha de seqüências com valores de expressão com alta significância estatística.

A comparação entre o estroma de timos recém removidos de camundongos NOD de animais pré-autoimunes com animais autoimunes, utilizando-se um $FDR \leq 20\%$, proporcionou 109 genes diferencialmente expressos (Tabela II – Anexo II) sendo que destes, 38 genes encontram-se induzidos (roxo) e 71 genes reprimidos (amarelo) nos animais pré-autoimunes (Figura 22).

Por outro lado, a comparação entre o estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD de animais pré-autoimunes com animais autoimunes, utilizando-se um $FDR \leq 20\%$, proporcionou 89 genes diferencialmente expressos (Tabela III – Anexo II) sendo que destes, 8 genes encontram-se induzidos (laranja) e 81 genes reprimidos (azul) nos animais pré-autoimunes (Figura 23).

Para um melhor entendimento do que ocorre com a expressão gênica do estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes, em presença de um RNA interferente para o transcrito do gene Aire em cultura ATOC, foram estabelecidos três estudos comparativos. No primeiro deles, comparou-se o estroma das seguintes amostras: Controle, RNAi Aire e RNAi controle com um $FDR \leq 20\%$ que proporcionou 360 genes diferencialmente expressos. Cinco agrupamentos evidentes puderam ser destacados: 1) genes reprimidos para o RNAi controle; 2) genes induzidos para o mesmo RNAi; 3) genes induzidos para o RNAi Aire; 4) genes reprimidos para o RNAi Aire e 5) genes induzidos para o controle (Figura 24).

Procurando evidenciar o efeito da inibição do transcrito do gene Aire, somente os genes diferencialmente expressos para o RNAi Aire foram considerados, portanto, foram encontrados 34 genes induzidos (amarelo) e 88 genes reprimidos (azul) (Tabela IV – Anexo II).

A segunda análise comparativa foi feita entre as amostras controle e RNAi Aire (Figura 25). Adotando-se um $FDR \leq 20\%$, 53 genes diferencialmente expressos foram encontrados sendo 23 genes induzidos (azul) e 30 reprimidos (amarelo) no RNAi Aire (Tabela V – Anexo II)..

A terceira análise comparativa foi feita entre as amostras RNAi controle e RNAi Aire (Figura 26). Com um $FDR \leq 20\%$ foi possível encontrar 370 genes diferencialmente expressos sendo 174 genes induzidos e 196 reprimidos para o RNAi Aire (Tabela VI – Anexo II).

Figura 22. Comparação dos perfis de expressão gênica entre camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes. Matriz de expressão de 109 seqüências gênicas (provenientes da estatística SAM) de estroma de timos recém removidos de animais controles e testes. O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, o preto ausência de modulação e o cinza ausência de valores. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão.

Figura 23. Comparação dos perfis de expressão gênica entre camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes. Matriz de expressão de 89 sequências gênicas (provenientes da estatística SAM) de estroma de timos em cultura ATOC de animais controles e testes. O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, o preto ausência de modulação e o cinza ausência de valores. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão.

Figura 24. Comparação dos perfis de expressão gênica de culturas ATOC contendo RNAi Aire em timos de camundongos NOD pré-autoimunes. Matriz de expressão de 360 sequências gênicas (provenientes da estatística SAM) de estroma tímico, de timos tratados com RNAi Aire, RNAi controle e não tratados (controle). O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, o preto ausência de modulação e o cinza ausência de valores. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão.

Figura 25. Comparação dos perfis de expressão gênica de culturas ATOC contendo RNAi Aire em timos de camundongos NOD pré-autoimunes. Matriz de expressão de 53 sequências gênicas (provenientes da estatística SAM) de estroma tímico, de timos tratados com RNAi Aire e não tratados (controle). O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, o preto ausência de modulação e o cinza ausência de valores. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão.

Figura 26. Comparação dos perfis de expressão gênica de culturas ATOC contendo RNAi Aire em timos de camundongos NOD pré-autoimunes. Matriz de expressão de 370 sequências gênicas (provenientes da estatística SAM) de estroma tímico, de timos tratados com RNAi Aire e tratados com RNAi controle. O vermelho indica indução da expressão, o verde repressão, o preto ausência de modulação e o cinza ausência de valores. Cores mais claras representam maior intensidade na alteração da expressão.

6.8 Determinação da expressão gênica promísqua (PGE) no timo

A PGE foi analisada a partir dos genes diferencialmente expressos obtidos pelo programa SAM e pelos agrupamentos hierárquicos gerados. Foi feita então uma consulta para cada um dos genes no banco de dados GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) que indica a representatividade do gene consultado em mais de 60 tecidos e/ou órgãos do camundongo (Figura 27) os quais foram finalmente agrupados em 17 sistemas.

Figura 27. Gráfico ilustrativo gerado pelo banco de dados GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) mostrando a representação tecidual do gene Rab3d, com os nomes de cada tecido e/ou órgão.

As informações de cada gene possibilitaram a construção de gráficos de setores mostrando as porcentagens de representação dos 17 sistemas diferentes no timo pelas células do estroma tímico em todas as análises realizadas (Figuras 28 a 32).

Figura 28. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes. Os genes significativamente expressos dos 4500 analisados foram anotados caracterizando a expressão promíscua, representando os antígenos relacionados a tecido. A) Genes induzidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes; B) Genes reprimidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes

Figura 29. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes. Os genes significativamente expressos dos 4500 analisados foram anotados caracterizando a expressão promíscua, representando os antígenos relacionados a tecido. A) Genes induzidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes; B) Genes reprimidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes

Figura 30. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire, RNAi controle e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes. Os genes significativamente expressos dos 4500 analisados foram anotados caracterizando a expressão promíscua, representando os antígenos relacionados a tecido. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Figura 31. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes. Os genes significativamente expressos dos 4500 analisados foram anotados caracterizando a expressão promíscua, representando os antígenos relacionados a tecido. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Figura 32. Representação da expressão gênica específica de tecidos em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e tratados com RNAi controle de camundongos NOD pré-autoimunes. Os genes significativamente expressos dos 4500 analisados foram anotados caracterizando a expressão promíscua, representando os antígenos relacionados a tecido. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Levando-se em consideração que os camundongos NOD são o modelo animal de estudo do diabetes tipo 1, procurou-se destacar a representatividade dos genes de PGE no pâncreas em relação às demais glândulas e ressaltar os genes que foram mais expressos nesse órgão seja na condição de induzido ou reprimido no agrupamento em questão. Uma nova série de gráficos de setores foi gerada a partir de genes expressos somente em glândulas na qual se encaixa o principal órgão afetado e relacionado à patogenia da doença (Figuras 33 a 37).

Figura 33. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes caracterizando a expressão promíscua. A) Genes induzidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes; B) Genes reprimidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes

Figura 34. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes caracterizando a expressão promíscua. A) Genes induzidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes; B) Genes reprimidos no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes

Figura 35. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire, RNAi controle e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes caracterizando a expressão promíscua. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Figura 36. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e não tratados (controle) de camundongos NOD pré-autoimunes caracterizando a expressão promíscua. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Figura 37. Representação da expressão gênica de antígenos relacionados a tecidos para glândulas/pâncreas em timos em cultura ATOC tratados com RNAi Aire e tratados com RNAi controle de camundongos NOD pré-autoimunes caracterizando a expressão promíscua. A) Genes induzidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire; B) Genes reprimidos no estroma tímico tratado com RNAi Aire.

Dentre os genes de PGE que são expressos em glândulas procurou-se destacar aqueles que tiveram sua expressão sobressaída no pâncreas nas análises realizadas. Os dados encontram-se na tabela VII.

Tabela VII. Genes que codificam antígenos específicos de pâncreas em timo de camundongos NOD.

Análise	Genes
Timos recém removidos	Induzidos: Clec1b, Xcl1, Prdm10, Rpl21, Rfxap, Phc3 e Ankrd40
	Reprimidos: C330006K01Rik, 1300012G16Rik, Suz12, Arpp21, Afrmid, Sypl, Tcea3, Pdia4, Irf8, Slc7a11, Nebl, Stx18, Shmt1, P2rx1, Nsd1, Tssk4, Bclaf1, Igf1r e Plxnd1
Timos em cultura ATOC	Induzidos: CXCL10, IL12A e CD209
	Reprimidos: Nsd1, BRCA1, ATM, Prdx6, FANCC, IRF5, Gzma, Cd8a, Rpl18a, Smc4, Cyb561d2, Nf2, ITGA5, Elk4, Ubxd1, Etv3, Fcna, Tssc1, Cxcl4, Tcea3, SLC11A1, Tll4, Rac2, C3, Ddx51 e Gnpda2
Controle X RNAi controle X RNAi Aire	Induzidos: Cebpg, Sema4d, Ctf1, D2Erd750e, Abca5, Fbxl11, Sh3yl1, Alg9, 2610318N02Rik, Trim17, Es2el e Ankrd16
	Reprimidos: 5730494M16Rik, Tcrg-C, Ifit1, 1110018J18Rik, Rrp1b, 2010003O18Rik, Glb1, Ppm1h, Gfi1, Letm2, BC030183, Il4, 1500032D16Rik, Cd4, Shmt1, Chchd8, Chd1, 2510003E04Rik, Map3k11, Tbce, Ing2 e Tdg
Controle X RNAi Aire	Induzidos: Fbxl11, Trim17, Ankrd16, Cebpg, Abca5, 2610318N02Rik, Es2el, C230096C10Rik e Alg9
	Reprimidos: Shmt1, TLR2, CCR5 e Tbce
RNAi Aire X RNAi controle	Induzidos: Paqr8, Hrh3, 4932433N03Rik, Es2el, Nf2, Nup50, Lrpap1, Dnpep, Flna, Ebi3, Ctst, Myh11, Sh3yl1, 2610318N02Rik, Trim62, Trim17, 4932438H23Rik, Msc, Golt1b, C230096C10Rik, BC038156, Wdr12, Stard9, Dpm1 e Ankrd16
	Reprimidos: Ccr9, Ing2, Aars, Ifit1, Chd1, Il5, Pth1, Chchd8, Plxnc1, 1500032D16Rik, 1110018J18Rik, Btg2, Dnmt3a, Letm2, Gfi1, BC030183, Cd27, Glb1, Ppm1h, Tcrg-C, 5730494M16Rik, Il4, ME3, Mll5, Sept1, Skap1, 2510003E04Rik, Nkx6-2, Rab3d, ITGA5, Ercc5, Stat1, Cep78, Tcea3, Shmt1, Tdg, Tbce e Map3k11

6.9 Análise das regiões cromossômicas de susceptibilidade ao DM-1

Após serem analisados em termos de PGE utilizando o banco de dados GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>), os genes encontrados em todos os agrupamentos foram submetidos a uma análise em relação à localização cromossômica.

A busca no banco de dados do Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) para a descoberta dos genes *idds* (diabetes dependente de insulina) forneceu 40 genes descritos e quase todos apresentaram ideogramas para a localização cromossômica.

Uma busca no banco de dados Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) para a descoberta dos genes *idds* (diabetes dependente de insulina) forneceu 40 genes e suas localizações cromossômicas. Procuramos mais uma vez relacionar os dados de PGE com os genes do referido banco de dados. Os resultados mostrados nas Tabelas VIII e IX referem-se a genes encontrados nas análises de PGE de estroma de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes que se encontram em regiões coincidentes com as de genes *idds*.

Dentre os genes encontrados nas análises 3 deles estão descritos pelo mesmo banco de dados (MGI) como diretamente relacionados ao diabetes tipo 1 em camundongos. Os genes encontrados foram: Cd4, Cdk4 e IL4.

Tabela VIII. Genes diferencialmente expressos em estroma de timos recém removidos e em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes com representatividade da PGE localizados em regiões coincidentes com idds conhecidas.

Análise	Gene	Citobanda	Idd relacionada
Timos recém removidos	Induzidos	Phc3	3
		Rragc	4D
			9.2 (D1) ou 9.3 (D2.2)
		Clec1b	6 F3
			6
Timos em cultura ATOC	Reprimidos	H2-K1	17B1
		Epc1	18 A1
		Hdac1	4 D2.2
			9.3
Timos em cultura ATOC	Induzidos	Pdpk1	17 A3.3
		9530068E07Rik	11 B1.3
			16, 16a e 16b
			4
	Reprimidos	Ttll4	1 C3
		Sec24c	14 A3
		Acat3	17 A1
		Epc1	18 A1
		Etv3	3 F1
		2810403A07Rik	3 F1
		Lck	4 C5
			9.1

Tabela IX. Genes diferencialmente expressos em estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes após tratamento com RNA interferente com representatividade da PGE localizados em regiões coincidentes com idds conhecidas.

