UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

NICOLE PEZZI

**A função do gene *Autoimmune Regulator* (Aire) no
controle da adesão de células tímicas epiteliais
medulares com timócitos**

Ribeirão Preto

2016

NICOLE PEZZI

**A função do gene *Autoimmune Regulator* (Aire) no
controle da adesão de células tímicas epiteliais
medulares com timócitos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia
Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo
da Silva Passos

**Ribeirão Preto
2016**

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

Catálogo da Publicação

Pezzi, Nicole

A função do gene *Autoimmune Regulator* (Aire) no controle da adesão de células tímicas epiteliais medulares com timócitos / Nicole Pezzi; orientador Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior. - Ribeirão Preto, 2015.

216f. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

1. Células tímicas epiteliais medulares (mTECs). 2. Gene *Autoimmune Regulator* (Aire). 3. Timócitos. 4. Ensaio de adesão celular. 5. Expressão gênica

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), da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto Individual Processo 13/17481-1;
 - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
 - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP - USP.
-

Nome: PEZZI, Nicole

Título: A função do gene *Autoimmune Regulator* (Aire) no controle da adesão de células tímicas epiteliais medulares com timócitos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

*Aos meus pais Jaime e Lorita, à minha
irmã Natália e ao meu namorado
Gabriel com gratidão pelo incentivo
e incansável apoio ao longo de toda
minha jornada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram e participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

Agradeço 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, pelo incentivo diário e pelos ensinamentos transmitidos durante meu mestrado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por proporcionar condições para a realização deste trabalho.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP pelos conhecimentos a mim repassados e contribuições na minha formação.

Agradeço aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP pela agradável convivência. Em especial à secretária Ana Cristine S. Ferreira pelo carinho, dedicação, disponibilidade e empenho ao longo desses anos.

Agradeço aos pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP pela amizade e agradável convivência. Agradeço especialmente ao Dr Djalma de Souza Lima Júnior pela colaboração nas análises dos dados de citometria de fluxo e à Dra Paula Barbim Donate Yabuta pela amizade e por ter fornecido os anticorpos para a fenotipagem dos timócitos.

Agradeço aos pós-graduandos, docentes e funcionários do Departamento de Genética da FMRP, pela amizade e agradável convivência.

Agradeço ao Prof. Dr. Wilson Savino da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ), por ter aberto as portas do seu laboratório e em especial à Prof. Dra Daniella Arêas Mendes-da-Cruz por ter disponibilizado seu tempo para me ensinar a realizar o ensaio de adesão e pelas discussões científicas sempre interessantes e enriquecedoras.

Agradeço ao Prof. Dr. Roy Larson do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP, por ter fornecido o suporte inicial necessário para a execução da técnica de *western blot* e, em especial, ao Ms. Gabriel Sarti Lopes pela grande ajuda na padronização e execução dos *western blots* e por estar sempre disposto a colaborar com o que fosse necessário.

Agradeço à Prof. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado e ao funcionário Roger Rodrigo Fernandes do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelo suporte para a realização das marcações e imagens de imunofluorescência.

Agradeço à funcionária do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, Elizabete Rosa (Bete) pela amizade, pelo apoio técnico e por estar sempre disposta ajudar. Agradeço também à funcionária do Laboratório de Citometria, Denise Ferraz pela ajuda na manipulação do citômetro de fluxo e na aquisição das amostras.

Agradeço aos amigos e colegas (de todas as épocas) do Grupo de Imunogenética pela convivência extremamente agradável, pelo companheirismo, pelas colaborações e pela troca de experiências ao longo dos anos. Agradeço em especial à amiga Dra Cláudia Macedo por ter me ensinado técnicas de cultura celular e biologia molecular. À amiga Dra Amanda Freire de Assis Riccardi pela valiosa e imprescindível ajuda na análise dos microarrays e por estar sempre disposta a ajudar no que fosse necessário. Às amigas Ms Maritza Queiroz Salas Mosella e Larissa Cotrim pela ajuda nos ensaios de adesão e fenotipagem das células. Agradeço também aos amigos Cesar Speck e Rafaela Felício pela convivência diária. E, finalmente, agradeço à Tânia Silva Sousa, funcionária do laboratório de Imunogenética Molecular pela amizade e incentivo diário.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais e à minha irmã pelo suporte emocional, apoio incondicional e incansável incentivo durante toda a minha vida acadêmica. Agradeço também a todos os meus amigos pessoais amizade e carinho.

Agradeço aos meus queridos colegas e amigos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Elviane Campi Ferreira da Silva (Vi), à Adriane Araújo de Oliveira (Dri) e ao Luiz Francisco Reato de Oliveira (Fran) por todo o apoio e carinho dispensados a mim durante a realização do meu mestrado.

Agradeço à Prof. Dra Daniella Arêas Mendes-da-Cruz e ao Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo, membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço à Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro, e agradeço especialmente à FAPESP (Projeto Individual - Processo 13/17481-1) pelo fomento que possibilitou a realização desse projeto

Finalmente, agradeço a todos aqueles que, mesmo não tendo sido mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Há uma única luz da ciência, e iluminá-la é em qualquer lugar
iluminá-la em toda parte”.*

Isaac Asimov

RESUMO

PEZZI, N. **A função do gene *Autoimmune Regulator* (Aire) no controle da adesão de células tímicas epiteliais medulares com timócitos.** 2016. 216f Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O *crosstalk* entre timócitos e células epiteliais tímicas é crucial para o desenvolvimento das células T e estabelecimento da tolerância central. Células tímicas epiteliais medulares (mTECs) contribuem para a autotolerância por meio da expressão ectópica de antígenos restritos aos tecidos (TRAs). A expressão de TRAs em mTECs é altamente dependente do gene *Autoimmune Regulator* (Aire). Por meio do reconhecimento de TRAs com alta afinidade, células T autoreativas são selecionadas negativamente do pool de timócitos em desenvolvimento. Apesar do papel de Aire na indução da tolerância central ser bem conhecido, os mecanismos celulares e moleculares precisos do processo permanecem obscuros. Nesse estudo, hipotetizamos que perturbações na expressão do gene Aire influenciam a adesão entre mTECs e timócitos, o que poderia resultar em um desequilíbrio na imunotolerância a antígenos próprios. Um ensaio funcional realizado com timócitos frescos, extraídos de um timo normal de camundongo e cocultivados com células epiteliais tímicas medulares da linhagem mTEC 3.10, demonstrou que a inibição do gene Aire por meio de RNA de interferência reduziu significativamente a capacidade das mTECs de promover a adesão dos timócitos. Análises por *microarray* revelaram que o silenciamento do gene Aire nas células mTEC 3.10 causou a modulação de mais de 1000 genes, alguns que codificam TRAs, outros que codificam proteínas envolvidas na adesão celular, como VCAM-1, e também outros que codificam moléculas coestimuladoras como CD80. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão do papel de Aire no controle da adesão mTEC-timócitos, a qual constitui um processo essencial para a seleção negativa de timócitos autoreativos.

Palavras-chave: Células tímicas epiteliais medulares (mTECs). Gene *Autoimmune Regulator* (Aire). Timócitos. Ensaio de adesão celular. Expressão gênica.

ABSTRACT

PEZZI, N. **The function of *Autoimmune Regulator (Aire)* gene in the control of adhesion between medullary thymic epithelial cells with thymocytes.** 2016. 216f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The crosstalk between thymocytes and thymic epithelial cells is critical for T cell development and the establishment of central tolerance. Medullary thymic epithelial cells (mTECs) contribute to self-tolerance through the ectopic expression of tissue-restricted antigens (TRAs) in the thymus. TRAs expression in mTECs is largely dependent on *Autoimmune Regulator (Aire)* gene. Through the recognition of TRAs with high affinity, developing autoreactive T cells are negatively selected from the pool of developing thymocytes. Although the role of Aire in the induction of central tolerance is well known, the precise cellular and molecular mechanisms remain unclear. In this study, we hypothesize that disturbance in Aire gene expression influences adhesion between mTECs and thymocytes, which could result in an imbalance in immune-tolerance to self-antigens. A functional assay performed with fresh thymocytes dissociated from a normal mouse thymus and co-cultured with a medullary thymic epithelial cell line named mTEC 3.10, demonstrated that Aire RNAi knockdown significantly decreased the ability of mTECs to promote thymocyte adhesion. Microarray analysis revealed that Aire knockdown of the murine mTEC 3.10 cell line led to the modulation of more than 1000 genes, some of them coding for TRAs, others for proteins involved in cell adhesion like VCAM-1 and also for costimulatory molecules like CD80. These results contribute to a better understanding of the role of Aire in the control of mTEC-thymocyte adhesion, which is an essential process for negative selection of autoreactive thymocytes.