Análise		Gene	Citobanda	Idd relacionada
	Reprimidos em RNAi controle	Paqr8	1 A5	26
		Nck2	1 C1	5a
		Wdr12	1 C1-C2	5a C1 / 5 C2
		Dnpep	1 C3-C4	5b C3
		Sox4	13 A3-A5	14 A3.3
		Glo1	17 A3.3	16, 16a e 16b
		Hdac1	4 D2.2	9.3
		Clec1b	6 F3	6
		Rpl15	9 A3	2
Controle X RNAi controle X RNAi Aire	Induzidos em RNAi controle	Arpc2	1 C3	5b
		Il5	11 A5-B1	4 B1.3
		Ly86	13 A3.3	14
		Shc1	3 F1	18
		Cd27	6 F3	6
		Rab3d	9 A2-A3	2 A3
		9530077C05Rik	9 A3	2
	Induzidos em RNAi Aire	Trim17	11 B1.2 - B1.3	4 B1.3
	Reprimidos em RNAi Aire	Il4	11 B1.3	4
		1500032D16Rik	17 A3.3	16, 16a e 16b
		Rrp1b	17 B1	1
		BC030183	4 D2.2	9.3
Controle X RNAi Aire	Induzidos em RNAi Aire	Trim17	11 B1.2 - B1.3	4 B1.3
RNAi Aire X RNAi controle	Induzidos em RNAi Aire	Paqr8	1 A5	26
		Nck2	1 C1	5a
		Wdr12	1 C1-C2	5a C1 / 5 C2
		Dnpep	1 C3-C4	5b C3
		Trim17	11 B1.2 - B1.3	4 B1.3
		Sox4	13 A3-A5	14 A3.3
		Acat3	17 A1	23
		Trim62	A D2.2	9.3
		Hdac1	4 D2.2	9.3
		Clec1b	6 F3	6
	Reprimidos em RNAi Aire	Stat1	1 C1.1	5a
		Arpc2	1 C3	5b
		Il4	11 B1.3	4
		1500032D16Rik	17 A3.3	16, 16a e 16b
		H2-K1	17B1	1
		Shc1	3 F1	18
		BC030183	4 D2.2	9.3
		Anxa4	6 D1	20
		Cd27	6 F3	6
		Rab3d	9 A2-A3	2 A3

Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD

A incidência do diabetes espontâneo em NOD é de 60% a 80% em fêmeas e de 20% a 30% em machos. A incidência da doença aumenta quando os camundongos são mantidos em ambiente livre de patógenos e decresce dramaticamente em condições normais de manutenção (Singh & Rabinovitch, 1993; Bowman *et al.*, 1994). O início do diabetes ocorre entre 12 a 14 semanas de idade em fêmeas e um pouco depois em machos. Estudos histológicos mostram que os infiltrados celulares são notados nas ilhotas até aproximadamente 3 a 4 semanas de idade quando os animais começam a demonstrar a peri-insulite (Anderson & Bluestone, 2005).

Durante o andamento deste trabalho adequamos a manutenção dos camundongos NOD em condições SPF (*single pathogen free*) em nosso próprio laboratório, o que possibilitou o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) entre os camundongos provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP).

Foram adquiridos camundongos fêmeas NOD com idade média de 2 meses. A glicemia destes animais foi analisada periodicamente o que possibilitou separá-los em 2 grupos distintos, ou seja, o dos pré-autoimunes (com idade $\leq 4,5$ meses) e os autoimunes com idade $> 4,5$ meses de idade.

Nossos resultados quanto à emergência temporal do DM-1, ou seja, entre 3 e 4 meses de idade, corroboram com Anderson & Bluestone (2005) (Figura 13). O que diferiu em relação à literatura, foi a frequência de animais DM-1, a qual neste trabalho foi inferior (aproximadamente 30%). Se esses animais fossem observados por mais tempo, a frequência de DM-1 poderia ser ainda maior. Mas como ocorre involução tímica com a idade dos camundongos havendo substituição do estroma por tecido adiposo (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2005), não pudemos estudar animais com mais de 5,5 meses de idade.

7.2 Expressão do gene Aire e de TRAs no estroma tímico

O timo é um órgão linfóide primário em que os precursores de células T derivados da medula óssea se submetem a um processo complexo de maturação no contexto do microambiente tímico, representado por células não linfóides e

linfóides e por componentes da matriz extracelular (ECM) (Villa-Verde *et al.*, 1995).

O microambiente estromal é composto essencialmente de células epiteliais corticais (cTECs) e medulares (mTECs), fibroblastos reticulares, células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea, além de estruturas conhecidas como corpúsculos de Hassal, localizados especificamente na medula tímica e composto de espirais compactas de células epiteliais remanescentes de células em degeneração (van Ewijk W, 1991; Gray *et al.*, 2002; Abbas & Lichtman 2005). Durante a fase em que o timo se encontra em plena atividade, ou seja, do nascimento a puberdade, contribuindo com o repertório de células T, a proporção de timócitos e estroma é alta (Gray *et al.*, 2006). Com o avanço da idade esse órgão passa por um processo natural de involução havendo substituição do estroma tímico por tecido adiposo (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2005), e essa proporção se altera.

Existe uma distinção no papel das células TECs. As células corticais não só auxiliam na atração dos precursores linfóides do sangue para o timo como também controlam a diferenciação dos timócitos ao estágio em que eles expressam em sua superfície o receptor de células T $\alpha\beta$ completo. Consequentemente, os peptídeos próprios e as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) encontram afinidade suficiente nessas células sendo assim selecionadas positivamente. Posteriormente, os timócitos se movem para a medula. As mTECs apresentam moléculas MHC que expressam peptídeos que representam muitos tecidos do parênquima. Os timócitos que apresentarem alta afinidade pelos complexos serão negativamente selecionados ou deletados (Holländer, 2007).

Todos os grupos de células apresentadoras de antígenos (APCs), assim como as corticais tímicas (cTECs), medulares tímicas (mTECs), células dendríticas (DCs) e macrófagos tem suas funções na apresentação de grupos de peptídeos próprios, e especialização nas suas habilidades para suportar as seleções positiva e negativa, contribuindo para a diversidade do quadro de antígenos próprios no timo (Klein & Kyewski, 2000a; Kyewski & Derbinski, 2004; Anderson *et al.*, 2006).

Portanto, para o estudo da expressão gênica promíscua, propriedade do estroma tímico (células TECs), optou-se por estudar somente animais adultos jovens.

Aplicamos um método de separação do estroma tímico dos demais tipos de células. O procedimento escolhido foi baseado no trabalho de Gray *et al.* (2002), no qual o timo é fragmentado e passa por um processo de agitação em meio de cultura celular possibilitando a remoção dos timócitos que saem para o meio.

Como o processo não é de todo eficiente, devido à alta aderência do estroma com os timócitos, foi realizado um monitoramento da presença destes últimos nas preparações de estroma. Utilizou-se para isto a detecção do RNAm do receptor Cd3e (antígeno Cd3 cadeia epsilon) que é específico de linfócitos T por RT-PCR. A detecção de RNAm de Cd3e na preparação de estroma, mostrou a presença de linfócitos T (Figura 15). Embora presentes essas células não impediram a detecção da PGE que foi o foco deste trabalho. Mas, reconhecemos a necessidade de realizarmos uma separação de células estromais mais adequada.

O método de análise da PGE que possibilita a identificação de cada tipo celular envolvido compensou esta limitação.

A evidência da expressão de antígenos relacionados a tecidos (TRAs) de órgãos e tecidos parenquimais pelas células mTEC no timo de camundongos e de humanos referida como PGE (Jolicoeur *et al.*, 1994; Sospedra *et al.*, 1998; Derbinski *et al.*, 2001; Gotter *et al.*, 2004; Kyewski & Derbinski, 2004) vem sendo amplamente estudada e grande parte desses antígenos parece estar sob a influência de um fator transcricional denominado Aire (*Autoimmune regulator*) (Pitkänen *et al.*, 2003) capaz de controlar a expressão de um conjunto grande de genes de TRAs em mTECs, com uma tendência a genes que cuja expressão é preferencial de células diferenciadas (Anderson *et al.*, 2002 e 2005; Derbinski *et al.*, 2005; Derbinski & Kyewski, 2005; Barthlott *et al.* 2006; Kont *et al.*, 2008).

Portanto, a observação da expressão do gene Aire em nossas amostras de estroma tímico, tanto de camundongos NOD pré-autoimunes quanto autoimunes, mostrou que este regulador transcricional poderá estar implicado no controle da PGE dos camundongos estudados (Figura 15).

Entretanto, nem todos os antígenos expressos pelo timo estão sob o controle do gene Aire, como por exemplo, a caseína β e κ e o ácido glutâmico

descarboxilase 67kDa (Gad67) (Derbinski *et al.*, 2005) e da proteína c-reativa (Anderson *et al.*, 2002).

Alguns dos antígenos sabidamente considerados TRAs estão bem descritos na literatura em linhagens como C57BL/6 e NOD, como é o caso da insulina 1 e 2 (Ins-1 e Ins-2), controlados pelo Aire, e do Gad67, descritos como expressos em células mTECs de ambas as linhagens (Derbinski *et al.*, 2001; Kont *et al.*, 2008). Sendo assim, passamos a avaliar a presença dos respectivos RNAm desses antígenos nas amostras estudadas utilizando-se a técnica de RT-PCR (Figura 16).

Observando a Figura 16 é possível notar a expressão do gene Ins-1 em camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes, tanto em timos que foram recém removidos quanto daqueles que foram submetidos à cultura ATOC. Tal resultado mostra que a expressão desse gene parece não ser alterada pelo processo de autoimunidade em um modelo de diabetes nem tão pouco pelo cultivo do órgão em meio de cultura. Porém, o mesmo não acontece com os genes Ins-2 e Ia-2, que apresentaram expressão diferenciada, os quais foram expressos somente nos grupos pré-autoimunes ou mais expressos neles (Figura 16).

Tal observação nos chamou a atenção, pois, considerando que durante a indução de tolerância intratímica, as células mTEC apresentam os TRAs para os timócitos e os clones auto reativos são eliminados por apoptose (seleção negativa). Havendo então redução da expressão de RNAm de Ins-2 e Ia-2 que são autoantígenos relacionados ao DM-1, isto implicaria numa concomitante redução da seleção negativa. A redução da expressão de RNAm desses genes no timo dos camundongos NOD autoimunes (diabéticos) poderá implicar na redução da seleção negativa de linfócitos auto-reativos contra a insulina 2 e contra a proteína tirosina fosfatase associada ao insulinoma, possibilitando assim a reação autoimune na periferia. Por serem autoantígenos pancreáticos, são considerados como relacionados à patogenia do DM-1.

Foi observado que camundongos C57BL/6 e BALB/c deficientes de Ins-2 e com baixa expressão de insulina no timo, apresentaram células T auto-reativas à proinsulina (Chentoufi & Polychronakos, 2002).

Uma demonstração elegante do papel protetor anti diabetes da insulina no timo foi realizada por Nakayama *et al.* (2005), cujos pesquisadores compensaram

sua expressão em camundongos NOD duplamente nocautes para Ins-1 e Ins-2 com um transgene de insulina, observando que os mesmos foram protegidos da autoimunidade.

O gene do ácido glutâmico descarboxilase (Gad67) não está sob o controle do gene Aire e foi expresso nos diferentes grupos estudados, ficando claro que sua expressão parece não ser alterada pelo processo de autoimunidade em NOD (Figura 16). Sabe-se que as isoformas de Gad são facilmente detectáveis em humanos e ratos. Porém, em NOD a concentração dessa proteína nas ilhotas pancreáticas é consideravelmente baixa e a isoforma Gad67 pode ser detectada mas não sendo totalmente derivada das células β (Atkinson & Leiter, 1999). Nossos resultados mostram que o RNAm de Gad67 é expresso em todos os grupos estudados na mesma intensidade (Figura 16).

O gene do pró-colágeno II que codifica a proteína colágeno tipo II, abundante nas articulações e alvo das reações autoimunes na artrite reumatóide (Holmdahl *et al.*, 1990) também foi avaliado por se tratar de um auto-antígeno. Observou-se a expressão desse gene no estroma de camundongos NOD tanto nas amostras controle (pré-autoimunes) quanto nas amostras testes (autoimunes) demonstrando que a expressão desse gene parece não ser alterada pelo processo de autoimunidade em NOD.

Os resultados obtidos por meio de RT-PCR nos possibilitaram uma idéia da regulação da expressão de genes de autoantígenos no timo de camundongos NOD, incluindo aqueles diretamente associados à patogénia do DM-1 como Ins-1, Ins-2, Ia-2 e Gad67. Entretanto, tais achados são ainda pontuais e por isso passamos a utilizar o método de *microarrays* para avaliar de forma mais abrangente a expressão gênica no timo (PGE).