Palavras-chave: Medullary thymic epithelial cells(mTECs). *Autoimmune Regulator (Aire)* gene. Thymocytes. Cell adhesion assay. Gene expression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURAIS DO TIMO	16
1.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS TÍMICAS EPITELIAIS	18
1.3 ONTOGENIA E INVOLUÇÃO TÍMICA	18
1.4 MIGRAÇÃO INTRATÍMICA DE CÉLULAS T	22
1.5 ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DAS CÉLULAS T	26
1.5.1 Timócitos duplo-negativos	27
1.5.2 Timócitos duplo-positivos	28
1.5.3 Timócitos simples-positivos	29
1.6 PROCESSOS DE SELEÇÃO NA MATURAÇÃO DAS CÉLULAS T	30
1.6.1 Seleção positiva dos timócitos: desenvolvimento do repertório de células T restritas ao auto-MHC	32
1.6.2 Seleção negativa dos timócitos: indução da tolerância central	33
1.7 A EXPRESSÃO GÊNICA PROMÍSCUA (PGE) EM mTECs	33
1.8 MECANISMOS DE AÇÃO DE AIRE NO CONTROLE DA PGE NO TIMO	37
1.9 AIRE E A AUTOIMUNIDADE	42
1.10 A RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE A EXPRESSÃO DE AIRE COM A ADESÃO mTECs-TIMÓCITOS	45
2. HIPÓTESE	48
3. OBJETIVOS	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
5. MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1 LINHAGEM CELULAR mTEC 3.10	54
5.1.1 Imunofenotipagem da linhagem celular mTEC 3.10	55

5.2 INIBIÇÃO SELETIVA DO TRANSCRITO DO GENE AIRE COM RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi).....	55
5.2.1 Silenciamento do transcrito do gene Aire em cultura de células mTEC 3.10	55
5.2.2 Extração do RNA total	56
5.2.3 Quantificação e Pureza do RNA Total	57
5.2.4 Avaliação da integridade das preparações de RNA total	58
5.2.5 Transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA	59
5.2.6 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das amostras	59
5.3 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU DAS MOLÉCULAS DE mRNA DE Aire (RNA FISH)	61
5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AIRE POR WESTERN BLOT	63
5.4.1 Extração de proteínas totais de células mTEC 3.10	63
5.4.2 Dosagem de proteínas pelo método de <i>Bradford</i>	63
5.4.3 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)	64
5.4.4 Western blot	64
5.5 ENSAIO DE IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA AIRE.....	65
5.6 ENSAIO DE ADESÃO DE CÉLULAS mTEC 3.10 COM TIMÓCITOS.....	67
5.6.1 Separação dos timócitos de camundongos	67
5.6.2 Ensaio de adesão celular	67
5.6.3 Fenotipagem de timócitos e avaliação da apoptose por citometria de fluxo	68
5.7 AVALIAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS mTEC 3.10 APÓS ADESÃO COM TIMÓCITOS	69
5.7.1 Hibridização das lâminas de oligomicroarrays	69
5.7.2 Aquisição das imagens de hibridização	73
5.7.3 Análise dos dados de <i>microarray</i>	74
5.7.4 Enriquecimento funcional dos mRNAs diferencialmente expressos	74
6. RESULTADOS.....	77
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR mTEC 3.10.....	77

6.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL.....	79
6.3 INIBIÇÃO SELETIVA DOS TRANSCRITOS DO GENE AIRE COM RNAi	80
6.4 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU DAS MOLÉCULAS DE RNA MESSAGEIRO DE Aire COM STELLARIS® RNA FISH	81
6.5 WESTERN BLOT DA PROTEÍNA AIRE	84
6.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA PROTEÍNA AIRE	86
6.7 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR mTEC 3.10/TIMÓCITOS.....	88
6.8 FENOTIPAGEM DOS TIMÓCITOS E AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	90
6.9 AVALIAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM mTEC 3.10 QUE PASSARAM PELO ENSAIO DE ADESÃO	93
6.10 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL.....	97
7. DISCUSSÃO	120
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
9. REFERÊNCIAS.....	139
APÊNDICE A - Genes diferencialmente expressos entre as células mTEC 3-10 controle e as que tiveram o gene Aire silenciado por meio de RNAi	160
APÊNDICE B - Genes reprimidos em mTEC 3.10 após o silenciamento do gene Aire que estão associados a expressão em outros tecidos que não o timo ($p>0,05$).	189
ANEXO A - Certificação da comissão de ética em experimentação animal.....	197
ANEXO B: Publicações resultantes de colaborações	198

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E ESTRUTURAIS DO TIMO

O timo é um órgão linfóide primário no qual os precursores de células T passam por um complexo processo de maturação. Trata-se de um órgão altamente especializado cujo microambiente peculiar representado por células linfóides, não linfóides e por componentes da matriz extracelular favorece a produção de um repertório diverso de células T autotolerante e autorrestrito ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Villa-Verde *et al.*, 1995; Rodewald, 2008).

A primeira demonstração do papel crucial do timo no desenvolvimento do sistema imunológico ocorreu em 1961, por Jacques Miller, por meio da remoção cirúrgica do timo (timectomia) de camundongos com três dias de vida. Miller observou que esses animais possuíam tecidos linfóides fracamente desenvolvidos, resposta imune comprometida, suscetibilidade a infecções e deficiência de uma população de linfócitos, posteriormente denominada de células T (MILLER, 2002).

O timo está situado no mediastino anterior (tórax) e é formado por dois lobos. Cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos por septos fibrosos, e cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna. O córtex contém uma densa coleção de linfócitos T em maturação, e a medula levemente corada é mais esparsamente povoada com linfócitos (Figura 1). Células epiteliais não linfóides, que possuem um citoplasma abundante, estão espalhadas pelo timo, assim como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B derivados da medula óssea. Um complexo linfoepitelial, composto por células tímicas "nurse" (TNC) está localizado corticalmente. Essas estruturas multicelulares abrigam cerca de 20-200 linfócitos T em maturação (SAVINO, 2006). Estruturas denominadas corpúsculos de Hassall, que são compostos de espirais de células epiteliais hermeticamente embaladas e que podem ser remanescentes de células em degeneração são encontradas na medula. O timo tem um suprimento vascular abundante e vasos linfáticos eferentes que drenam para os linfonodos do mediastino (Figura 2) (VAN VLIET *et al.*, 1985; BOYD *et al.*, 1993; VAN EWIJK *et al.*, 1994; WU & SHORTMAN, 2005; TAKAHAMA, 2006; KLEIN *et al.*, 2014; PERERA & HUANG, 2015).

Figura 1- (a) Micrografia de um lobo do timo humano corado com hematoxilina e eosina mostrando o córtex e a medula. O córtex externo de coloração mais escura e a medula interna de coloração mais clara estão aparentes. (b) Seção do timo adulto de um camundongo C57BL/6. As células T $CD4^+$ foram marcadas em verde, as $CD8^+$ em azul e as células tímicas epiteliais medulares em vermelho. Os anticorpos utilizados foram: anti- $CD4^+$; anti- $CD8$; e anti-*Ulex europaeus agglutinin 1* (marcador específico de células epiteliais), respectivamente. Células marcadas em ciano indicam a coexpressão de $CD4$ e $CD8$, demonstrando, portanto, células duplo positivas $CD4^+CD8^+$. (Fonte: TAKAHAMA, 2006).

Figura 2 - Esquema representativo da estrutura do timo e de seus componentes celulares (Fonte: Adaptado de Human Embriology: <http://www.embryology.ch/francais/qblood/lymphat03.html>. Acesso em 18/02/2016).

Cada um dos compartimentos tímicos forma um microambiente estromal especializado que é crucial para controlar a maturação das células T. 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 autorreativas (ANDERSON & JENKINSON, 2001). A manutenção do microambiente tímico requer essencialmente interações recíprocas entre as células T em maturação e as células estromais, processo denominado de "crosstalk" tímico (VAN EWIJK et al., 1994, 2000 a, 2000 b; GERMERAAD et al., 2003; GRAY et al., 2006).

1.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS TÍMICAS EPITELIAIS

Os dois principais subconjuntos de células presentes no timo, as células tímicas epiteliais (TECs), são derivadas de células não hematopoiéticas e, portanto, são negativas para a expressão da molécula CD45, e positivas para o marcador de células epiteliais EpCAM (do inglês, Epithelial Cell Adhesion Molecule). Além disso, as TECs corticais (cTECs) e medulares (mTECs) são fenotipicamente distintas: mTECs apresentam a expressão de *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) em sua superfície mas não expressam Ly51 (UEA-1+Ly51-), enquanto que cTECs são UEA-1-Ly51+. Com esses marcadores, podemos basicamente distinguir mTECs e cTECs. Em adição, cTECs maduras expressam altos níveis de MHCII, $\beta 5t$ protease e serina protease timo-específica (TSSP), enquanto que mTECs maduras expressam MHCII, CD80, AIRE (do inglês, autoimmune regulator) e antígenos restritos a tecidos (TRAs) (Revisado por SUN et al., 2014).

1.3 ONTOGENIA E INVOLUÇÃO TÍMICA

A segmentação da faringe posterior constitui o primeiro passo na formação do timo durante o desenvolvimento embrionário. Em camundongos, o timo surge na região faríngea do embrião em desenvolvimento, em um primórdio comum à glândula paratireóide. Este primórdio comum desenvolve-se da terceira bolsa faríngea e do terceiro sulco branquial, e caracteriza-se como uma, de uma série de

estruturas bilaterais da endoderme faríngea, denominadas bolsas faríngeas, as quais formam-se sequencialmente de modo rostro-caudal (Figura 3) (MANLEY, 2000).

Figura 3 - Visão geral do desenvolvimento do timo. (A) As bolsas faríngeanas (pp) formam-se sequencialmente nas superfícies laterais do intestino anterior, com a terceira bolsa (pp3) aparecendo no 9.5 dia do desenvolvimento embrionário (E9.5). A expressão de Gcm2 marca o domínio da paratireóide (azul) a partir de E9.5. (B) No E10.5 as terceiras bolsas se desenvolveram nos primórdios que estão prontos para destacarem-se da faringe. Nesta fase, os primórdios são padronizados em domínios do timo (vermelho) e da paratireóide (azul) como indicado pela expressão de Foxn1 e Gcm2, respectivamente. (C) Em E11.5, os primórdios separaram-se da faringe e as paratireóides (azul) começam a separar-se dos lóbulos do timo (vermelho). (D) Em E12.5, as paratireóides (azul) separaram-se do timo (vermelho) e permanecem ao lado da tireóide (roxo). (E) No nascimento, os órgãos estão nas suas posições finais, mostrado aqui em relação à tireóide e ao coração (rosa). (Fonte: GORDON & MANLEY, 2011).

A padronização da terceira bolsa faríngea em domínios órgão-específicos inicia-se no nono dia do desenvolvimento embrionário (E9), quando o terceiro par de bolsas faríngeas começa a crescer. A partir do E9.5 inicia-se a expressão do fator de transcrição Gcm2 (do inglês, glial cells missing homolog 2), o primeiro marcador de paratireóide, em um domínio ântero-dorsal da endoderme da terceira bolsa (GORDON et al., 2004). NO E11 tem início a expressão do primeiro marcador timo-específico expresso regionalmente, o fator de transcrição Foxn1 (do inglês, forkhead family transcription factor), o qual é necessário para a proliferação e diferenciação das TECs (BLACKBURN et al., 1996).

Outros fatores de transcrição, incluindo os da via Hoxa3 (homeobox A3)-Eya1 (eyesabsent homolog 1)-Pax 1/9 (paired box protein 1/9)-Six 1/4 (sine oculis

homolog 1/4) e Tbx1 (T-box 1) podem atuar nos estágios iniciais da formação da bolsa faíngea (MANLEY & CONDIE, 2010). Aparentemente, a rede gênica Hox-Eya-Pax-Six é requerida para o desenvolvimento inicial do timo, entretanto ela ainda não está diretamente ligada ao destino tímico na região ventral da terceira bolsa faríngea ou à expressão de Foxn1.

Além disso, devido ao fato de Foxn1 não estabelecer um destino tímico e sim uma diferenciação órgão-específica, parece haver um elo perdido que estabelece esta rede de padronização inicial, a organogênese e diferenciação das TECs determinadas por Foxn1. Similarmente, as vias de sinalização dos genes Shh (sonic hedgehog), Bmp (bone morphogenic protein), Wnt (wingless-int) e Fgf (fibroblast growth factor) estão envolvidas na padronização inicial do timo, porém, apesar desses genes serem todos expressos no presumível domínio tímico antes da expressão de Foxn1, ainda não foi demonstrado in vivo o papel de suas proteínas no destino tímico ou no controle direto da expressão de Foxn1 (GORDON & MANLEY, 2011). A clara organogênese do timo fica evidente entre os dias E10.5 e E11 do desenvolvimento embrionário, neste estágio o epitélio começa a se proliferar assumindo uma organização estratificada (ITO et al., 2001). A seguir, no E12.5 os primórdios se separam da faringe e começam a formar um discreto timo e paratireóide. O primórdio tímico subsequentemente migra para sua localização anatômica final no mediastino, enquanto o primórdio da paratireóide associa-se às margens laterais da tireóide (MANLEY & CAPECCHI, 1998).

A cápsula mesenquimal que circunda o primórdio tímico é derivada da crista neural. Nos camundongos, as células da crista neural migram para a região faríngea no E9, e são o recurso de células mesenquimais no timo (MANLEY, 2000). O mesênquima dos arcos faríngeos desempenha um papel crítico na formação regular dos primórdios do timo. Algumas das células mesenquimais dentro dos três arcos faríngeos e caudais (ou seja, 3, 4 e 6) são derivadas de expansões de células da crista neural. Estas células se condensam em volta da artéria do arco aórtico nascente e, eventualmente, não apenas dão origem às células dos músculos lisos das grandes artérias cefálicas e do septo aórtico-pulmonar, mas também contribuem para o tecido conectivo do timo e das glândulas paratireóides.

O componente mesenquimal do primórdio tímico fornece às células epiteliais um sinal indutivo essencial para a correta morfogênese do órgão. Essa interação mesenquimal-epitelial pode ser efetuada por várias moléculas incluindo o fator de

crescimento epidérmico, fatores de crescimento tipo insulina -I e -II (Igf-1 e Igf-2), e os fatores de crescimento de fibroblastos (Fgf-7 e Fgf-10). Como resultado é provável que as células mesenquimais regulem a proliferação e a diferenciação das células tímicas epiteliais imaturas. Uma vez que o desenvolvimento do timo tenha progredido para um estágio capaz de suportar timócitos imaturos, a maior diferenciação das células tímicas epiteliais torna-se largamente independente do apoio mesenquimal (ANDERSON et al., 1993; JENKINSON et al., 2003; BARTHLOTT et al., 2006). Portanto, o início do desenvolvimento tímico depende da segmentação da endoderme da faringe e sua interação subsequente com o mesênquima e, em fases posteriores, a timopoiese normal depende das interações das células estromais e linfoides (BOEHM et al., 2003a, 2003b).

O timo é colonizado por linfócitos T que se originam de precursores provenientes do fígado fetal e da medula óssea do adulto. Nos camundongos, os linfócitos imaturos são detectados no timo inicialmente no E11 de uma gestação normal de 21 dias. Isso corresponde a cerca de E7 ou E8 de gestação nos seres humanos (BOEHM, 2008; RODEWALD, 2008). Em razão da vascularização não ocorrer até esta fase, as primeiras células colonizadoras migram para dentro do epitélio tímico através do mesênquima peritímico. Essas células exibem baixa atividade de progenitoras de célula T, já os precursores linfoides de uma segunda onda de colonização, que ocorre entre E12 e E14, parecem apresentar níveis muito mais altos de potenciais células T (DOUAGI et al., 2000).

As células epiteliais no primórdio tímico começam a proliferar rapidamente após E12.5. Concomitantemente, a diferenciação das TECs se inicia com a primeira evidência de diferenciação em células corticais e medulares aparecendo por volta de E12.5. O desenvolvimento dos compartimentos cortical e medular prossegue de uma maneira linfócito-independente até E15.5. A expressão do MHCII e MHCI na superfície das TECs é detectada em E13.5 e E16, respectivamente, e é seguida pelo aparecimento de linfócitos CD4+ e CD8+ simples positivos nos dias E15.5 e E17.5. Embora o timo esteja presente nos neonatos, a organização completa do estroma só é adquirida duas ou três semanas após o nascimento (BENNETT et al., 2002; KLUG et al., 2002; JENKINSON et al., 2005). A endoderme da faringe é necessária para a geração tanto do córtex quanto da medula, comprovando a origem endodérmica única do epitélio tímico (GORDON et al., 2004).

A involução alométrica do timo tem início pouco antes do nascimento, e a involução absoluta ocorre na puberdade, entretanto, o timo adulto continua a receber células precursoras provenientes da medula óssea e a lançar células colonizadoras para as áreas T periféricas (BODEY et al., 1997). A involução tímica é um fenômeno conhecido e, no geral, associado à idade, sendo caracterizado pela substituição do estroma tímico por tecido adiposo (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2005). O declínio da imunidade adaptativa e da produção de células T naïve, a diminuição no repertório do receptor de células T periféricas (TCR), e a perda de citocinas e hormônios críticos dentro do microambiente tímico são resultados da involução tímica associada ao envelhecimento. Vários mecanismos possíveis para a involução tímica associada à idade foram sugeridos, os quais incluem: bloqueio no rearranjo do receptor de células T, diminuição de moléculas do MHC, depleção dos progenitores de células T, e a perda ou perturbação de eventos chave do crosstalk entre os linfócitos em desenvolvimento e o estroma (LYNCH et al., 2009).

A diminuição nos níveis de expressão do fator de transcrição específico das células tímicas epiteliais, o Foxn1, foi relacionada ao mecanismo de regulação da involução tímica associada à idade (CHEN et al., 2009; ZOOK et al., 2011). A regulação positiva de Foxn1 nas TECs de timos totalmente involuídos de camundongos envelhecidos levou à total regeneração desses timos, caracterizada pelo aumento da timopoiese e da produção de células T naïve, além da grande semelhança deste timo regenerado com um timo jovem no que diz respeito à arquitetura e expressão gênica (BREDENKAMP et al., 2014).

1.4 MIGRAÇÃO INTRATÍMICA DE CÉLULAS T

As células T em desenvolvimento no timo são chamadas de timócitos. Os timócitos imaturos não expressam TCR ou os correceptores CD4 e CD8. Eles são encontrados no seio subcapsular e na parte externa da região cortical do timo (Figura 1). A partir dessa região, os timócitos migram para dentro do córtex, onde a maioria dos eventos subsequentes do desenvolvimento ocorre. É no córtex que os timócitos expressam inicialmente os TCRs $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$. As células T $\alpha\beta$ amadurecem em células T CD4⁺ restritas MHC de classe II, ou CD8⁺ restritas ao MHC de classe I. Conforme esses timócitos passam pelos estágios finais de desenvolvimento, migram

do córtex para a medula e depois deixam o timo através da circulação sanguínea (GERMAIN, 2002; KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG *et al.*, 2008; SINGER *et al.*, 2008).

O microambiente do timo fornece os estímulos necessários para a proliferação e desenvolvimento dos timócitos. Muitos desses estímulos são provenientes de outras células tímicas, incluindo as células epiteliais do timo, macrófagos e células dendríticas derivadas da medula óssea. No córtex, as células epiteliais formam uma rede de longos processos citoplasmáticos que os timócitos precisam atravessar para chegar à medula do timo. As células epiteliais também estão presentes na medula. As células dendríticas derivadas da medula óssea estão presentes na junção córticomedular e na medula, enquanto os macrófagos estão presentes primariamente na medula. A integração dos timócitos por meio desse arranjo anatômico permite a interação física entre os timócitos e as outras células, o que é extremamente necessário para seu amadurecimento em células T (GOLDRATH & BEVAN, 1999; GERMAIN, 2002; KYEWSKI & KLEIN, 2006).

Moléculas produzidas pelas células tímicas não linfoides são importantes para o desenvolvimento das células T. O primeiro tipo inclui as moléculas do MHC classes I e II expressas pelas células epiteliais e dendríticas no timo. A interação dos timócitos em desenvolvimento com as moléculas do MHC é essencial para a seleção do repertório das células T maduras, como abordado adiante. Ainda, as células do estroma, incluindo as células epiteliais, secretam citocinas e quimiocinas que estimulam a proliferação das células T imaturas e juntamente com as proteínas da matriz extracelular orquestram o trânsito do córtex para a medula da linhagem de timócitos $\alpha\beta$ em desenvolvimento.