7.3 Avaliação da inibição do transcrito do gene Aire com RNA interferente

O uso do RNA interferente (RNAi) representa atualmente uma técnica bastante eficiente e relativamente fácil para a inibição da expressão de genes por meio da degradação de seus respectivos RNAs mensageiros (Caplen *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2005).

No presente trabalho, essa técnica foi útil para o estudo de um gene de grande importância para o fenômeno da PGE, o gene Aire (*autoimmune regulator*).

Este gene quando mutado é responsável pelo desenvolvimento no homem de uma doença autoimune órgão específica, a APECED (*autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) de caráter monogênico autossômico recessivo (Villaseñor *et al.*, 2005; Mathis & Benoist, 2007; Han, 2007). Com a descoberta de que o gene AIRE é o responsável por esta síndrome, houve muito interesse em saber seu papel no controle da PGE e consequentemente na tolerância imunológica. A associação deste gene no fenômeno da PGE surgiu após a detecção de sua expressão nas células mTEC, as quais expressam TRAs no timo.

Evidências obtidas com camundongos Aire nocaute demonstraram que este gene é um fator transcricional responsável pela regulação da expressão de grande parte de antígenos ectópicos, sendo, portanto, de grande importância para os processos de seleção dos linfócitos T no timo (Zuklys *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2002).

Camundongos Aire nocaute possuem um sistema imune relativamente normal, mas são afligidos por autoimunidade multi-órgão com a presença de infiltrados inflamatórios e autoanticorpos (Mathis & Benoist, 2007).

Com intuito de padronizarmos a técnica, inicialmente ensaiamos a inibição de Aire utilizando uma linhagem de células mTEC em cultura (linhagem 3.10 mTEC com fundo de C57Bl/6) que expressam Aire (Figura 18). Uma vez constatada a efetiva inibição do gene estudado, passamos então para o sistema de cultura de timos ATOC.

Decidiu-se avaliar a inibição de Aire após 24 h em cultura ATOC levando em consideração sua máxima eficiência do sistema de RNAi nesse tempo e também a frequência de apoptose em ATOC (Figura 17).

Além disso, estudamos a concentração ideal de RNAi em cultura ATOC que exibisse melhor inibição de Aire, a qual foi de 50 nM / timo (Figuras 20 e 21). Uma vez com esses parâmetros chave incluídos em nosso protocolo, partimos para o estudo do efeito da inibição de Aire no fenômeno de PGE.

Mostramos que tal inibição foi o suficiente para desregular genes que codificam TRAs no timo, desregulação esta manifestada tanto por indução como por repressão gênica. Os grupos de genes diferencialmente expressos e analisados por agrupamento hierárquico mostram claramente padrões de repressão e indução de muitos genes no estroma tímico de camundongos NOD

pré-autoimunes quando comparados com os controles (Figuras 24, 25 e 26).

Como abordado anteriormente, o significado do controle do gene Aire no timo foi observado em estudos com animais Aire nocaute. A ausência desse gene promove o aparecimento de autoanticorpos, especialmente contra antígenos de olho e de estômago (Devoss *et al.*, 2006; Gavanescu *et al.*, 2007), sendo suficiente para causar autoimunidade.

Os dados encontrados no presente trabalho corroboram com esses autores, pois os estromas tímicos de camundongos NOD pré-autoimunes, tratados com RNAi anti Aire passaram a expressar um número menor de genes associados a olho e sistema digestório, incluindo estômago, uma vez que a porcentagem de genes de PGE reprimidos superou a de genes induzidos após o tratamento com RNAi Aire (Figuras 30, 31 e 32).

Além disso, observamos que após a inibição de Aire, há repressão de genes de TRAs associados ao pâncreas (Figuras 35, 36 e 37 e Tabela VII). Tal achado, nos parece ser de particular interesse pois, relatamos aqui os genes de TRAs dependentes da presença de Aire.

7.4 Expressão gênica promiscua no timo

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

A diversidade de antígenos de órgãos e tecidos parenquimais expressos no timo (TRAs) de camundongos e de humanos é referida como expressão gênica promiscua (PGE) e tem grande importância na pesquisa em imunogenética que se ocupa da reavaliação das bases moleculares da tolerância central das células T na prevenção da autoimunidade (Kyewski & Derbinski, 2004).

Sendo assim, abriram-se perspectivas para se determinar a modulação e a

extensão da PGE por meio da técnica de *microarrays*. No caso do presente estudo, avaliamos camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes, na tentativa de relacionarmos o fenômeno da PGE com o desenvolvimento do DM-1.

A PGE é identificada atualmente pela análise de dados de *microarrays* dos diferentes genes órgão-específicos representados no timo de camundongo, usando informações combinadas do banco de dados público GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) (Su *et al.*, 2004). Este banco de dados mostra a expressão gênica de mais de 60 tecidos/órgãos de camundongos avaliada com *microarrays* da Affymetrix (<http://www.affimetrix.com>) (Figura 27).

No presente trabalho, foram considerados os genes promíscuos cuja expressão foi significativamente induzida ou reprimida no estroma tímico de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes e detectada em órgãos ou tecidos diferentes, além do timo, e cujos níveis de expressão ultrapassaram a mediana quando comparados aos demais órgãos.

Assim, o envolvimento de *microarrays* no trabalho e a estringência estatística usada no programa SAM, permitiram a observação da manifestação da PGE na indução de autoimunidade, aqui representada pelo DM-1.

Foi possível demonstrar diferentes perfis de expressão entre os animais pré-autoimunes e autoimunes, tanto nas amostras de estroma de timos recém removidos quanto nas amostras de estroma de timos em cultura ATOC.

As análises por agrupamento hierárquico da expressão gênica mostraram que tanto os animais pré como os autoimunes exibiram padrões diferentes de expressão gênica e, foram, portanto, incluídos em dois grupos separados. Esses dados permitem inferência de que o desenvolvimento de DM-1 tem como base eventos moleculares alterados no timo (Figuras 22 e 23).

O diabetes melitus é uma doença metabólica multi sistêmica decorrente do comprometimento da produção de insulina resultante da destruição das células β do pâncreas. Inicialmente, ocorre a infiltração das ilhotas do pâncreas pelas células T auto-reativas levando à insulite que progride para a destruição das células β (Castaño & Eisenbarth, 1990; Serreze & Leiter, 1994).

Partindo-se dessas informações, realizou-se um estudo mais refinado da PGE no modelo de DM-1. Os genes encontrados após a análise de dados de *microarrays* pela estatística SAM foram submetidos a análise PGE considerando tanto os genes reprimidos quanto os induzidos. Os camundongos pré-autoimunes

apresentaram maior número de genes reprimidos em relação aos autoimunes (Figuras 28 e 29).

Como a doença atinge primária e preferencialmente o pâncreas, avaliou-se a expressão de genes de TRAs que representam este órgão e, como visto, eles se mostraram preferencialmente reprimidos (Figuras 33 e 34 e Tabela VII).

7.5 Regiões cromossômicas de susceptibilidade ao diabetes tipo 1

Tanto influências genéticas como ambientais contribuem com o desenvolvimento do diabetes. O diabetes autoimune (DM-1) é a forma de diabetes que é mais dependente dos fatores genéticos. O DM-1 desenvolvido por camundongos NOD apresenta muitas características genéticas e patofisiológicas comuns ao DM-1 humano. Em ambas as espécies, os genes do MHC e outros não-MHC contribuem para a susceptibilidade da doença. Cerca de 20 regiões não-MHC conhecidas como *idd* (*insulin dependent diabetes*) foram associadas ao risco da doença em camundongos NOD (Maier & Wicker, 2005).

Considerando que essas regiões de susceptibilidade podem afetar a habilidade da deleção clonal de células T precursoras auto-reativas no timo (Liston *et al.*, 2004b), a habilidade de apresentar autoantígenos e selecionar células T auto-reativas (Stratmann *et al.*, 2003), a tolerância periférica e a atividade das células T ou moléculas com potencial regulatório (Salomon *et al.*, 2000; Kreuwel *et al.*, 2001) ou a agressividade da lesão (Lyons *et al.*, 2000a), procurou-se, no presente trabalho, relacionar a PGE com essas regiões de susceptibilidade.

O gene IL4 (interleucina 4) foi relacionado com a patogenia do DM-1 e se encontra na região cromossômica de susceptibilidade *idd4* (11 B1.3). O gene IL4 se mostrou reprimido nas análises em que houve a inibição de Aire, ou seja, a inibição desse último levou também à inibição do gene IL4 em animais pré-autoimunes. Em modelos animais de DM-1 qualquer tentativa de favorecer a atividade Th2, que corresponde a uma população de células T auxiliares com produção de citocinas específicas (IL4 e IL10), tem levado à prevenção do diabetes e há fortes evidências que a administração destas citocinas imunoregulatórias reduzem o diabetes autoimune (Rapaport *et al.*, 1993; Pennline *et al.*, 1994).

Os genes Cd4 (antígeno Cd4) e Cdk4 (quinase 4 dependente de ciclina) também relacionados ao diabetes foram encontrados em nossas análises. Porém, suas localizações cromossômicas não coincidem com nenhuma *idd* conhecida. Sabe-se que um aumento na expressão de Cdk4 leva à proliferação de células β (Fatrai *et al.*, 2006). Esse gene foi reprimido após inibição de Aire nos animais pré- autoimunes.

Uma busca no banco de dados Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) para a descoberta dos genes *idds* (diabetes dependente de insulina) forneceu 40 genes e suas localizações cromossômicas. Procuramos mais uma vez relacionar os dados de PGE com os genes do referido banco de dados. Os resultados mostrados nas Tabelas VIII e IX referem-se a genes encontrados nas análises de PGE de estroma de camundongos NOD pré- autoimunes e autoimunes que se encontram em regiões coincidentes com as de genes *idds*.

Inferimos assim que esses genes podem ser fortes candidatos a genes diretamente relacionados com a patogenia da doença.

Uma das estratégias para localizar um gene de grande efeito na susceptibilidade a um determinado distúrbio baseia-se no conceito de ligação genética (*linkage*). Esse conceito refere-se ao fato de que dois *loci* gênicos situados muito próximos num mesmo cromossomo tendem a ser herdados juntos (ligados). Estudos de *linkage* no genoma total demonstram que múltiplas doenças auto-imunes exibem *loci* de susceptibilidade comuns (Wanstrat & Wakeland, 2001). Tais conceitos nos possibilitam sugerir que os genes identificados em nossas análises, estando eles situados nas mesmas regiões de susceptibilidade ao DM-1, possam também desempenhar um papel na patogênese da doença.

Os resultados desse trabalho são importantes para um melhor entendimento dos processos genético-moleculares que ocorrem no estroma tímico, importantes para a indução de tolerância imunológica central e em particular para o sistema-modelo de desenvolvimento do diabetes melitus tipo1.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

- 1) A linhagem de camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*), que reproduz diabetes melitus do tipo 1, apresentou expressão diferenciada de genes do repertório de antígenos relacionados a tecidos (TRAs) no estroma tímico (expressão gênica promíscua) durante a transição do estado pré-autoimune para o autoimune .
- 2) As diferenças encontradas envolvem expressão de genes de antígenos relacionados diretamente com o pâncreas.
- 3) A expressão gênica promíscua de TRAs no timo inclui genes de susceptibilidade ao diabetes melitus do tipo 1.
- 4) A expressão de RNAm de autoantígenos associados ao diabetes (Ins-2 e Ia-2), no estroma tímico, foi reduzido nos camundongos NOD autoimunes.
- 5) Dada a preservação das propriedades morfofisiológicas do timo adulto em cultura (ATOC), o fenômeno da expressão gênica promíscua (PGE) pôde ser reproduzido neste sistema modelo.
- 6) O gene Aire (*Auto immune regulator*) controla um conjunto de genes de TRAs no estroma do timo de NOD, incluindo aqueles associados ao pâncreas, olho e sistema digestório (estômago).

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK & Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5a Edição. W. B. Saunders Company. Philadelphia Penn. USA. Ed. Elsevier, 576p, 2005.
- Adamson KA, Pearce SH, Lamb JR, Seckl JR, Howie SE. A comparative study of mRNA and protein expression of the autoimmune regulator gene (Aire) in embryonic and adult murine tissues. *J Pathol*. 202(2):180-187, 2004.
- Alonso L & Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(1): 11830- 11835, 2003.
- Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol*. 1(1):31-40, 2001.
- Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FAM, White AJ, Pongrac'z JE, Rossi SW, Jenkinson EJ. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Reviews* 209: 10-27, 2006.
- Anderson G, Lane PJ, Jenkinson EJ. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol*. 7(12):954-963, 2007.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298 (5597):1395-1401, 2002.
- Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 23(2):227-239, 2005.
- Anderson MS & Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 23:447-485, 2005.

- Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 5(6):601-604, 1999.
- Aune TM, Parker JS, Maas K, Liu Z, Olsen NJ, Moore JH. Co-localization of differentially expressed genes and shared susceptibility loci in human autoimmunity. *Genet Epidemiol.* 27(2):162-172, 2004.
- Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun.*;25 Suppl:74-80, 2005.
- Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Holländer GA. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. *Swiss Med Wkly.* 136(23-24): 365-369, 2006.
- Benjamin Y & Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 57 289-300, 1995.
- Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol.* 4 (4): 278-289, 2004.
- Blechsmidt K, Schweiger M, Wertz K, Poulson R, Christensen HM, Rosenthal A, Lehrach H, Yaspo ML. The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression. *Genome Res.* 9(2):158-166, 1999.
- Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönting JS, Boehm T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature.* 441(7096):992-996, 2006.
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo.* 11(5):421-440, 1997.

- Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med.* 198(5):757-769, 2003.
- Boehm T & Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol.* 27(10):477-484, 2006.
- Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest.*:105(11):1493-1499, 2000.
- Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today.* 15(3):115-120, 1994.
- Caplen NJ. Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Ther.* 11(16):1241-1248, 2004.
- Cardoso RS, Junta CM, Macedo C, Magalhães DA, Silveira EL, Paula MO, Marques MM, Mello SS, Zárate-Bladés CR, Nguyen C, Houlgatte R, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA. Hybridization signatures of gamma-irradiated murine fetal thymus organ culture (FTOC) reveal modulation of genes associated with T-cell receptor V(D)J recombination and DNA repair. *Mol Immunol.* 43(5):464-472, 2006.
- Castaño L & Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol.* 8:647-679, 1990.
- Chentoufi AA & Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes.* 51(5):1383-1390, 2002.

- Cordier AC & Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat.* 157(3):227-263, 1980.
- DeLuca D, Bluestone JA, Shultz LD, Sharrow SO, Tatsumi Y. Programmed differentiation of murine thymocytes during fetal thymus organ culture. *J Immunol Methods.* 178(1):13-29, 1995.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunol.* 2: 1032-1039, 2001.
- Derbinski J & Kyewski B. Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. *Trends Immunol.* 26(10): 503-506, 2005.
- Derbinski J, Gäbler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhausen M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J.Exp.Med* 202(1):33-45, 2005.
- DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi RR, Fong L, Anderson MS. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med.* 203(12):2727-2735, 2006.
- Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W Jr, Zago MA, Bordin S, Costa FF, Goldman GH, Carvalho AF, Matsukuma A, Baia GS, Simpson DH, Brunstein A, de Oliveira PS, Bucher P, Jongeneel CV, O'Hare MJ, Soares F, Brentani RR, Reis LF, de Souza SJ, Simpson AJ. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3491-3496, 2000.
- Dooley J, Erickson M, Gillard GO, Farr AG. Cervical thymus in the mouse. *J Immunol* 176(11):6484-6490, 2006.

- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 21(1):10-14, 1999.
- Fathman CG, Soares L, Chan SM, Utz PJ. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature* 435(7042):605-611, 2005.
- Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, Cras-Méneur C, Krits I, Kiyokawa H, Bernal-Mizrachi E. Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes* 55(2):318-325, 2006.
- Filippi C, von Herrath M. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cell Immunol.*233(2):125-132, 2005.
- Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(11):4583-4587, 2007.
- Germeraad WT, Kawamoto H, Itoi M, Jiang Y, Amagai T, Katsura Y, van Ewijk W. Development of thymic microenvironments in vitro is oxygen-dependent and requires permanent presence of T-cell progenitors. *J Histochem Cytochem.* 51(9):1225-1235, 2003.
- Gianani R, Sarvetnick N. Viruses, cytokines, antigens, and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2257-2259, 1996.
- Gillard GO, Dooley J, Erickson M, Peltonen L, Farr AG. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol.* 178(5):3007-3015, 2007.
- Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC, Manley NR. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev.* 103(1-2):141-143, 2001.

- Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR, Blackburn CC. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol.* 5(5):546-553, 2004.
- Gotter J, Brors B, Hergenhausen M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* 199(2): 155-166, 2004.
- Gray DH, Chidgey AP, Boyd RL. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 260(1-2):15-28, 2002.
- Gray DH, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y, Boyd RL. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol* 17(2): 137-143, 2005.
- Gray DH, Seach N, Ueno T, Milton MK, Liston A, Lew AM, Goodnow CC, Boyd RL. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood.* 108: 3777-3785, 2006.
- Haks MC, Krimpenfort P, Borst J, Kruisbeek AM. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCR alpha beta and TCR gamma delta lineages. *Embo* 17(7): 1871-1882, 1998.
- Halonen M, Peltö-Huikko M, Eskelin P, Peltonen L, Ulmanen I, Kolmer M. Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *J. Histochem. Cytochem.* 49(2), 197-208, 2001.
- Han H. Target-organ specificity of autoimmunity is modified by thymic stroma and bone marrow-derived cells. *J Med Invest.* 54(1-2):54-64, 2007.

- Harman BC, Jenkinson WE, Parnell SM, Rossi SW, Jenkinson EJ, Anderson G. T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. *Blood*. 106(3):886-892, 2005.
- Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*. 29(3):548-556, 2000.
- Holländer GA. Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat Immunol* 8(3):234-236, 2007.
- Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev*. 118:193-232, 1990.
- Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 263(4 Pt 1):E607-14, 1992.
- Itoi M, Kawamoto H, Katsura Y, Amagai T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int Immunol* 13(9):1203-1211, 2001.
- Jenkinson WE, Jenkinson EJ, Anderson G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med*. 198(2): 325-332, 2003.
- Jiang W, Anderson MS, Bronson R, Mathis D, Benoist C. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J Exp Med*. 202(6):805-815, 2005.
- Jolicoeur C, Hanahan D, Smith KM. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(14): 6707-6711, 1994.

- Jordan BR. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". *J Biochem.* 124(2):251-258, 1998.
- Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med.* 344(9):655-664, 2001.
- Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol.* 2(11):1025-1031, 2001
- Klein L & Kyewski B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12(2): 179-186, 2000a.
- Klein L & Kyewski B. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.* 78(9):483-494, 2000b.
- Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol Immunol.* 45(1):25-33, 2008.
- Kreuwel HT, Biggs JA, Pilip IM, Pamer EG, Lo D, Sherman LA. Defective CD8+ T cell peripheral tolerance in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 167(2):1112-1117, 2001.
- Kumar PG, Laloraya M, Wang CY, Ruan QG, Davoodi-Semiromi A, Kao KJ, She JX. The autoimmune regulator (Aire) is a DNA binding protein. *J. Biol. Chem* 276(44):41357-41364, 2001.
- Kurella M, Hsiao LL, Yoshida T, Randall JD, Chow G, Sarang SS, Jensen RV, Gullans SR. DNA microarray analysis of complex biologic processes. *J Am Soc Nephrol.* 12(5):1072-1078, 2001.

- Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol.* 174(4):1862-1870, 2005.
- Kyewski B & Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol* 4(9):688-698, 2004.
- Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther.* 107(2):222-239, 2005.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 21(1):20-24, 1999.
- Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, Boyd RL, Peltonen L, Goodnow CC. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med.* 200(8):1015-1026, 2004a.
- Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson SR, Goodnow CC. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity.* 21(6):817-830, 2004b.
- Lyons PA, Hancock WW, Denny P, Lord CJ, Hill NJ, Armitage N, Siegmund T, Todd JA, Phillips MS, Hess JF, Chen SL, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS. The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity.* 13(1):107-115, 2000a.

- Lyons PA, Armitage N, Argentina F, Denny P, Hill NJ, Lord CJ, Wilusz MB, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA. Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, Idd3, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping. *Genome Res.* 10(4):446-453, 2000b.
- Maier LM, Wicker LS. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol.* 17(6):601-608, 2005.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 29(1):1-13, 1980.
- Manley NR. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol.* 12(5):421-428, 2000.
- Manley NR & Blackburn CC. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol.* 15(2):225-232, 2003.
- Many MC, Maniratunga S, Denef JF. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104(3):17-20, 1996.
- Mathis D & Benoist C. A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol.* 7(8):645-650, 2007.
- Menossi M, Cremonese N Jr, Maron LG, Arruda P. Making colony PCR easier by adding gel-loading buffer to the amplification reaction. *Biotechniques.* 28(3):424- 426, 2000.
- Michelon L & Vallada H. Genetics of bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 26 (3):12-16, 2004.
- Montecino-Rodriguez E, Min H, Dorshkind K. Reevaluating current models of thymic involution. *Semin Immunol.* 17(5): 356-361, 2005.

- Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*. 435(7039):220-223, 2005.
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz R, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science*. 272(5263):886-889, 1996.
- Passos GAS, Nguyen C, Jordan B. Projeto Transcriptoma - Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Ano II, 12: 34 - 37, 2000.
- Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3th Ed. Raven Press Ltd. New York, 1993.
- Penha-Gonçalves C, Moule C, Smink LJ, Howson J, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Suttie JJ, Lord CJ, Peterson LB, Todd JA, Wicker LS. Identification of a structurally distinct CD101 molecule encoded in the 950-kb Idd10 region of NOD mice. *Diabetes*. 52(6):1551-1556, 2003.
- Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol*. 71(2):169-175, 1994.
- Pitkänen J, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun* 4(1):12-21, 2003.
- Podolin PL, Denny P, Lord CJ, Hill NJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS, Lyons PA. Congenic mapping of the insulin-dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates the candidate Fcgr1. *J Immunol*. 159(4):1835-1843, 1997.

- Ramialison M, Mohr E, Nal B, Saboul T, Carrier A, Tagett R, Granjeaud S, Nguyen C, Gautheret D, Jordan BR, Ferrier P. Expression profiling in mouse fetal thymus reveals clusters of coordinately expressed genes that mark individual stages of T-cell ontogeny. *Immunogenetics*. 54(7):469-478, 2002.
- Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 178(1):87-99, 1993.
- Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441(7096):988-991, 2006.
- Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Cardoso RS, Passos GAS. Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese (Cap. 12). *Mutagênese Ambiental*. Ed. ULBRA, 356p, 2003.
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 12(4):431-440, 2000.
- Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, Arcella J, Girvin AM, Padilla J, Miller SD, Bluestone JA. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*. 194(5):677-684, 2001.
- Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O, Villa-Verde DM. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res*. 36(8):1015-1025, 2003.

- Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2(6):e62, 2006.
- Savino W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol.* 92(5):813-817, 2007.
- Serreze DV & Leiter EH. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr Opin Immunol.* 6(6):900-906, 1994.
- Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome.* 17(3):189-202, 2006.
- Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA.* 293(11):1367-1373, 2005.
- Singh B, Rabinovitch A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. *Autoimmunity.* 15(3):209-213, 1993.
- Smyth GK.. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3, No. 1, Article 3, 2004.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics.* 21(9):2067-2075, 2005.
- Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domínguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* 161(11):5918-5929, 1998.

- Sousa Cardoso R, Magalhães DA, Baião AM, Junta CM, Macedo C, Marques MM, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Onset of promiscuous gene expression in murine fetal thymus organ culture. *Immunology*. 119(3):369-375, 2006.
- Staudt LM, Brown PO. Genomic views of the immune system*. *Annu Rev Immunol*. 18:829-859, 2000.
- Stratmann T, Martin-Orozco N, Mallet-Designe V, Poirot L, McGavern D, Losyev G, Dobbs CM, Oldstone MB, Yoshida K, Kikutani H, Mathis D, Benoist C, Haskins K, Teyton L. Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. *J Clin Invest*. 112(6):902-914, 2003.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(16): 6062-6067, 2004.
- Turner IH, Fathman CG. Gene therapy in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 13(6):676-682, 2001.
- Terszowski G, Müller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, Pasquier LD, Amagai T, Boehm T, Rodewald HR. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science*. 312(5771):284-287, 2006.
- Trevisan GL, Rassi DM, Baião AM, Sandrin-Garcia P, Mello SS, Tamia-Ferreira MC, Junta CM, Fachin AL, Marques MM, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Using cDNA microarrays to identify human CD19(+) B cell gene products (ESTs) originated from systemic lupus erythematosus susceptibility loci. *Autoimmun Rev*. 5(5):319-323, 2006.

- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(9):5116-5121, 2001.
- van Ewijk W, Holländer G, Terhorst C, Wang B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127(8): 1583-1591, 2000.
- van Ewijk W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol*. 9:591-615, 1991.
- van Ewijk W, Shores EW, Singer A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today*. 15(5):214-217, 1994.
- van Ewijk W, Holländer G, Terhorst C, Wang B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development*. 127(8):1583-1591, 2000.
- van Hal NL, Vorst O, van Houwelingen AM, Kok EJ, Peijnenburg A, Aharoni A, van Tunen AJ, Keijer J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J Biotechnol*. 78(3):271-280, 2000.
- Villaseñor J, Benoist C, Mathis D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol Rev*. 204:156-164, 2005.
- Villa-Verde DM, Mello-Coelho V, Lagrota-Cândido JM, Chammas R, Savino W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Braz J Med Biol Res*. 28(8):907-912, 1995.
- von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol*. 7(12):988-994, 2007.

- Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol.* 2(9):802-809, 2001.
- Whalen BJ, Weiser P, Marounek J, Rossini AA, Mordes JP, Greiner DL. Recapitulation of normal and abnormal BioBreeding rat T cell development in adult thymus organ culture. *J Immunol.* 162(7):4003-4012, 1999.
- Whitney LW, Becker KG. Radioactive 33-P probes in hybridization to glass cDNA microarrays using neural tissues. *J Neurosci Methods.* 106(1):9-13, 2001.
- Xiang CC, Chen Y. cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnol Adv.* 18(1):35-46, 2000.
- Ye SQ, Usher DC, Zhang LQ. Gene expression profiling of human diseases by serial analysis of gene expression. *J Biomed Sci.* 9(5):384-394, 2002.
- Zamisch M, Moore-Scott B, Su DM, Lucas PJ, Manley N, Richie ER. Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol.* 174(1):60-67, 2005.
- Zhang L, Sun L, Zhao Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update. *Cell Res.* 17(1):50-55, 2007.
- Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity.* 22(3):385-396, 2005.
- Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Holländer GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J. Immunol.* 165(4): 1976-1983, 2000.

Anexos

Anexo I

Imagens de Microarrays

Figura 38. Imagem típica de hibridização de *microarray* com sondas fluorescentes (Cy3 e Cy5).

Anexo II

Tabelas de genes do SAM

Tabela II. Genes diferencialmente expressos (109) e com significância estatística de acordo com o programa SAM (FDR = 0,20 e delta = 0,501) em amostras de estroma de timos recém removidos de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.

Expressão	Símbolo	Nome	CloneID	Citobanda
Genes Induzidos	Rragc	Ras-related GTP binding C	IMAGE:583913	4 D
	EST	-	IMAGE:640814	-
	EST	-	IMAGE:641060	-
	Nol7	Nucleolar protein 7	IMAGE:641156	13 A4
	Zwint	ZW10 interactor	IMAGE:1327907	10 B5
	EST	-	IMAGE:583428	-
	EST	-	IMAGE:576256	-
	EST	-	IMAGE:575254	-
	Il18	Interleukin 18	IMAGE:1328063	9 A5
	Clec1b	C-type lectin domain family 1, member b	IMAGE:574821	6 F3
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:641074	7
	Xcl1	Chemokine (C motif) ligand 1	IMAGE:576815	1 H2.2
	Prdm10	PR domain containing 10	IMAGE:640355	9 A4
	Slbp	Stem-loop binding protein	IMAGE:575728	5 B2
	Rpl21	Ribosomal protein L21	IMAGE:1243370	5 G3
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:582955	7
	EST	-	IMAGE:640359	-
	Rfxap	Regulatory factor X-associated protein	IMAGE:575562	3 D
	Phc3	Polyhomeotic-like 3 (Drosophila)	IMAGE:1346045	3 A3
	Ccnb1	Cyclin B1	IMAGE:576166	13 D1
	G3bp1	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1	IMAGE:640974	11 B1.3
	Eif3s5	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsilon)	IMAGE:575801	7 E3
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:575368	2
	EST	-	IMAGE:640785	-
	EST	-	IMAGE:575672	-
	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	IMAGE:573066	14 C2
	EST	-	IMAGE:575780	-
	Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	IMAGE:575387	11 E2
	1810020D17Rik	RIKEN cDNA 1810020D17 gene	IMAGE:583707	7 E1
	Ube2r2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	IMAGE:582562	4 B1
	Ankrd40	Ankyrin repeat domain 40	IMAGE:581765	11 C
	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	IMAGE:574266	17 D
	EST	-	IMAGE:583504	-
	EST	-	IMAGE:576190	-
	D10Ertd610e	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 610, expressed	IMAGE:576334	10 D3
	Mrpl34	Mitochondrial ribosomal protein L34	IMAGE:575652	8 B3.3
	Cyb5b	Cytochrome b5 type B	IMAGE:640762	8 D2
	2810021B07Rik	RIKEN cDNA 2810021B07	IMAGE:576310	13 A3.1

Genes Reprimidos	Lss	Lanosterol synthase	IMAGE:641986	10 C1
	EST	-	IMAGE:640118	-
	EST	-	IMAGE:641125	-
	C330006K01Rik	RIKEN cDNA C330006K01 gene	IMAGE:640249	5 G2
	1300012G16Rik	RIKEN cDNA 1300012G16 gene	IMAGE:640297	5 F
	EST	-	IMAGE:583825	-
	Sfrs5	Splicing factor, arginine/serine-rich 5	IMAGE:583131	12 D2
	Prkar2b	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	IMAGE:640704	12 B1
	EST	-	IMAGE:639721	-
	Inpp5f	Inositol polyphosphate-5-phosphatase F	IMAGE:640224	7 F3
	Gpld1	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	IMAGE:640248	13 A3.1
	EST	-	IMAGE:640624	-
	Hnrpd1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	IMAGE:640623	5 E4
	Hltf	Helicase-like transcription factor	IMAGE:639807	3 A2
	EST	-	IMAGE:640621	-
	Suz12	Suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	IMAGE:640237	11 B5
	EST	-	IMAGE:639825	-
	EST	-	IMAGE:640209	-
	Eif4g2	Eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2	IMAGE:640625	7 E3
	Rap1a	RAS-related protein-1 ^a	IMAGE:583523	3 F2.2
	EST	-	IMAGE:583778	-
	Epc1	Enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)	IMAGE:583089	18 A1
	EST	-	IMAGE:640840	-
	Arpp21	Cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	IMAGE:582891	9 F3
	Lsp1	Lymphocyte specific 1	IMAGE:640873	7 F5
	EST	-	IMAGE:640900	-
	EST	-	IMAGE:583106	-
	Sfrs1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	IMAGE:583015	11 C
	EST	-	IMAGE:583826	-
	EST	-	IMAGE:583245	-
	Afmid	Arylformamidase	IMAGE:582985	11 E2
	Sox4	SRY-box containing gene 4	IMAGE:639914	13 A3-A5
	EST	-	IMAGE:640241	-
	Sypl	Synaptophysin-like protein	IMAGE:640468	12 B2
	Tcea3	Transcription elongation factor A (SII), 3	IMAGE:573147	4 D3
	EST	-	IMAGE:640428	-
	Pdia4	Protein disulfide isomerase associated 4	IMAGE:4971952	6 B2.3
	EST	-	IMAGE:582951	-
	Irf8	Interferon regulatory factor 8	IMAGE:640774	8 E1
	Slc7a11	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 11	IMAGE:575418	3 D

Genes Reprimidos	Nebi	Nebulette	IMAGE:639873	2 A2
	EST	-	IMAGE:639849	-
	Stx18	Syntaxin 18	IMAGE:640560	5 B3
	EST	-	IMAGE:640033	-
	EST	-	IMAGE:640176	-
	EST	-	IMAGE:640589	-
	Shmt1	Serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)	IMAGE:573743	11 B2
	EST	-	IMAGE:583270	-
	P2rx1	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	IMAGE:576538	11 B4
	H2-Q8	Histocompatibility 2, K1, K region	IMAGE:583608	17 B1
	H2-Q8	Histocompatibility 2, K1, K region	IMAGE:583704	17 B1
	EST	-	IMAGE:583010	-
	EST	-	IMAGE:639711	-
	EST	-	IMAGE:640680	-
	EST	-	IMAGE:640793	-
	Kdelr1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	IMAGE:640576	7 B3
	Fcho2	FCH domain only 2	IMAGE:639755	13 D1
	EST	-	IMAGE:640909	-
	EST	-	IMAGE:641007	-
	Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)	IMAGE:583678	X D
	Tmem115	Transmembrane protein 115	IMAGE:582843	9 F1
	EST	-	IMAGE:640632	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640298	4
	5730410I19Rik	RIKEN cDNA 5730410I19 gene	IMAGE:640528	12 F1
	Hdac1	Histone deacetylase 1	IMAGE:641105	4 D2.2
	Nsd1	Nuclear receptor-binding SET-domain protein 1	IMAGE:641011	13 B1
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:1361796	14
	Bclaf1	BCL2-associated transcription factor 1	IMAGE:641008	10 A3
	EST	-	IMAGE:640924	-
	Igf1r	Insulin-like growth factor I receptor	IMAGE:640403	7 C
	Plxnd1	Plexin D1	IMAGE:583349	6 E3

Tabela III. Genes diferencialmente expressos (89) e com significância estatística de acordo com o programa SAM (FDR = 0,20 e delta = 0,463) em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes e autoimunes.

Expressão	Símbolo	Nome	CloneID	Citobanda
Genes Induzidos	Men1	Multiple endocrine neoplasia 1	IMAGE:576049	19 A
	Pdpk1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	IMAGE:575945	17 A3.3
	EST	-	IMAGE:575126	-
	9530068E07Rik	RIKEN cDNA 9530068E07 gene	IMAGE:641079	11 B1.3
	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IMAGE:2069299	4q21
	IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	IMAGE:1912458	3q25.33-q26
	CD209	CD209 molecule	IMAGE:469815	19p13
Genes Reprimidos	Brd9	Bromodomain containing 9	IMAGE:577648	13 C1
	Nsd1	Nuclear receptor-binding SET-domain protein 1	IMAGE:641011	13 B1
	HnrpU2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	IMAGE:576590	19 A
	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	IMAGE:1333778	17q21
	Myg1	Melanocyte proliferating gene 1	IMAGE:583514	15 F3
	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	IMAGE:1877532	11q22-q23
	Prdx6	Peroxiredoxin 6	IMAGE:640989	1 H2.1
	Park7	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	IMAGE:640406	4 E1
	S100pbb	S100P binding protein	IMAGE:640965	4 D2.3
	FANCC	Fanconi anemia, complementation group C	IMAGE:1637797	9q22.3
	Tmco6	Transmembrane and coiled-coil domains 6	IMAGE:583157	18 B3
	Hspa8	Heat shock protein 8	IMAGE:575712	9 A5.1
	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	IMAGE:573624	16 B1
	IRF5	Interferon regulatory factor 5	IMAGE:260035	7q32
	Gzma	Granzyme A	IMAGE:572830	13 D
	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	IMAGE:1247019	6 C
	EST	-	IMAGE:583269	-
	Jarid1b	Jumonji, AT rich interactive domain 1B (Rbp2 like)	IMAGE:582793	1 E4
	Transcribed locus	Ribosomal protein L18A	IMAGE:583588	8 B3.3
	EST	-	IMAGE:582892	-
	Smc4	Structural maintenance of chromosomes 4	IMAGE:582972	3 E2
	EST	-	IMAGE:583825	-
	Cyb561d2	Cytochrome b-561 domain containing 2	IMAGE:640083	9 F1
	Nf2	Neurofibromatosis 2	IMAGE:640467	11 A1
	R3hdm1	R3H domain 1 (binds single-stranded nucleic acids)	IMAGE:640077	1 E4

Genes Reprimidos	Spg20	Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome) homolog (human)	IMAGE:573449	3 C
	Sfrs1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	IMAGE:640898	11 C
	Parp3	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	IMAGE:640154	9 F1
	Zcchc7	Zinc finger, CCHC domain containing 7	IMAGE:575396	4 B1
	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	IMAGE:135671	12q11-q13
	EST	-	IMAGE:640176	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:639657	5 B3
	Slc9a3r1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	IMAGE:582986	11 E2
	EST	-	IMAGE:639969	-
	Elk4	ELK4, member of ETS oncogene family	IMAGE:583566	1 E3-G
	Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1, NIP2	IMAGE:640945	9 D
	EST	-	IMAGE:640921	-
	Ubx1	UBX domain containing 1	IMAGE:583564	17 C
	Pak4	P21 (CDKN1A)-activated kinase 4	IMAGE:640017	7 A3
	Map4k4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	IMAGE:583185	1
	EST	-	IMAGE:640784	-
	Etv3	Ets variant gene 3	IMAGE:583667	3 F1
	Fcna	Ficolin A	IMAGE:583643	2 A3
	Tssc1	Tumor suppressing subtransferable candidate 1	IMAGE:640062	12 A2
	EST	-	IMAGE:640900	-
	D4Wsu53e	DNA segment, Chr 4, Wayne State University 53, expressed	IMAGE:582868	4 D3
	Cxcl4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4	IMAGE:573339	5 E2
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640875	-
	Rbm39	RNA binding motif protein 39	IMAGE:640923	2 H1
	Tcea3	Transcription elongation factor A (SII), 3	IMAGE:573147	4 D3
	SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	IMAGE:140625	2q35
	Ttll4	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 4	IMAGE:582821	1 C3
	EST	-	IMAGE:583897	-
	EST	-	IMAGE:639711	-
	Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase	IMAGE:640179	4 D2.2
	Ywhah	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	IMAGE:640494	5 B1