As células do estroma tímico, incluindo as células epiteliais, secretam IL-7, um fator de crescimento linfopoiético crítico. Além disso, os progenitores linfoides expressam o receptor de quimiocina CCR9 - do inglês, chemokine (C-C motif) receptor 9 - que se liga à quimiocina CCL25 - do inglês chemokine (C-C motif) ligand 25 - produzida no córtex do timo. A entrada dos precursores no timo depende de CCL25 e CCR9. Já as quimiocinas CCL21 e CCL19, que são reconhecidas pelo receptor de quimiocina CCR7 em timócitos, são mediadores do movimento direcionado das células T em desenvolvimento do córtex para a medula. Eventualmente, os linfócitos T recém-formados, que expressam o receptor-1-de-esfingosina-1-fosfato (S1P₁), deixam a medula do timo seguindo um gradiente de

esfingosina 1-fosfato (S1P), entrando na corrente sanguínea (Figura 4) (TAKAHAMA, 2006; LOVE & BHANDoola, 2011; BUNTING *et al*, 2010; HU *et al*, 2015).

Figura 4 - Quimiocinas e receptores de quimiocinas dirigem a migração dos timócitos. A representação esquemática mostra a localização de algumas quimiocinas chave em diferentes compartimentos tímicos e a expressão de receptores de quimiocinas pelas diferentes populações de timócitos em desenvolvimento. A expressão de CCR4, CCR7, CCR9 e CXCR4 pelos timócitos CD4⁻CD8⁻ duplo-negativos (DN 1-4), CD4⁺CD8⁺ duplo-positivos (DP) e CD4⁺ e CD8⁺ simples-positivos (SP) é demonstrada juntamente com a indicação de onde os ligantes para esses receptores são expressos. A direção presumida do gradiente de quimiocinas que existe entre os diferentes compartimentos é mostrada pela densidade de quimiocinas na figura. Além disso, a expressão de S1P1 nos timócitos é mostrada, e o nível mais elevado de S1P no sangue em comparação com o timo também é indicado. (Fonte: BUNTING *et al*, 2010).

Células tímicas epiteliais medulares também produzem CXCL19 - do inglês, chemokine (C-X-C motif) ligand 19, CXCL10 e CXCL11, envolvidas na migração de células NK por meio do receptor comum CXCR3 - do inglês, chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (ANNUNZIATO, 2001; SAVINO, 2002; BUNTING *et al*, 2010).

Outras interações envolvendo timócitos e células do microambiente tímico são promovidas por diferentes moléculas e correceptores durante a migração e diferenciação dessas células, tais como as moléculas EphrinB1/EphB (ALFARO, *et al*, 2007), CD2/LFA-3, LFA-1/ICAM-1 (SINGER, 1990; PATEL & HAYNES, 1993),

NP-1/Sema-3A (LEPELLETIER, 2007), e interações das células tímicas epiteliais com timócitos mediadas por ECM/integrinas (ANDERSON, 1996; CHIBA, 2006).

Deste modo, a migração intratímica das células T é um processo complexo que compreende múltiplas interações moleculares combinadas, que resultam na quimioatração e na quimiorrepulsão das células. O processo envolve ligantes de matriz extracelular, quimiocinas, efrinas e semaforinas em um conceito proposto como migração multivetorial (Figura 5). (SAVINO, 2007; MENDES-DA-CRUZ et al., 2008; SAVINO, 2010)

Figura 5 - Conceito de migração multivetorial dos timócitos, incluindo a semaforina-3A e as efrinas como novos vetores de migração celular. A figura demonstra esquematicamente o conceito hipotético que afirma que a migração dos timócitos resulta do equilíbrio de variadas interações simultâneas entre o par ligante-receptor. Assim, os vetores individuais formam um vetor resultante que guia os timócitos durante toda sua jornada intratímica, do córtex até a medula, com os subconjuntos maduros sendo exportados do órgão através das paredes dos vasos sanguíneos. Dessa forma, os vetores individuais que estão sob controle neuroendócrino, uma vez modulados por certo hormônio ou neuropeptídeo, provavelmente irão alterar o vetor resultante. Setas estreitas representam vetores de migração individual induzida por estímulos específicos, incluindo ligantes ECM tais como fibronectina, laminina, nidogênio, galectina-3, quimiocinas como CXCL12 e CCL25, semaforina-3A, efrinas e outras moléculas a serem definidas. Seta sólida representa o vetor de migração final resultante. (Fonte: SAVINO, 2010).

1.5 ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DAS CÉLULAS T

Existe uma ordem precisa durante o desenvolvimento das células T, na qual os genes do TCR são rearranjados, e o TCR, bem como os correceptores CD4 e CD8, são expressos. A interação entre as células estromais e linfóides dentro do microambiente tímico é um fator crítico para a correta formação da especificidade antigênica do repertório de células T (Figura 6) (Blackburn & Manley, 2004; BARTHLOTT et al., 2006).

Figura 6 - Migração dos timócitos para desenvolvimento e seleção dos linfócitos T. O órgão é 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 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. (Fonte: BLACKBURN & MANLEY, 2004).

1.5.1 Timócitos duplo-negativos

Os timócitos corticais mais imaturos, recém-chegados da medula óssea, contêm os genes de TCR na configuração da linhagem germinativa e, portanto, ainda não expressam TCR, CD3, cadeias ζ e CD4 ou CD8, essas células são chamadas de timócitos duplo-negativos (DN). Esse estágio é também chamado de estágio de célula pró-T. A maioria (> 90%) dos timócitos duplo-negativos que sobrevivem aos processos de seleção do timo acabará por dar origem a células T CD4+ e CD8+ restritas ao MHC que expressam TCR $\alpha\beta$, e o restante desses timócitos dará origem a células T $\gamma\delta$ (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG et al., 2008, SINGER et al., 2008, CARPENTER & BOSSELUT, 2010).

A expressão das proteínas RAG-1 e RAG-2 (do inglês, recombination-activating gene) têm início no estágio DN, e são necessárias para o rearranjo dos genes do TCR, o qual é denominado de recombinação V(D)J. Os rearranjos no locus da cadeia β do TCR ocorrem primeiro. Se um rearranjo produtivo do gene da cadeia β do TCR ocorrer em uma determinada célula T DN, a proteína da cadeia β do TCR será expressa na superfície celular em associação a uma proteína invariante, denominada pré-T α , e com as proteínas CD3 e ζ , para formar o complexo do receptor da célula denominada pré-T (pré-TCR). O pré-TCR medeia a seleção das células pré-T em desenvolvimento que rearranjam de maneira produtiva. O estágio duplo-negativo pode ser subdividido com base na expressão de moléculas como CD44+CD25- (DN1), CD44+CD25+ (DN2), CD44^{low}CD25+ (DN3) e CD44-CD25- (DN4) (Figura 7) (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG et al., 2008, SINGER et al., 2008; CARPENTER & BOSSELUT, 2010; SCHATZ & JI, 2011).

A função da sinalização de pré-TCR é promover a sobrevivência das células pré-T que tenham rearranjado de maneira produtiva os genes da cadeia β do TCR e a maior expansão proliferativa durante o desenvolvimento das células T. Os sinais pré-TCR também iniciam a recombinação no locus da cadeia α do TCR e conduzem

a transição do estágio DN para o DP (discutido adiante) (Figura 7). A falta de qualquer um dos componentes do complexo pré-TCR (ou seja, a cadeia β do TCR, pré-T α , CD3 ou ζ) resulta em bloqueio na maturação das células T no estágio duplo-negativo) (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG et al., 2008, SINGER et al., 2008; CARPENTER & BOSSELUT, 2010).

Figura 7 - Visão esquemática dos eventos correspondentes a cada estágio do desenvolvimento da célula T. Os CLPs se originam na medula óssea e migram para o timo. As células na fase DN (CD4⁻CD8⁻) são divididas em quatro subconjuntos sequenciais (DN1-DN4) de acordo com a expressão de CD44 e CD25. A expressão do pré-TCR em DN3 leva à progressão para DN4, seguida da expressão de CD4 e CD8 e progressão para a fase DP (CD4⁺CD8⁺). Em seguida, a seleção positiva leva ao comprometimento com a linhagem de célula T CD4 ou CD8. Células maduras CD4 ou CD8, então, migram para a periferia.

CLP, progenitor linfóide comum; **DN**, duplo-negativo; **DP**, duplo-positivo; **SP**, simples positivo; **TCR**, receptor de célula T; **PS**, seleção positiva; **NS**, seleção negativa.

(Fonte: BD Biosciences Application Note. Studying Mouse Thymocyte Development using Multiparametric Flow Cytometry: An Efficient Method to Improve an 8-Color Panel on the BD FACSVerse™ System. June 2012).

1.5.2 Timócitos duplo-positivos

Na próxima fase de maturação das células T, os timócitos expressam tanto CD4 e CD8 e são denominados timócitos DP (Figura 7). A expressão de CD4 e CD8 é essencial para os eventos de seleção subsequentes (discutidos posteriormente). O rearranjo dos genes da cadeia α do TCR e a expressão de heterodímeros $\alpha\beta$ do TCR

ocorre na população DP CD4⁺CD8⁺. Uma segunda onda de expressão do gene Rag no final do estágio pr-e-T promove a recombinação dos genes α do TCR. Rearranjos sem sucesso do gene α do TCR levam a uma falha da seleção positiva (discutida posteriormente). Os timócitos da linhagem de células T $\alpha\beta$ que não conseguirem realizar um rearranjo produtivo do gene da cadeia α do TCR morrerão por apoptose (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG *et al.*, 2008, SINGER *et al.*, 2008; CARPENTER & BOSSELUT, 2010).

A expressão do gene α do TCR no estágio duplo-positivo leva à formação do TCR $\alpha\beta$ completo, que é expresso na superfície celular em associação às proteínas CD3 e ζ . A expressão coordenada das proteínas CD3 e ζ e a montagem dos complexos TCR intactos são necessárias para a expressão de superfície. A expressão dos genes RAG e a recombinação adicional do gene do TCR cessam após esse estágio de maturação. (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG *et al.*, 2008, SINGER *et al.*, 2008; CARPENTER & BOSSELUT, 2010; SCHATZ & JI, 2011).

1.5.3 Timócitos simples-positivos

As células duplo-positivas que passam por processos de seleção bem sucedidos continuam a amadurecer em células CD4⁺ ou CD8⁺, que são denominadas timócitos simples-positivos (Figura 7). Assim, as fases de maturação das células T no timo podem ser prontamente distinguidas pela expressão de CD4 e CD8 (Figura 8). Esta maturação fenotípica é acompanhada pelo comprometimento com diferentes programas funcionais após a ativação de órgãos linfoides secundários. As células T CD4 adquirem a capacidade de produzir citocinas em resposta ao estímulo subsequente de antígenos e expressar moléculas efetoras (tais como o ligante de CD40) que ativam linfócitos B, células dendríticas e macrófagos, enquanto as células CD8⁺ tornam-se capazes de produzir moléculas que destroem outras células (KYEWSKI & KLEIN, 2006; ROTHENBERG *et al.*, 2008, SINGER *et al.*, 2008; CARPENTER & BOSSELUT, 2010).

Figura 8 - Expressão de CD4 e CD8 nos timócitos. O amadurecimento dos timócitos pode ser seguido de mudanças na expressão dos correceptores CD4 e CD8. A figura ilustra uma análise de citometria de fluxo dos timócitos com duas cores, usando anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, cada um marcado com um fluorocromo diferente. As percentagens de todos os timócitos contribuindo para cada uma das duas populações são mostradas nos quatro quadrantes. As setas indicam a sequência do amadurecimento. (Fonte: ABBAS *et al. Cellular and Molecular Immunology. 6th Edition. 2009*).

1.6 PROCESSOS DE SELEÇÃO NA MATURAÇÃO DAS CÉLULAS T

A seleção das células T em desenvolvimento depende do reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC no timo. Esse processo é responsável pela preservação das células úteis e eliminação das células potencialmente nocivas. As únicas células T úteis são aquelas específicas para antígenos estranhos apresentados pelas moléculas do MHC daquele indivíduo. Também, em cada indivíduo, as células T que reconhecem autoantígenos com alta afinidade são potencialmente perigosas, porque tal reconhecimento pode desencadear a autoimunidade (GOLDRATH & BEVAN, 1999; HOGQUIST, 2001; GERMAIN, 2002, KYEWSKI & KLEIN, 2006; LO & ALLEN, 2012; KLEIN *et al.*, 2014).

A seleção positiva é o processo pelo qual os timócitos cujos TCRs se ligam aos complexos peptídeo-MHC hospedeiro com pouca avides são estimulados a

sobreviver (Figura 9). Os timócitos cujos receptores não reconhecem as moléculas do MHC morrem por apoptose. Isso garante que as células T que se desenvolvem sejam restritas pelo MHC. A seleção positiva também determina a restrição pelas classes I ou II no MHC aos subtipos de células T, garantindo que as células CD8+ sejam específicas para os peptídeos apresentados pelas moléculas do MHC classe I e as células T CD4+ para os peptídeos associados à classe II (KLEIN et al., 2014; HOGQUIST et al., 2015).

A seleção negativa é o processo pelo qual os timócitos cujos TCRs se ligam fortemente a autopeptídeos antigênicos associados a moléculas do MHC do hospedeiro são eliminados (Figura 9). Isso elimina as células T em desenvolvimento fortemente reativas contra autoantígenos presentes em altas concentrações no timo. O resultado desses processos de seleção determina que o repertório de células T maduras que deixam o timo é restrito ao MHC e tolerante a muitos autoantígenos (PALMER, 2003; KLEIN et al., 2014).

Figura 9 - Modelo de afinidade da seleção dos timócitos. Segundo esse modelo, a afinidade do receptor de células T (TCR) pelo peptídeo apresentado pelo MHC é o principal determinante da seleção da célula T. Timócitos duplo-positivos (DP) que expressam TCRs com nenhuma ou baixa afinidade por autopeptídeos via MHC morrem por negligência. Este mecanismo é responsável por 80-90% da perda de timócitos durante a seleção tímica. Timócitos com afinidade intermediária para autopeptídeos via MHC recebem um sinal de sobrevivência (processo denominado seleção positiva), comprometendo-se com a linhagem de células T CD4 ou CD8 e posteriormente, passam pela medula do timo para se tornar parte das células T periféricas. A ligação de alta afinidade do TCR aos complexos autopeptídeo-MHC induz a morte celular por apoptose (processo conhecido como seleção negativa ou deleção clonal). (Fonte: KLEIN et al., 2009).

1.6.1 Seleção positiva dos timócitos: desenvolvimento do repertório de células T restritas ao auto-MHC

A seleção positiva promove a sobrevivência e a expansão dos timócitos com TCRs restritos pelo MHC do hospedeiro. Timócitos duplo-positivos são produzidos sem estimulação antigênica e começam a expressar TCRs $\alpha\beta$ com especificidades geradas aleatoriamente que são provavelmente inclinados ao reconhecimento de estruturas semelhantes ao MHC. No córtex do timo, essas células imaturas encontram células epiteliais, as cTECs, que apresentam uma variedade de peptídeos ligados às moléculas do MHC classe I e classe II (GOLDRATH & BEVAN, 1999; HOGQUIST, 2001; GERMAIN, 2002, KYEWSKI & KLEIN, 2006; LO & ALLEN, 2012; KLEIN et al., 2014). Os timócitos cujos TCRs não reconhecem, ou reconhecem com baixa afinidade os complexos peptídeo-MHC, morrem por negligência. Já o reconhecimento dos autopeptídeos apresentados via MHC com afinidade intermediária promove a sobrevivência das células T. Os timócitos cujos receptores reconhecem os complexos peptídeo-MHC com alta afinidade são selecionados negativamente e sofrem apoptose (Figura 9), ou diferenciam-se em células T reguladoras (KLEIN et al., 2009).

Se o TCR em uma célula reconhece peptídeos ligados a moléculas do MHC classe I, e ao mesmo tempo o CD8 interage com moléculas do MHC classe I, aquela célula recebe sinais que evitam sua morte, e promovem a continuação do seu desenvolvimento. Para continuar se desenvolvendo, a célula T deve continuar a expressar o TCR e o CD8, mas pode perder a expressão do CD4. O resultado é o desenvolvimento de uma célula T CD8+ restrita pelo MHC classe I. Um processo análogo leva ao desenvolvimento de células T CD4+ restritas pelo MHC classe II. Os peptídeos ligados às moléculas de MHC nas células epiteliais do timo desempenham um papel essencial na seleção positiva (KLEIN et al., 2014; HOGQUIST et al., 2015). Após a seleção positiva e o comprometimento com a linhagem CD4 ou CD8, os timócitos se deslocam para a medula (McCaughy et al., 2007).

1.6.2 Seleção negativa dos timócitos: indução da tolerância central

A seleção negativa dos timócitos induz a morte celular por apoptose das células cujos receptores reconhecem com alta afinidade os complexos peptídeo-MHC próprios no timo. Esse processo elimina as células T com maior potencial de causar dano, sendo um dos principais mecanismos que garantem que o sistema imunológico não responda a diversos autoantígenos, uma propriedade chamada de autotolerância. As células apresentadoras de antígenos do timo que medeiam a seleção negativa são as células dendríticas, os macrófagos derivados da medula óssea, e as células tímicas epiteliais medulares.

As mTECs estão relacionadas com a atração dos timócitos positivamente selecionados para a medula, com a indução de tolerância central e com a migração das células T maduras para a periferia (CIOFANI & ZUNIGA-PFLUCKER, 2007; NITTA et al., 2008). A interação dos TCRs e dos complexos peptídeo-MHC representa um exemplo clássico de uma interação que determina o destino no desenvolvimento dos timócitos.

As células tímicas epiteliais medulares são cruciais no controle da autoimunidade devido à expressão promíscua de antígenos tecido-específicos (TRAs) que selecionam negativamente os clones de células T auto-reativos e possivelmente, promovem a geração das células T regulatórias (BOEHM et al., 2003a, 2003b; CIOFANI ZUNIGA-PFLUCKER, 2007). O adequado processo de seleção do repertório maduro de células T é de extrema importância para o estabelecimento e manutenção da tolerância ao próprio.

1.7 A EXPRESSÃO GÊNICA PROMÍSCUA (PGE) EM mTECs

A expressão de antígenos restritos a tecidos (TRAs) no timo, denominada expressão gênica promíscua (PGE), estende o escopo da tolerância central das células T para virtualmente todos os tecidos do corpo. A PGE é primeiramente uma propriedade fisiológica das mTECs e é altamente conservada em humanos e camundongos. (KLEIN & KYEWSKI, 2000; DERBINSKI et al., 2001; KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; MAGALHÃES et al., 2006). A PGE é definida operacionalmente como a expressão no timo de genes ectópicos, ou seja, que não fazem parte do

programa de expressão gênica fisiológica destas células. O conceito de TRAs, por sua vez, engloba antígenos que são predominantemente expressos em tecidos específicos (Figura 10) (DERBINSKI et al., 2005).

Figura 10. Diversos tecidos são representados pela expressão gênica promíscua nas células tímicas epiteliais medulares. (Fonte: KYEWSKI & DERBINSKI, 2004).

A diversidade dos TRAs e o nível da PGE estão diretamente relacionados ao estágio de maturação das mTECs. Células maduras que apresentam alta expressão de MHCII, CD80 e AIRE ($CD80^{hi}MHCII^{hi}AIRE^{+}$) são mais aptas a PGE (DERBINSKI et al., 2005). Entretanto, somente cerca de 1-5% das mTECs apresentam esse nível de maturação e portanto, capacidade transcricional de autoantígenos (DERBINSKY et al., 2001). Além disso, apesar de toda a população de mTECs maduras estar apta a expressar quase todos "transcritos periféricos", cada TRA só é expresso por uma pequena fração (1-3%) das mTECs em determinados momentos (Figura 11) (KLEIN et al., 2014).