Genes Reprimidos	Mthfr	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	IMAGE:640110	4 E2
	EST	-	IMAGE:640518	-
	Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	IMAGE:640180	15 E1
	EST	-	IMAGE:640564	-
	Mthfr	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	IMAGE:640134	4 E2
	Epc1	Enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)	IMAGE:583089	18 A1
	EST	-	IMAGE:640612	-
	EST	-	IMAGE:640400	-
	EST	-	IMAGE:640861	-
	EST	-	IMAGE:640885	-
	Sfrs5	Splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)	IMAGE:583131	12 D2
	2810403 ^a 07Rik	RIKEN cDNA 2810403 ^a 07 gene	IMAGE:583082	3 F1
	C3	Complement component 3	IMAGE:582886	17 E1-E3
	EST	-	IMAGE:582798	-
	Sec24c	SEC24 related gene family, member C (S. cerevisiae)	IMAGE:582822	14 A3
	Ddx51	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51	IMAGE:639801	5 F
	EST	-	IMAGE:640445	-
	2010001A14Rik	RIKEN cDNA 2010001A14 gene	IMAGE:640493	11 B1.3
	EST	-	IMAGE:640540	-
	EST	-	IMAGE:582961	-
	Acat3	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	IMAGE:583609	17 A1
	EST	-	IMAGE:640516	-
	Gnpda2	Glucosamine-6-phosphate deaminase 2	IMAGE:582795	5 D
	EST	-	IMAGE:639726	-
	EST	-	IMAGE:582870	-

Tabela IV. Genes diferencialmente expressos (122 abordados dos 360 encontrados) e com significância estatística de acordo com o programa SAM (FDR = 0,20 e delta = 0,251) em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e com RNAi controle e não tratados (controle).

Expressão	Símbolo	Nome	CloneID	Citobanda
Genes Induzidos	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	IMAGE:641074	7 B1
	Sema4d	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	IMAGE:583259	13 B1
	EST	-	IMAGE:640373	-
	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31	IMAGE:574060	X A6
	Ctf1	Cardiotrophin 1	IMAGE:1225744	7 F3
	D2Ert750e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed	IMAGE:575429	2 E5
	Aim1	Absent in melanoma 1	IMAGE:640153	10 B2
	EST	-	IMAGE:639776	-
	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	IMAGE:573066	14 C2
	Mettl3	Methyltransferase-like 3	IMAGE:575046	14 C2
	EST	-	IMAGE:583611	-
	Abca5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	IMAGE:582867	11 E1
	2810455D13Rik	RIKEN cDNA 2810455D13 gene	IMAGE:582820	19
	EST	-	IMAGE:583324	-
	EST	-	IMAGE:639724	-
	2310035C23Rik	RIKEN cDNA 2310035C23 gene	IMAGE:573037	1 D
	EST	-	IMAGE:640972	-
	EST	-	IMAGE:573496	-
	EST	-	IMAGE:583924	-
	Nol6	Nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	IMAGE:583756	4 A5
	Fbxl11	F-box and leucine-rich repeat protein 11	IMAGE:639916	19 A
	Tmem115	Transmembrane protein 115	IMAGE:582843	9 F1
	Sh3yl1	Sh3 domain YSC-like 1	IMAGE:641043	12 A2
	Alg9	Asparagine-linked glycosylation 9 homolog (yeast, alpha 1,2 mannosyltransferase)	IMAGE:639947	9 A5.3
	Myg1	Melanocyte proliferating gene 1	IMAGE:640034	15 F3
	2610318N02Rik	RIKEN cDNA 2610318N02 gene	IMAGE:1263539	16 A3
	Trim17	Tripartite motif protein 17	IMAGE:1263520	11 B1.2-B1.3
	Cd34	CD34 antigen	IMAGE:573426	1 H6
	EST	-	IMAGE:640539	-
	Es2el	Expressed sequence 2 embryonic lethal	IMAGE:583108	16 B1-B3
	Fen1	Flap structure specific endonuclease 1	IMAGE:639819	19 A

Genes Induzidos	Ankrd16	Ankyrin repeat domain 16	IMAGE:583852	2 A1
	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	IMAGE:575486	12 F1-F2
	EST	-	IMAGE:576044	-
Genes Reprimidos	Gdap2	Ganglioside-induced differentiation-associated-protein 2	IMAGE:641674	3 F2.2
	Ypel2	Yippee-like 2 (Drosophila)	IMAGE:576464	11 C
	Ube2r2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	IMAGE:582562	4 B1
	Smc4	Structural maintenance of chromosomes 4	IMAGE:582900	3 E2
	5730494M16Rik	RIKEN cDNA 5730494M16 gene	IMAGE:583861	18 A2
	Tcrg-C	T-cell receptor gamma, constant region	IMAGE:640129	13 A2
	Pcmd2	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	IMAGE:641904	2 H4
	Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	IMAGE:575387	11 E2
	Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IMAGE:575371	19 C1
	EST	-	IMAGE:575796	-
	Rbm39	RNA binding motif protein 39	IMAGE:583614	2 H1
	Rab2	RAB2, member RAS oncogene family	IMAGE:573835	4 A1
	EST	-	IMAGE:583009	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:138013	X
	Slbp	Stem-loop binding protein	IMAGE:583806	5 B2
	Tnfrsf13b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	IMAGE:574040	11 B2
	1110018J18Rik	RIKEN cDNA 1110018J18 gene	IMAGE:639771	13 B3
	Rrp1b	Ribosomal RNA processing 1 homolog B	IMAGE:575876	17 B1
	Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2	IMAGE:1225539	15 D2
	EST	-	IMAGE:575350	-
	Golga1	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1	IMAGE:578069	2 B
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:1225946	12
	Xpot	Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	IMAGE:639640	10 D3
	Lrba	LPS-responsive beige-like anchor	IMAGE:573828	
	Col6a1	Procollagen, type VI, alpha 1	IMAGE:1281632	10 41.1 cM
	Hivep2	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	IMAGE:1282235	10
	EST	-	IMAGE:583270	-
	2010003O18Rik	RIKEN cDNA 2010003O18 gene	IMAGE:583080	5 F
	EST	-	IMAGE:640225	-
	Ide	Insulin degrading enzyme	IMAGE:574241	19 C2

Genes Reprimidos	Mat2b	Methionine adenosyltransferase II, beta	IMAGE:583812	11 A5
	Glb1	Galactosidase, beta 1	IMAGE:583856	9 F3
	NKRF	NF-kappaB repressing factor	IMAGE:21961	Xq24
	EST	-	IMAGE:640247	-
	EST	-	IMAGE:583438	-
	Ppm1h	Protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	IMAGE:583693	10 D2
	Gfi1	Growth factor independent 1	IMAGE:640751	5 F
	EST	-	IMAGE:640367	-
	Letm2	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2	IMAGE:1224844	8 A2
	BC030183	CDNA sequence BC030183	IMAGE:575904	4 D2.2
	Il4	Interleukin 4	IMAGE:640300	11 B1.3
	D4Wsu53e	DNA segment, Chr 4, Wayne State University 53, expressed	IMAGE:583830	4 D3
	EST	-	IMAGE:583854	-
	EST	-	IMAGE:576256	-
	EST	-	IMAGE:583215	-
	D430001N20	Hypothetical protein D430001N20	IMAGE:583191	6 C1
	1500032D16Rik	RIKEN cDNA 1500032D16 gene	IMAGE:583789	17 A3.3
	Cd4	CD4 antigen	IMAGE:640273	6 F2
	EST	-	IMAGE:575206	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:575368	2
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:583382	5
	EST	-	IMAGE:640986	-
	EST	-	IMAGE:583429	-
	EST	-	IMAGE:640117	-
	Laptm5	Lysosomal-associated protein transmembrane 5	IMAGE:639946	4 D2.3
	EST	-	IMAGE:640813	-
	Pcbp3	Poly(rC) binding protein 3	IMAGE:583766	10 B5.1-B5.3
	Rnpep	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	IMAGE:582632	1 E4
	EST	-	IMAGE:583601	-
	Shmt1	Serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)	IMAGE:573743	11 B2
	Ankrd37	Ankyrin repeat domain 37	IMAGE:576620	8 B1.1
	Chchd8	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8	IMAGE:574276	7 E2
	EST	-	IMAGE:640817	-
	2410022M11Rik	RIKEN cDNA 2410022M11 gene	IMAGE:640727	14
	G3bp1	ãs-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1	IMAGE:640974	11 B1.3
	Prss16	Protease, serine, 16 (thymus)	IMAGE:640501	13 A3-A5
	Jak2	Janus kinase 2	IMAGE:5068946	19 C1
	Chd1	Chromodomain helicase DNA binding protein 1	IMAGE:640262	17 A2
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1
	EST	-	IMAGE:640663	-
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1

Genes Reprimidos	Hipk1	Homeodomain interacting protein kinase 1	IMAGE:583858	3 F3
	2510003E04Rik	RIKEN cDNA 2510003E04 gene	IMAGE:640070	10 B4
	Itm2b	Integral membrane protein 2B	IMAGE:640094	14 D2
	Map3k11	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	IMAGE:575211	19 A
	EST	-	IMAGE:583245	-
	Sit1	Suppression inducing transmembrane adaptor 1	IMAGE:576098	4 B1
	EST		IMAGE:640609	-
	Tbce	Tubulin-specific chaperone e	IMAGE:582730	13 A1
	Ing2	Inhibitor of growth family, member 2	IMAGE:1225637	8 B2
	Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	IMAGE:581909	15 D3
	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25	IMAGE:575567	8 A1.1
	EST	-	IMAGE:640272	-
	C1orf61	Chromosome 1 open reading frame 61	IMAGE:43771	1q22
	Ada	Adenosine deaminase	IMAGE:577879	2 H3
	E2f2	E2F transcription factor 2	IMAGE:640754	4 D3
	EST	-	IMAGE:640791	
	Tdg	Thymine DNA glycosylase	IMAGE:642198	10 C1

Tabela V. Genes diferencialmente expressos (53) e com significância estatística de acordo com o programa SAM (FDR = 0,20 e delta = 0,414) em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e não tratados (controle).

Expressão	Símbolo	Nome	CloneID	Citobanda
Genes Induzidos	Fbxl11	F-box and leucine-rich repeat protein 11	IMAGE:639916	19 A
	EST	-	IMAGE:582948	-
	EST	-	IMAGE:576020	-
	Trim17	Tripartite motif protein 17	IMAGE:1263520	11 B1.2-B1.3
	A430079K02	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A430079K02 product:unclassifiable, full insert sequence	IMAGE:640409	12
	Cd34	CD34 antigen	IMAGE:573426	1 H6
	EST	-	IMAGE:583243	-
	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	IMAGE:573066	14 C2
	2310035C23Rik	RIKEN cDNA 2310035C23 gene	IMAGE:573037	1 D
	Fbxo46	F-box protein 46	IMAGE:1330038	7 A3
	Ankrd16	Ankyrin repeat domain 16	IMAGE:583852	2 A1
	Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	IMAGE:641074	7 B1
	Abca5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	IMAGE:582867	11 E1
	EST	-	IMAGE:582988	-
	EST	-	IMAGE:573496	-
	EST	-	IMAGE:640539	-
	2610318N02Rik	RIKEN cDNA 2610318N02 gene	IMAGE:1263539	16 A3
	Es2el	Expressed sequence 2 embryonic lethal	IMAGE:583108	16 B1-B3
	Fen1	Flap structure specific endonuclease 1	IMAGE:639819	19 A
	C230096C10Rik	RIKEN cDNA C230096C10 gene	IMAGE:583779	4 D3
	Alg9	Asparagine-linked glycosylation 9 homolog (yeast, alpha 1,2 mannosyltransferase)	IMAGE:639947	9 A5.3
	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	IMAGE:575486	12 F1-F2
	EST	-	IMAGE:576044	-
Genes Reprimidos	Ankrd37	Ankyrin repeat domain 37	IMAGE:576620	8 B1.1
	Shmt1	Serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)	IMAGE:573743	11 B2
	TLR2	Toll-like receptor 2	IMAGE:4753177	4q32
	CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	IMAGE:2119876	3p21.31
	NKRF	NF-kappaB repressing factor	IMAGE:21961	Xq24
	Jak2	Janus kinase 2	IMAGE:5068946	19 C1
	EST	-	IMAGE:640117	-
	Prss16	Protease, serine, 16 (thymus)	IMAGE:640501	13 A3-A5

Genes Reprimidos	Taf12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	IMAGE:583488	4 D2.3
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1
	Anxa1	Annexin A1	IMAGE:640284	19 B
	G3bp1	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1	IMAGE:640974	11 B1.3
	Ptptra	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	IMAGE:583653	2 G
	EST	-	IMAGE:575206	-
	Rc3h2	Ring finger and CCCH-type zinc finger domains 2	IMAGE:583335	2 B
	Snora69	Small nucleolar RNA, H/ACA box 69	IMAGE:640343	X A3.3
	EST	-	IMAGE:640367	-
	EST	-	IMAGE:640391	-
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1
	EST	-	IMAGE:640986	-
	Mis12	MIS12 homolog (yeast)	IMAGE:583716	11 B4
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:575368	2
	EST	-	IMAGE:575350	-
	EST	-	IMAGE:583269	-
	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	IMAGE:1247019	6 C
	2410022M11Rik	RIKEN cDNA 2410022M11 gene	IMAGE:640727	14
	EST	-	IMAGE:640609	-
	Tbce	Tubulin-specific chaperone e	IMAGE:582730	13 A1
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:1225946	12 A1.3
	EST	-	IMAGE:583009	-

Tabela VI . Genes diferencialmente expressos (370) e com significância estatística de acordo com o programa SAM (FDR = 0,20 e delta = 0,448) em amostras de estroma de timos em cultura ATOC de camundongos NOD pré-autoimunes tratados com RNAi Aire e com RNAi controle.

Expressão	Símbolo	Nome	CloneID	Citobanda
Genes Induzidos	Dctn4	Dynactin 4	IMAGE:640452	18 D2
	EST	-	IMAGE:641020	-
	EST	-	IMAGE:639831	-
	EST	-	IMAGE:640743	-
	EST	-	IMAGE:640118	-
	Pphln1	Periphilin 1	IMAGE:639744	15 E3
	2310037I24Rik	RIKEN cDNA 2310037I24 gene	IMAGE:640331	15 F2
	EST	-	IMAGE:640934	-
	Paqr8	Progesterin and adipoQ receptor family member VIII	IMAGE:575398	1 A5
	EST	-	IMAGE:640924	-
	Hrh3	Histamine receptor H 3	IMAGE:573677	2 H4
	Ube2v1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	IMAGE:583840	2 49.6 cM
	4932433N03Rik	RIKEN cDNA 4932433N03 gene	IMAGE:640355	9
	Hsp110	Heat shock protein 110	IMAGE:582878	5 G3
	EST	-	IMAGE:583456	-
	Nlk	Nemo like kinase	IMAGE:583331	11 B5
	Arpp21	Cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	IMAGE:582891	9 F3
	EST	-	IMAGE:641075	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640875	7
	EST	-	IMAGE:582940	-
	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	IMAGE:573066	14 C2
	Rbm39	RNA binding motif protein 39	IMAGE:640923	2 H1
	EST	-	IMAGE:640037	-
	9130404D08Rik	RIKEN cDNA 9130404D08 gene	IMAGE:583561	8 C1
	Acat3	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase	IMAGE:583609	17 A1
	D14Ert449e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	IMAGE:640010	14 B
	Sox4	SRY-box containing gene 4	IMAGE:573051	13 A3-A5
	EST	-	IMAGE:583611	-
	EST	-	IMAGE:640588	-
	Arhgap4	Rho GTPase activating protein 4	IMAGE:582914	X A7.3
	Sfrs1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	IMAGE:640898	11 C
	EST	-	IMAGE:640948	-
	Rpl18a	Ribosomal protein L18A	IMAGE:583588	8 B3.3
	EST	-	IMAGE:583130	-
	Rpl7a	Ribosomal protein L7a	IMAGE:582916	2 A3
	Aim1	Absent in melanoma 1	IMAGE:640153	10 B2
	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2	IMAGE:581748	X A7.3
	Sirt3	Sirtuin 3 (silent mating type information regulation 2, homolog) 3 (S. cerevisiae)	IMAGE:640394	7 F4

Genes Induzidos	EST	-	IMAGE:575254	-
	EST	-	IMAGE:582106	-
	EST	-	IMAGE:583395	-
	Anxa3	Annexin A3	IMAGE:573265	5 E3
	EST	-	IMAGE:640642	-
	Es2el	Expressed sequence 2 embryonic lethal	IMAGE:583108	16 B1-B3
	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	IMAGE:574694	19 B1-3
	EST	-	IMAGE:640424	-
	Tor1aip1	Torsin A interacting protein 1	IMAGE:639754	1 G3
	Nf2	Neurofibromatosis 2	IMAGE:640467	11 A1
	EST	-	IMAGE:640105	-
	Hexb	Hexosaminidase B	IMAGE:575852	13 D1
	EST	-	IMAGE:582796	-
	Clec1b	C-type lectin domain family 1, member b	IMAGE:574821	6 F3
	EST	-	IMAGE:583897	-
	EST	-	IMAGE:640562	-
	EST	-	IMAGE:640933	-
	Prkar2b	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	IMAGE:640704	12 B1
	EST	-	IMAGE:583899	-
	EST	-	IMAGE:640795	-
	Dnaja2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	IMAGE:1225247	8 C4
	Myg1	Melanocyte proliferating gene 1	IMAGE:640034	15 F3
	Grk6	G protein-coupled receptor kinase 6	IMAGE:640178	13 B1-3
	Eif4ebp2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	IMAGE:582913	10 B4-B5
	EST	-	IMAGE:582865	-
	Nup50	Nucleoporin 50	IMAGE:639698	15 E2
	EST	-	IMAGE:640428	-
	EST	-	IMAGE:640404	-
	EST	-	IMAGE:640539	-
	Nol7	Nucleolar protein 7	IMAGE:640296	13 A4
	EST	-	IMAGE:640680	-
	EST	-	IMAGE:640984	-
	EST	-	IMAGE:640957	-
	Rbms1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	IMAGE:583875	2 C3
	Fen1	Flap structure specific endonuclease 1	IMAGE:639819	19 A
	Lrpap1	Low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	IMAGE:639699	5 B2
	EST	-	IMAGE:640633	-
	Dtymk	Deoxythymidylate kinase	IMAGE:583035	1 D
	0610038F07Rik	RIKEN cDNA 0610038F07 gene	IMAGE:583455	19 A
	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	IMAGE:575486	12 F1-F2
	Dnpep	Aspartyl aminopeptidase	IMAGE:641031	1 C3

Genes Induzidos	A4galt	Alpha 1,4-galactosyltransferase	IMAGE:582967	15 E1
	Pltp	Phospholipid transfer protein	IMAGE:640088	2 H3
	EST	-	IMAGE:640373	-
	Wrnip1	Werner helicase interacting protein 1	IMAGE:583479	13 A4
	EST	Transcribed locus, strongly similar to XP_489089.1 hypothetical protein XP_489089 [Mus musculus]	IMAGE:639996	-
	Ppp1r14b	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B	IMAGE:639973	19 A
	Errfi1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	IMAGE:640765	4 E1
	EST	-	IMAGE:583267	-
	Nck2	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2	IMAGE:640608	1 C1
	EST	-	IMAGE:583319	-
	Enoph1	Enolase-phosphatase 1	IMAGE:640354	5 E4
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:583511	17
	EST	-	IMAGE:583103	-
	Flna	Filamin, alpha	IMAGE:640772	X A7.3
	EST	-	IMAGE:641087	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640175	2
	Ebi3	Epstein-Barr virus induced gene 3	IMAGE:1265208	17 C
	EST	-	IMAGE:583367	-
	EST	-	IMAGE:640853	-
	EST	-	IMAGE:583223	-
	EST	-	IMAGE:583365	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640684	9
	Sfrs5	Splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS)	IMAGE:583131	12 D2
	EST	-	IMAGE:583106	-
	Smpd4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4	IMAGE:640732	16 B1
	EST	-	IMAGE:640252	-
	Ctsl	Cathepsin L	IMAGE:583530	13 B3
	EST	-	IMAGE:640900	-
	EST	-	IMAGE:641100	-
	Hdac1	Histone deacetylase 1	IMAGE:641105	4 D2.2
	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31	IMAGE:574060	X A6
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:639995	13
	EG621205	Predicted gene, EG621205	IMAGE:640982	X D
	Pkig	Protein kinase inhibitor, gamma	IMAGE:583036	2 H3
	EST	-	IMAGE:575672	-
	Nlk	Nemo like kinase	IMAGE:582998	11 B5
	EST	-	IMAGE:640766	-
	EST	-	IMAGE:641131	-
	Hcst	Hematopoietic cell signal transducer	IMAGE:640698	7 B1
	Glr5	Glutaredoxin 5 homolog (S. cerevisiae)	IMAGE:640672	12 E
	EST	-	IMAGE:640372	-

Genes Induzidos	EST	-	IMAGE:640981	-
	Myh11	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	IMAGE:583021	16 A1
	EST	-	IMAGE:639732	-
	EST	-	IMAGE:640909	-
	EST	-	IMAGE:640884	-
	Klhdc5	Kelch domain containing 5	IMAGE:640756	6 G3
	EST	-	IMAGE:583294	-
	Wdsub1	WD repeat, SAM and U-box domain containing 1	IMAGE:640769	2 C3
	Nol6	Nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	IMAGE:583756	4 A5
	Sh3yl1	Sh3 domain YSC-like 1	IMAGE:641043	12 A2
	EST	-	IMAGE:583636	-
	EST	-	IMAGE:640812	-
	2610318N02Rik	RIKEN cDNA 2610318N02 gene	IMAGE:1263539	16 A3
	3110001D03Rik	RIKEN cDNA 3110001D03 gene	IMAGE:641030	4 C3
	Fem1	Fem-1 homolog c (C.elegans)	IMAGE:1226596	18 C
	Eif5	Eukaryotic translation initiation factor 5	IMAGE:582912	12 F1
	EST	-	IMAGE:583299	-
	EST	-	IMAGE:583780	-
	Trim62	Tripartite motif-containing 62	IMAGE:640707	4 D2.2
	Tmem115	Transmembrane protein 115	IMAGE:582843	9 F1
	2310035C23Rik	RIKEN cDNA 2310035C23 gene	IMAGE:573037	1 D
	2810455D13Rik	RIKEN cDNA 2810455D13 gene	IMAGE:582820	-
	EST	-	IMAGE:639724	-
	EST	-	IMAGE:640972	-
	EST	-	IMAGE:573496	-
	6720401G13Rik	RIKEN cDNA 6720401G13 gene	IMAGE:583020	X A4
	EST	-	IMAGE:640964	-
	Hs3st3b1	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	IMAGE:640008	11 B3
	Trim17	Tripartite motif protein 17	IMAGE:1263520	11 B1.2-B1.3
	Cd34	CD34 antigen	IMAGE:573426	1 H6
	4932438H23Rik	RIKEN cDNA 4932438H23 gene	IMAGE:1264334	16 C3.3
	Msc	Musculin	IMAGE:640142	1 A3
	EST	-	IMAGE:582879	-
	EST	-	IMAGE:640767	-
	EST	-	IMAGE:583924	-
	Golt1b	Golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)	IMAGE:639999	6 G1
	C230096C10Rik	RIKEN cDNA C230096C10 gene	IMAGE:583779	4 D3
	BC038156	CDNA sequence BC038156	IMAGE:640980	9 A4
	Fbxl20	F-box and leucine-rich repeat protein 20	IMAGE:582950	11 D
	Dopey1	Dopey family member 1	IMAGE:641044	9 E3.1
	Wdr12	WD repeat domain 12	IMAGE:640744	1 C1-C2
	EST	-	IMAGE:582864	-