Figura 11 - Aspectos topológicos da PGE. Um dado TRA é expresso somente por uma pequena fração de mTECs em um determinado momento. A hibridização *in situ* de um lobo tímico mostra que as células que expressam Aire formam regiões densas na medula. Entretanto, transcritos de três TRAs representativos - Dmkn, Spink3 e Clca3 - são detectados em poucas células dispersas na medula (linhas pontilhadas). (Fonte: Extraído de KLEIN *et al.*, 2014).

Autoantígenos expressos por mTECs podem ser "vistos" por células T de duas maneiras (Figura 12). Primeiro, através de apresentação "autônoma" pelas próprias mTECs e, segundo, através da transferência de antígenos para a apresentação por células dendríticas (KLEIN *et al.*, 2014). A apresentação direta de antígenos expressos endogenamente pelas mTECs não só promove a seleção negativa das células T CD8⁺ (OUKKA *et al.*, 1996a, 1996b; GALLEGOS & BEVAN, 2004) como também induz eficazmente a autotolerância nas células T CD4⁺ e vice-versa (OUKKA *et al.*, 1996a, 1996b; KLEIN *et al.*, 1998; ASCHENBRENNER, *et al.*, 2007; HINTERBERGER *et al.*, 2010). Como as mTECs são conspicuamente ineficientes na apresentação de substratos extracelulares via MHCII da forma convencional (ASCENBRENNER *et al.*, 2007; ATIBALENTJA *et al.*, 2009), elas desenvolveram estratégias que as permitiram contornar a via clássica de captura de antígenos extracelulares e "carregar" a molécula de MHCII com autoantígenos endógenos (KLEIN *et al.* 2014).

Figura 12 - Apresentação direta e indireta de TRAs. A apresentação tolerogênica de TRAs que são expressos por algumas mTECs podem ocorrer de duas maneiras que não são mutuamente exclusivas. A figura da esquerda mostra a apresentação direta de TRAs expresso pela própria mTEC. A figura do meio está representando a "entrega" de autoantígeno para as células dendríticas convencionais, o que pode ampliar a área de apresentação tolerogênica em uma forma de mosaico além do padrão de expressão topologicamente restrito (figura da direita). Os mecanismos dessa transferência direcional de antígenos ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que os TRAs possam ser liberados ou convertidos em uma forma solúvel para subsequente captura por células dendríticas para processamento e apresentação via MHC I ou II. A apoptose de mTECs terminalmente diferenciadas também pode levar a liberação de fragmentos apoptóticos que também podem transferir autoantígenos derivados de mTECs para células dendríticas. Além disso, peptídeos funcionais ligantes de MHC são unidirecionalmente translocados de mTECs para células dendríticas (HUBERT *et al.*, 2011; MILLET *et al.*, 2008). (Fonte: KLEIN *et al.*, 2014).

Falhas na PGE estão intimamente associadas à ocorrência de doenças autoimunes órgão-específicas em modelos murinos. Estudos recentes realizados em nosso laboratório constataram a associação de falhas na expressão de genes específicos de TRAs, no estroma tímico, com o desenvolvimento de autoimunidade agressiva na artrite induzida por colágeno em camundongos DBA-1/J (DONATE *et al.*, 2011) e também durante o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) em camundongos NOD (do inglês, *non-obese diabetic*) (FORNARI *et al.*, 2010). A proteína AIRE continua sendo o único regulador molecular identificado dedicado a controlar expressão de uma ampla gama de genes promiscuamente expressos que codificam TRAs em mTECs (DERBINSKI *et al.*, 2001, 2005; ANDERSON, 2002; MATHIS & BENOIST, 2009).

1.8 MECANISMOS DE AÇÃO DE AIRE NO CONTROLE DA PGE NO TIMO

O gene Aire humano localiza-se no cromossomo 21q22.3, apresenta aproximadamente 13kb de comprimento e contém 14 exons que codificam um polipeptídeo de 545 aminoácidos (Finnish-German APECED Consortium, 1997; NAGAMINE *et al.*, 1997). Já o gene Aire murino (*Mus musculus*), localiza-se no cromossomo 10 citobanda 39.72 e apresenta 71% de identidade com o gene humano (MATHIS & BENOIST, 2007; KONT *et al.*, 2008).

A expressão de Aire já foi descrita em vários tecidos, entretanto, é bem mais pronunciada no timo, especificamente na subpopulação de células mTEC (BJÖRSES *et al.*, 1999; HEINO *et al.*, 1999, 2000). Na periferia, Aire é expresso em monócitos e células dendríticas (KOGAWA *et al.*, 2002; SILLANPÄÄ *et al.*, 2004). *In vitro*, a expressão da proteína AIRE pode ser vista (por imunofluorescência), como pontos distribuídos pelo núcleo das células (BJÖRSES *et al.*, 1999).

A proteína AIRE apresenta múltiplos domínios que são característicos de fatores de ligação a cromatina e/ou reguladores transcricionais (revisado por PERNIOLA & MUSCO, 2014) (Figura 13). AIRE compreende um domínio de recrutamento de caspase (CARD) (FERGUSON *et al.*, 2008), conservado evolutivamente, um sinal de localização nuclear (NLS) e um domínio de ligação ao DNA putativo denominado SAND (Sp100, AIRE, NucP41/75 e Deaf1) (PERNIOLA & MUSCO, 2014) (Figura 13). A região C-terminal da proteína AIRE compreende dois "PHD (do inglês, *plant-homeodomain*) zinc fingers" separados por uma região rica em prolina (PRR). Enquanto PHD1 interage diretamente com a histona H3 lisina 4 não metilada (H3K4me0) (KOH *et al.*, 2008; ORG *et al.*, 2008) e com o complexo proteína-quinase dependente de DNA (DNA-PK) (LIIV *et al.*, 2008), o único parceiro de interação com PHD2 ainda não é conhecido. Entretanto, ambos os "zinc fingers" são essenciais para a capacidade de transcrição-transativação de AIRE (KOH *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2013). Finalmente, AIRE contém quatro motivos LXXLL intercalados, que são tipicamente encontrados em receptores hormonais nucleares e outras proteínas coativadoras da transcrição. Interessantemente, o quarto motivo LXXLL, que é localizado dentro dos 30 aminoácidos finais da região C-terminal de AIRE, também contribui significativamente para a habilidade de transativação de AIRE (MELONI *et al.*, 2010).

Figura 13 - Os domínios e elementos funcionais da proteína AIRE. O domínio CARD (do inglês, *caspase-recruitment domain*) é crítico para a homo-oligomerização de AIRE, bem como a formação de “pontos” nucleares, e a associação de AIRE com a matriz nuclear. Três sinais putativos conservados para a localização nuclear (NLS) (110-114; 131-133; e 159-167) estão relacionados com o transporte nuclear de AIRE. O domínio SAND (SP100, AIRE1, NucP41/P75, e DEAF1) é um domínio de ligação ao DNA. Dois PHD (*plant-homeodomain*) “zinc fingers” sequenciais são essenciais para a capacidade de transcrição-transativação de AIRE. PHD1 interage com histona H3 lisina 4 não metilada (H3K4me0), e o complexo proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), enquanto que os parceiros de PHD2 ainda não são conhecidos. Quatro motivos LXXLL, distribuídos ao longo da proteína AIRE (7-11, 63-67, 414-418, 516-520) tem sido implicados na formação de homo-oligômeros de AIRE e/ou na interação proteína-proteína com outras proteínas que possuem motivos LXXLL. A região rica em prolina (PRR) é uma plataforma de ligação para múltiplas proteínas que contenham domínios de ligação a prolina, como a SH3 ou WW. As principais mutações de AIRE em humanos estão destacadas de acordo com seus padrões de herança: recessiva (preto) ou dominante (vermelho). (Fonte: ABRAMSON & GOLDFARB, 2016)

Para poder induzir a expressão de milhares de genes no timo, AIRE precisa ser ativamente transportado para o núcleo. De fato, AIRE contém dois sinais de localização nuclear (NLS) e, assim como outras proteínas que contêm NLS, o NLS de AIRE serve como um local de ancoramento de carioferinas, o que promove a entrada de AIRE no núcleo através do complexo de poro nuclear (NPC) (BJÖRSES *et al.*, 1999). Uma vez no núcleo, AIRE se localiza dentro de corpos nucleares. Mutações no domínio CARD impedem a formação dos corpos nucleares, o que resulta na difusão da proteína no núcleo, e consequentemente a perda da atividade transcricional de AIRE (AKIYOSHI *et al.*, 2004).

Em mTECs, AIRE induz a expressão de cerca de 3000-4000 genes que são, em sua maioria, restritos a tecidos específicos e, portanto, silenciados na maior parte das células do corpo (RUAN *et al.*, 2007). Considerando o vasto número e a ampla diversidade de alvos de AIRE, é difícil imaginar que AIRE possa se ligar a

todos esses *loci* por meio de sequências consenso específicas localizadas em seus promotores. Além disso, não há evidências de que AIRE possa atuar como um fator de transcrição clássico. Ao invés disso, AIRE parece se associar à cromatina de uma maneira não específica.

Dois estudos independentes demonstraram que o domínio PHD1 de AIRE pode se ligar diretamente a H3K4m0 (KOH *et al.*, 2008; ORG *et al.*, 2008). Tal especificidade é, geralmente, característica de fatores de repressão, os quais se ligam a fim de bloquear a cromatina inativa. Entretanto, visto que a principal função de AIRE é promover a expressão de milhares de genes, ele atua desbloqueando a cromatina em uma lógica operacionalmente oposta. Interessantemente, a ligação de PHD1 de AIRE a H3K4m0 é de baixa afinidade, o que sugere uma interação dinâmica, e não de longa duração (KOH, *et al.*, 2008). É importante ressaltar que AIRE opera como dímero/tetrâmero e por isso sua atividade nessa histona modificada é intensificada.

Dada a relativa alta frequência de H3K4m0 no genoma, parece improvável que o reconhecimento dessa modificação seja o único mecanismo pelo qual AIRE ativa a expressão de seus genes alvo. De fato, estudos subsequentes demonstraram que os genes dependentes de AIRE estão sinalizados por outros marcadores epigenéticos, os quais, geralmente, correspondem à cromatina transcrionalmente inativa. A assinatura de responsividade de AIRE é especificamente caracterizada por baixos níveis de marcadores de ativação como H3K4me3 e/ou H3-Ac, e níveis mais altos de marcadores de repressão como H3K27me3 (SANSOM, *et al.*, 2014; ORG *et al.*, 2009). Entretanto, AIRE não se liga diretamente a nenhum desses marcadores, o que sugere que ele coopera com parceiros adicionais, capazes de reconhecer essas modificações repressoras.

É importante ressaltar que o mecanismo originalmente proposto, sugerindo que AIRE é preferencialmente recrutado às regiões transcrionalmente silenciadas por meio da ligação a H3K4me0 (KOH *et al.*, 2008; ORG *et al.*, 2008), parece ser impreciso. Análises por ChIP-Seq de células HEK 293 expressando AIRE, claramente demonstraram que AIRE está ligado virtualmente a todos os genes em seus sítio de início de transcrição (TSS) (GIRAUD *et al.*, 2012), sendo eles dependentes de AIRE ou não. Tal padrão de ligação parece contradizer o fato de que AIRE induz (e reprime) apenas alguns, mas não todos, os genes do genoma (GIRAUD *et al.*, 2012; JONKERS & LIS, 2015). De acordo com esse cenário, AIRE

estaria fisicamente "pronto" no TSS da maioria dos genes. O reconhecimento de H3K4me0 pelo domínio PHD1 pode ajudar a estabiliza/ativar AIRE e/ou fornecer as adequadas condições com os parceiros corretos. Entretanto, uma região transcritionalmente ativa na cromatina poderia causar falha na estabilização de AIRE e/ou em fornecer os parceiros adequados. Portanto, apenas quando todos os seus parceiros estão posicionados corretamente, a expressão de genes dependentes de AIRE poderia ocorrer (Figura 12). Em conclusão, a ligação direta de AIRE a H3K4me0, não parece ser a principal responsável por sua interação com a cromatina. Ao invés disso, essa interação parece servir mais como um estabilizador ou como um sinal de ativação. A ligação de AIRE na região TSS da maioria dos genes parece ser mediada por outros fatores, provavelmente pela própria maquinaria de pausa/parada da transcrição.

Como descrito anteriormente, apesar de os genes induzíveis por AIRE estarem inativos, eles já apresentam a RNA polimerase II (RNAP-II) engajada em sua região TSS. Isso significa que na ausência de AIRE, a maquinaria transcritcional basal já está situada, mas a RNAP-II está estagnada, incapaz de gerar transcritos estáveis e funcionais (JONKERS & LIS, 2015). Especificamente, quando no seu estado pausado, a RNAP-II está fosforilada no seu resíduo de serina-5 dentro de um motivo repetido no seu domínio carboxi-terminal (CTD) pelo fator de transcrição geral TFIIF (JONKERS & LIS, 2015). A pausa transcritcional é caracterizada pela habilidade da RNAP-II de transcrever os primeiros 30-60 pares de base (bp), os quais são depois bloqueados pela ação de fatores de pausa dominantes como DSIF e NELF. Para a transcrição continuar, o bloqueio deve ser liberado pelo fator de alongação P-TEFb, o qual, por sua vez, fosforila os fatores de pausa, como também os resíduos de serina-2 na CTD da RNAP-II.

Enquanto a fosforilação de fatores de pausa encerra sua ação inibitória, a fosforilação de CTD é crucial para criar a plataforma necessária para o subsequente recrutamento de fatores modificadores da cromatina, enzima de processamento de RNA e outros fatores necessários para a ativação da alongação transcritcional (JONKERS & LIS, 2015). Portanto, não é inteiramente surpreendente a descoberta de que o mecanismo pelo qual AIRE induz a expressão gênica é por meio da liberação da RNAP-II pausada/parada (Figura 14) (GIRAUD *et al.*, 2012; OVEN *et al.*, 2007). De fato, vários trabalhos demonstraram que AIRE interage fisicamente com as duas subunidades do complexo pTEFb, a ciclina dependente de quinase 9

(CDK9) e a ciclina T (CycT) (OVEN *et al.*, 2007; GIRAUD *et al.*, 2014). Mais recentemente, Yoshida *et al.* demonstrou que o recrutamento de pTEFb complexado com AIRE e a subsequente liberação da RNAP-II é mediada por BRD4 (do inglês, *Bromodomain-containing protein 4*) (Figura 14) (YOSHIDA *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que BRD4 é o principal recrutador do complexo pTEFb para a maquinaria da RNAP-II pausada por meio da acetilação das histonas H3/H4 (KANNO *et al.*, 2014; NAKAOKA *et al.*, 2015). Um estudo recente sugeriu que AIRE recruta BRD4 diretamente, via seu domínio CARD acetilado. É, entretanto, importante ressaltar que estudos prévios demonstraram que AIRE pode induzir à acetilação de H3/H4 (ORG *et al.*, 2009), sugerindo que tais modificações poderiam também recrutar várias proteínas contendo-bromodomínios, incluindo BRD4, de uma maneira indireta.

Figura 14 - Modelo proposto para a ativação gênica mediada por AIRE. AIRE se liga à cromatina na região TSS da maioria dos genes (ativa ou inativa), e sua capacidade de transcrição-transativação é positivamente regulada pela proteína deacetilase Sirt1. O sinal epigenético de repressão de genes responsivos a AIRE inclui H3K4me0 (círculos azuis), no qual AIRE se liga diretamente via PHD1. Essa ligação estabiliza AIRE e permite a formação de quebras locais de dupla-fita iniciadas por TOP-2 nas regiões TSS de genes responsivos a AIRE. Essas quebras,

por sua vez, fazem com que a DNA-PK e outro parceiro de AIRE sejam recrutados e ativados, resultando no relaxamento local da cromatina, caracterizado por mudanças epigenéticas (círculos vermelhos), por exemplo, acetilação de histonas por CBP. Esses eventos, posteriormente, levam ao recrutamento de vários mediadores da expressão gênica como o complexo pTEFb/BRD4, o qual libera a RNAP-II, permitindo a completa transcrição de genes AIRE-dependentes (Fonte: ABRAMSON & GOLDFARB, 2016)

Estudos adicionais são necessários para determinar quais desses mecanismos ocorrem *in vivo*. Além disso, apesar de o recrutamento do complexo pTEFb via BRD4 explicar como AIRE induz a liberação da RNAP-II pausada, ainda não se sabe por que essa liberação ocorre apenas em alguns genes ocupados por AIRE.

1.9 AIRE E A AUTOIMUNIDADE

O gene Aire foi primeiramente identificado como locus de suscetibilidade à doença monogênica APECED (do inglês, Autoimmune polyendocrinopathy-candidiases-ectodermal dystrophy; OMIM 240300), a qual caracteriza-se como uma síndrome autoimune autossômica recessiva (AALTONEN et al., 1994, 1997; Finnish-German APECED Consortium, 1997; NAGAMINE et al., 1997; PETERSON & PELTONEN, 2005). Até o momento, mais de 60 mutações em Aire foram identificadas nos indivíduos portadores da doença (AKIRAV et al, 2010). Essas mutações estão distribuídas pela região codificadora do gene e são, na maioria das vezes, mutações do tipo "nonsense" ou "frameshift", que resultam em um polipeptídeo truncado. A prevalência global de APECED é baixa, entretanto, a doença é mais frequente entre algumas populações isoladas, como os finlandeses (1/25.000), os sardenhos (1/14.000) e os judeus iranianos (1/9000). No total, estima-se a ocorrência mundial de 500 casos da doença (PETERSON & PELTONEN, 2005).

Portadores de APECED desenvolvem múltiplas manifestações autoimunes que se iniciam, frequentemente, na infância e na adolescência (a prevalência dos sintomas está listada na tabela 1). O primeiro sinal da síndrome geralmente é a candidíase crônica, seguida por hipoparatiroidismo, e Doença de Addison (hipocorticalismo). Pelo menos dois dos três sintomas citados devem estar presentes

para que a doença possa ser diagnosticada. Apesar de APECED ser uma doença monogênica, as apresentações clínicas são muito heterogêneas e todos os fatores que contribuem para a complexidade da síndrome não são totalmente compreendidos. Várias condições de etiologia autoimune como gastrite autoimune, hepatite autoimune, DM1, tireoidite autoimune, doença celíaca e disfunção gonadal podem estar presentes. Os pacientes podem desenvolver ainda alopecia, vitiligo, urticária e distrofias ectodérmicas que afetam o esmalte dos dentes e unhas. Ceratoconjuntivite está presente em aproximadamente um terço dos pacientes (PETERSON & PELTONEN, 2005).

Tabela 1- Doença APECED e componentes

Doença	Prevalência %
Doença de Addison	60-100
Hipoparatiroidismo	77-100
Candidíase crônica	73-100
Displasia ectodermal	10-77
Tireoidite autoimune	8-18
DM1	4-23
Hipogonadismo	31-60
Alopecia	27-72
Vitiligo	4-26
Queratopatia	12-35
Hepatite autoimune	10-19
Anemia perniciosa	12-15
Gastrite crônica	6

Fonte: Traduzido de PETERSON & PELTONEN, 2005.