Genes Induzidos	EST	-	IMAGE:640852	-
	EST	-	IMAGE:640384	-
	Stard9	START domain containing 9	IMAGE:640768	2 F1
	Maea	Macrophage erythroblast attacher	IMAGE:583828	5 B1-B2
	Dock8	Dedicator of cytokinesis 8	IMAGE:639971	19 B
	EST	-	IMAGE:640770	-
	Dpm1	Dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1	IMAGE:640729	2 H3
	EST	-	IMAGE:576044	-
	EST	-	IMAGE:640632	-
	Ankrd16	Ankyrin repeat domain 16	IMAGE:583852	2 A1
	S100pbp	S100P binding protein	IMAGE:640965	4 D2.3
	EST	-	IMAGE:576020	-
Genes Reprimidos	Xpot	Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	IMAGE:639640	10 D3
	EST	-	IMAGE:641158	-
	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	IMAGE:573624	16 B1
	Hipk1	Homeodomain interacting protein kinase 1	IMAGE:583858	3 F3
	EST	-	IMAGE:639730	-
	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	IMAGE:1247019	6 C
	EST	-	IMAGE:640518	-
	Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	IMAGE:581872	10 A4
	Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	IMAGE:573572	9 F
	Ing2	Inhibitor of growth family, member 2	IMAGE:1225637	8 B2
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:582892	-
	Lrba	LPS-responsive beige-like anchor	IMAGE:573828	-
	EST	-	IMAGE:640521	-
	EST	-	IMAGE:576256	-
	Myb	Myeloblastosis oncogene	IMAGE:575702	10 A3
	Styx	Phosphoserine/threonine/tyrosine interaction protein	IMAGE:582720	14 C1
	Aars	Alanyl-tRNA synthetase	IMAGE:640995	8 E1
	EST	-	IMAGE:0	-
	Xpot	Exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	IMAGE:639806	10 D3
	EST	-	IMAGE:640247	-
	EST	-	IMAGE:0	-
	EST	-	IMAGE:583240	-
	Mapre2	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	IMAGE:572898	18 A2
	Rab2	RAB2, member RAS oncogene family	IMAGE:573835	4 A1
	Rbm39	RNA binding motif protein 39	IMAGE:583614	2 H1
	EST	-	IMAGE:575796	-
	Hsp90b1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	IMAGE:575854	10 C1
	EST	-	IMAGE:582823	-
	A430079K02	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A430079K02 product:unclassifiable	IMAGE:640409	12

Genes Reprimidos	Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IMAGE:575371	19 C1
	Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	IMAGE:575387	11 E2
	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	IMAGE:575608	8 A2
	EST	-	IMAGE:583429	-
	1810062O18Rik	RIKEN cDNA 1810062O18 gene	IMAGE:1429187	14 A2
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1
	Chd1	Chromodomain helicase DNA binding protein 1	IMAGE:640262	17 A2
	EST	-	IMAGE:640117	-
	Prss16 (TSSP)	Protease, serine, 16 (thymus)	IMAGE:640501	13 A3-A5
	Jak2	Janus kinase 2	IMAGE:5068946	19 C1
	EST	-	IMAGE:640272	-
	EST	-	IMAGE:640663	-
	Il5	Interleukin 5	IMAGE:972705	11 A5
	2410022M11Rik	RIKEN cDNA 2410022M11 gene	IMAGE:640727	14
	E2f2	E2F transcription factor 2	IMAGE:640754	4 D3
	Zhx1	Zinc fingers and homeoboxes protein 1	IMAGE:640278	-
	EST	-	IMAGE:640817	-
	Pthr1	Peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog (S. cerevisiae)	IMAGE:583513	2 B
				13 B1
	Cxcl14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	IMAGE:583442	
	Pdia4	Protein disulfide isomerase associated 4	IMAGE:4971952	6 B2.3
	EST	-	IMAGE:640367	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:640343	X
	G3bp	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1	IMAGE:640974	11 B1.3
	Sit1	Suppression inducing transmembrane adaptor 1	IMAGE:576098	4 B1
	Chchd8	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8	IMAGE:574276	7 E2
	Casp8	Caspase 8	IMAGE:5099113	1 B
	EST	-	IMAGE:583879	-
	Plxnc1	Plexin C1	IMAGE:583517	10 C3
	EST	-	IMAGE:575206	-
	Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2	IMAGE:1225539	15 D2
	Cd4	CD4 antigen	IMAGE:640273	6 F2
	ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	IMAGE:1655018	2q21
	1500032D16Rik	RIKEN cDNA 1500032D16 gene	IMAGE:583789	17 A3.3
	Rrp1b	Ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)	IMAGE:575876	17 B1

Genes Reprimidos	1110018J18Rik	RIKEN cDNA 1110018J18 gene	IMAGE:639771	13 B3
	EST	-	IMAGE:575350	-
	Hist1h2bc	Histone cluster 1, H2bc	IMAGE:640662	13 A3.1
	Rpp30	Ribonuclease P/MRP 30 subunit (human)	IMAGE:638902	19 C2
	Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	IMAGE:574837	1 E4
	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A	IMAGE:583260	12 A2-A3
	Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1	IMAGE:641129	18 D3
	EST	-	IMAGE:573897	-
	Zmat5	Zinc finger, matrin type 5	IMAGE:574272	11 A1
	Nxf1	Nuclear RNA export factor 1 homolog (S. cerevisiae)	IMAGE:574499	19 A
	Casp2	Caspase 2	IMAGE:573760	6 B2.1
	EST	-	IMAGE:575868	-
	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	IMAGE:576563	3 G1
	Tnfrsf4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	IMAGE:573690	4 E2
	Letm2	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2	IMAGE:1224844	8 A2
	Gfi1	Growth factor independent 1	IMAGE:640751	5 F
	BC030183	CDNA sequence BC030183	IMAGE:575904	4 D2.2
	EST	Adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5830477H05 product:hypothetical protein, full insert sequence	IMAGE:583030	19
	Golga1	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1	IMAGE:578069	2 B
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:1225946	12
	Shc1	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1	IMAGE:574066	3 F1
	ACVRL1	Activin A receptor type II-like 1	IMAGE:182661	12q11-q14
	Cd27	CD antigen 27	IMAGE:575719	6 F3
	Tnfrsf13b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	IMAGE:574040	11 B2
	Slbp	Stem-loop binding protein	IMAGE:583806	5 B2
	EST	-	IMAGE:640791	-
	EST	-	IMAGE:582680	-
	Ide	Insulin degrading enzyme	IMAGE:574949	19 C2
	Tapt1	Transmembrane anterior posterior transformation 1	IMAGE:576636	5 B3
	Ier5	Immediate early response 5	IMAGE:574793	1 G3
	C1orf61	Chromosome 1 open reading frame 61	IMAGE:43771	1q22
	Prkra	Protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator	IMAGE:583424	2 C3
	Glb1	Galactosidase, beta 1	IMAGE:583856	9 F3
	EST	-	IMAGE:583215	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:583763	6

Genes Reprimidos	EST	-	IMAGE:640986	-
	EST	-	IMAGE:640793	-
	Ube2r2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	IMAGE:582562	4 B1
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:138013	X
	Ypel2	Yippee-like 2 (Drosophila)	IMAGE:576464	11 C
	Ppm1h	Protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	IMAGE:583693	10 D2
	Anxa4	Annexin A4	IMAGE:583430	6 D1
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:575368	2
	Lef1	Lymphoid enhancer binding factor 1	IMAGE:575374	3 G3
	Tcrg-C	T-cell receptor gamma, constant region	IMAGE:640129	13 A2
	Smc4	Structural maintenance of chromosomes 4	IMAGE:582900	3 E2
	EST	-	IMAGE:639784	-
	D430001N20	Hypothetical protein D430001N20	IMAGE:583191	6 C1
	EST	-	IMAGE:583470	-
	5730494M16Rik	RIKEN cDNA 5730494M16 gene	IMAGE:583861	18 A2
	Egr1	Early growth response 1	IMAGE:576070	18 C/D
	Il4	Interleukin 4	IMAGE:640300	11 B1.3
	ME3	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	IMAGE:41204	11cen-q22.3
	Rybp	RING1 and YY1 binding protein	IMAGE:583880	-
	EST	-	IMAGE:583908	-
	H2-K1	Histocompatibility 2, K1, K region	IMAGE:583704	17 B1
	EST	-	IMAGE:583438	-
	EST	-	IMAGE:583244	-
	Mll5	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5	IMAGE:583357	5 A3
	Mecp2	Methyl CpG binding protein 2	IMAGE:576274	X A7.3
	Sept1	Septin 1	IMAGE:583672	7 F4
	Skap1	Src family associated phosphoprotein 1	IMAGE:573833	11 D
	EST	-	IMAGE:583854	-
	2510003E04Rik	RIKEN cDNA 2510003E04 gene	IMAGE:640070	10 B4
	Rcor1	REST corepressor 1	IMAGE:575972	12 F1
	D4Wsu53e	DNA segment, Chr 4, Wayne State University 53, expressed	IMAGE:583830	4 D3
	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	IMAGE:34778	6p12
	EST	-	IMAGE:640813	-
	EST	Mus musculus, clone IMAGE:1329925, mRNA	IMAGE:583612	3
	Nkx6-2	NK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)	IMAGE:576409	7 F4
	Maea	Macrophage erythroblast attacher	IMAGE:575996	5 B1-B2
	Dph5	DPH5 homolog	IMAGE:583454	3 G1
	Gdap2	Ganglioside-induced differentiation-associated-protein 2	IMAGE:641674	3 F2.2

Genes Reprimidos	Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family	IMAGE:575981	9 A2-A3
	EST	-	IMAGE:583814	-
	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	IMAGE:135671	12q11-q13
	Hivep2	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	IMAGE:1282235	-
	Hnrp12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	IMAGE:576590	19 A
	Ercc5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	IMAGE:642033	1 B
	Pcmd2	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	IMAGE:641904	2 H4
	EST	CDNA, clone:Y1G0121D18, strand:minus, reference:ENSEMBL:Mouse-Transcript-ENST:ENSMUST00000048144, based on BLAT search	IMAGE:640759	1
	MSN	Moesin	IMAGE:583860	X C3
	EST	-	IMAGE:640794	-
	Transcribed locus	Transcribed locus	IMAGE:583382	5
	Pcbp3	Poly(rC) binding protein 3	IMAGE:583766	10 B5.1-B5.3
	EST	-	IMAGE:583928	-
	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	IMAGE:583302	1 C1.1
	Cep78	Centrosomal protein 78	IMAGE:641590	19 A
	Ccdc77	Coiled-coil domain containing 77	IMAGE:1265465	6 F1
	Rab28	RAB28, member RAS oncogene family	IMAGE:1328024	5 B2
	Ythdf1	YTH domain family 1	IMAGE:573974	2 H4
	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	IMAGE:640025	17 D
	Ide	Insulin degrading enzyme	IMAGE:574241	19 C2
	Arpc2	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	IMAGE:574365	1 C3
	Gbp2	Guanylate nucleotide binding protein 2	IMAGE:583808	3 H1
	NKRF	NF-kappaB repressing factor	IMAGE:21961	Xq24
	Tcea3	Transcription elongation factor A (SII), 3	IMAGE:573147	4 D3
	Rbm15b	RNA binding motif protein 15B	IMAGE:583849	9 F1
	Ankrd37	Ankyrin repeat domain 37	IMAGE:576620	8 B1.1
	EST	-	IMAGE:583601	-
	Rnpep	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	IMAGE:582632	1 E4
	EST	-	IMAGE:583087	-
	EST	-	IMAGE:640794	-
	Shmt1	Serine hydroxymethyl transferase 1 (soluble)	IMAGE:573743	11 B2

Genes Reprimidos	EST	-	IMAGE:640792	-
	Laptm5	Lysosomal-associated protein transmembrane 5	IMAGE:639946	4 D2.3
	Serinc5	Serine incorporator 5	IMAGE:583286	13 C3
	Sec31a	SEC31 homolog A (S. cerevisiae)	IMAGE:583334	5 E3
	Zmynd10	Zinc finger, MYND domain containing 10	IMAGE:1225083	9 F1
	EST	-	IMAGE:576262	-
	Nucks1	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	IMAGE:573338	1 E4
	Gpbp1	GC-rich promoter binding protein 1	IMAGE:583064	13 D2.1
	Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	IMAGE:581909	15 D3
	Amica1	Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	IMAGE:640276	9 A5.2
	Golga4	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	IMAGE:639987	9 F3
	1110001A16Rik	RIKEN cDNA 1110001A16 gene	IMAGE:640188	-
	Ttc3	Tetratricopeptide repeat domain 3	IMAGE:583646	16 C3.3-4
	Tdg	Thymine DNA glycosylase	IMAGE:642198	10 C1
	Tbce	Tubulin-specific chaperone e	IMAGE:582730	13 A1
	EST	-	IMAGE:640609	-
	Mat2b	Methionine adenosyltransferase II, beta	IMAGE:583812	11 A5
	Itm2b	Integral membrane protein 2B	IMAGE:640094	14 D2
	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25	IMAGE:575567	8 A1.1
	Map3k11	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 11	IMAGE:575211	19 A
	Ada	Adenosine deaminase	IMAGE:577879	2 H3
	EST	-	IMAGE:583269	-
	Ier5	Immediate early response 5	IMAGE:639672	1 G3
	EST	-	IMAGE:640225	-
	Tox	Thymocyte selection-associated HMG box gene	IMAGE:573967	4 A1
	Icam2	Intercellular adhesion molecule 2	IMAGE:574542	11 E1
	EST	-	IMAGE:583270	-
	EST	-	IMAGE:583245	-
	EST	-	IMAGE:583009	-