Os portadores de APECED apresentam altos níveis séricos de anticorpos que reagem contra antígenos próprios. As manifestações clínicas da doença variam de

forma significativa entre os pacientes e estão associadas à presença do tipo de anticorpo secretado. Uma série de anticorpos contra vários autoantígenos, especialmente enzimas intracelulares e os expressos nos tecidos endócrinos, já foi identificada (tabela 2) (PETERSON & PELTONEN, 2005). Ainda, a produção de autoanticorpos contra citocinas, incluindo interferon- α (INF- α), interleucina 17A (IL-17a) e interleucina 22 (IL-22) em pacientes portadores da doença, pode ser responsável pelo desenvolvimento da candidíase mucocutânea (KISAND *et al.*, 2008; PUEL *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Prevalência de autoanticorpos séricos contra autoantígenos em portadores de APECED

Autoantígeno	Prevalência %
Esteróide 21 hidroxilase (P450c21)	66
Esteróide 17- α hidroxilase (P450C17)	44
Enzima de clivagem de cadeia lateral (P450scc)	52
Citocromo P4501A2	8
Ácido glutâmico descarboxilase (GAD65)	37
L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC)	51
Histidina descarboxilase (HDC)	37
Triptofano hidroxilase (TPH)	45
Tirosina hidroxilase (TH)	40
Tiroglobulina (TG)	36
Tiróide peroxidase (TPO)	36

Fonte: Adaptado de PETERSON & PELTONEN, 2005.

A relação entre a expressão de Aire e o desenvolvimento de doenças autoimunes não é simples, e várias características inerentes ao processo ainda não foram elucidadas. Apesar do efeito patológico das mutações no gene Aire serem

bem conhecidas, poderiam não ser a única causa do aparecimento de manifestações autoimunes.

1.10 A RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE A EXPRESSÃO DE AIRE COM A ADESÃO mTECs-TIMÓCITOS

Nota-se que a função do gene Aire foi deduzida a partir de estudos “genótipo-fenótipo” com pacientes portadores de APECED. Em seres humanos, mutações no gene Aire são invariavelmente associadas ao aparecimento dessa síndrome. Camundongos “*Aire-knockout*” corroboram os dados de APECED em humanos pois, camundongos deficientes de Aire apresentam autoanticorpos e infiltração de linfócitos em tecidos normais (ANDERSON et al, 2002; KONT et al., 2008). Tais observações foram importantes para se deduzir a função do gene Aire na regulação da homeostase imunológica e, portanto, na prevenção do aparecimento de autoimunidade.

Animais *Aire-knockout* têm sido amplamente utilizados como ferramentas para as investigações dos mecanismos moleculares da ação da proteína AIRE. (ANDERSON et al., 2002; DERBINSKI et al., 2005; JIANG et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito das variações parciais e transitórias nos níveis da expressão de Aire na seleção negativa das células T autorreativas no timo. Alguns trabalhos já demonstraram que não somente a total anulação, mas também a diminuição na expressão do gene Aire regula negativamente a expressão de antígenos restritos a tecidos de uma maneira dose-dependente (KONT et al., 2008). Liston e colaboradores (2004) demonstraram que a perda de uma cópia do alelo Aire em camundongos transgênicos causa defeitos severos na seleção negativa de células T e resulta na insulite das células pancreáticas (LISTON et al., 2004).

Para o presente projeto, consideramos que Aire está na base do processo que leva a indução da tolerância imunológica e para que isso ocorra é necessário o contato físico entre mTECs e timócitos. Até o momento não houve relato da mensuração do gene Aire sob esse aspecto. Acreditamos que se Aire controla a expressão de autoantígenos (TRAs) nas mTECs, e esses são apresentados aos timócitos pelo complexo MHCII-peptídeo, nossa concepção é que um sistema modelo de adesão entre mTECs e timócitos servirá para realizarmos a mensuração

da função de AIRE na sua essência. Ao perturbarmos elementos moleculares importantes por meio de silenciamento gênico, poderemos estimar de maneira quantitativa e funcional a participação de Aire no processo de adesão mTECs-timócitos.

Hipótese

2. HIPÓTESE

O *crosstalk* entre timócitos e células epiteliais tímicas representa uma etapa crucial no desenvolvimento das células T e no estabelecimento da tolerância central. Células tímicas epiteliais medulares (mTECs) contribuem para a autotolerância por meio da expressão ectópica de antígenos restritos aos tecidos (TRAs). A expressão de TRAs em mTECs é, em sua maior parte, controlada pelo gene *Autoimmune regulator* (Aire). Por meio do reconhecimento de TRAs, as células T autorreativas em desenvolvimento são selecionadas negativamente. Embora o papel de Aire na indução de tolerância central esteja bem estabelecido, os mecanismos celulares e moleculares inerentes ao processo não são totalmente conhecidos. Trabalhos apontam que não somente a total anulação, mas também a diminuição da expressão de Aire, regula negativamente a expressão de TRAs de uma maneira dose-dependente. Em vista disso, hipotetizamos que a perturbação na expressão do gene Aire interfere na adesão de timócitos às mTECs.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do silenciamento do gene Aire na adesão de timócitos às células tímicas epiteliais medulares (mTEC 3.10) por meio de um modelo experimental de adesão *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inibir os transcritos do gene Aire em células mTEC por meio de RNA de interferência (RNAi).
2. Validar por meio de qRT-PCR e por *Stellaris*® RNA a inibição dos transcritos do gene Aire.
3. Avaliar, por *western blot*, os níveis da proteína AIRE das células mTEC 3.10.
4. Imunolocalizar a proteína Aire em células mTEC 3.10 por imunofluorescência.
5. Mensurar a adesão de timócitos às células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado.
6. Caracterizar fenotipicamente a população de timócitos que passou pelo ensaio de adesão quanto a expressão de CD4 e CD8, e avaliar os níveis de apoptose.
7. Analisar o transcriptoma das células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado (após o ensaio de adesão), por meio da tecnologia de *oligomicroarrays*.

Delineamento Experimental

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LINHAGEM CELULAR mTEC 3.10

A linhagem primária de células tímicas epiteliais medulares (mTEC 3.10), utilizada neste trabalho, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Wilson Savino, então coordenador do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro/RJ.

As células mTEC 3.10 foram estabelecidas a partir do timo de camundongos recém-nascidos da linhagem C57BL/6, e o fenótipo medular determinado por imunomarcação com os anticorpos Th-3 e Th-4 mAb, que reconhecem fenótipos corticais e medulares, respectivamente. Além disso, foi demonstrado que as TECs medulares são capazes de apresentar antígenos solúveis para as células T (HIROKAWA et al., 1986; MIZUOCHI et al., 1992). Posteriormente, as células foram também avaliadas por meio da utilização de um painel de anticorpos monoclonais anti-citoqueratina, que comprovou o fenótipo medular distinto (NIHEI et al., 2003). Ainda, nosso grupo demonstrou que essa linhagem celular tem a capacidade de expressar diversos autoantígenos, e que eles são modulados quando o gene Aire é inibido (MACEDO et al., 2009).

Ainda com o propósito de confirmar o fenótipo medular das células tímicas, empregamos o seguinte painel de anticorpos monoclonais: anti-mouse CD45-PerCP; anti-mouse CD326 (Ep-CAM) e anti-mouse Ly51-PE (BD Biosciences - San Jose, CA, USA). Foi realizada, também, a marcação das células com a Lectina Aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA I) marcado com FITC (Vector Labs - Burlingame, Ca, USA). As células foram ainda marcadas com anti-mouse CD80-APC e anti-mouse MHCII-PE (BD Biosciences - San Jose, CA, USA) (GRAY et al., 2002; ALEXANDROPOULOS & DANZL, 2012). As células mTEC 3.10 são aderentes, e foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo 15 mL de meio RPMI 1640 (Gibco - El Paso, TX, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab - Campinas, SP, Brasil), e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO₂.

5.1.1 Imunofenotipagem da linhagem celular mTEC 3.10

A células mTEC 3.10 provenientes de cultura foram destacadas das garrafas com tripsina/EDTA (Cultilab - Campinas, SP, Brasil), lavadas com 5 ml de PBS (*phosphate-buffered saline* pH 7,4 – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) e transferidas para uma placa de 96 poços em fundo "U". Na placa, os botões de células foram obtidos por centrifugação a 400 x g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os botões de células ressuspensos com 100 µl de tampão de marcação (2% SFB em PBS) contendo os anticorpos monoclonais: anti-*mouse* CD45-PerCP, anti-*mouse* CD326 (Ep-CAM), anti-*mouse* Ly51-PE (BD Biosciences - San Jose, CA, USA), e também Lectina Aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA I)-FITC (Vector Labs - Burlingame, Ca,USA), diluídos na proporção 1:250. Separadamente, as células foram marcadas com anticorpos anti-*mouse* CD80-APC e anti-*mouse* MHCII-PE, da mesma forma descrita anteriormente. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após, as células foram submetidas a nova centrifugação a 400 x g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então retirado e as células ressuspensas em 200 µl de PBS gelado. A concentração das células marcadas por tubo foi de aproximadamente 1x10⁶. A aquisição dos dados provenientes da marcação das células com os respectivos anticorpos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences - San Jose, CA, USA).

5.2 INIBIÇÃO SELETIVA DO TRANSCRITO DO GENE AIRE COM RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)

5.2.1 Silenciamento do transcrito do gene Aire em cultura de células mTEC 3.10

O ensaio de silenciamento do transcrito do gene Aire foi realizado por meio da utilização do RNAi anti-Aire (sequência: GGAUUCUCUUUAAGGACUACAAUCTA GAUUGUAGUCCUUAAGAGAAUCCUC) fornecido no kit *TriFECTa™* IDT

(Coralville, IA, USA). O método escolhido para a transfecção das células mTEC 3.10 em cultura foi o de lipofecção, com o reagente *Hiperfect Transfection Reagent®* Qiagen (Valencia, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. Para determinar a melhor concentração e o melhor tempo para a inibição do gene Aire, realizou-se um experimento piloto, no qual foram testadas as concentrações de 5 e 10 nM em 24, 48 horas.

Ao atingirem semi-confluência, as células da linhagem mTEC 3.10 foram destacadas das garrafas de cultura de 75 cm² com 10 ml da solução de tripsina/EDTA por cinco minutos. As células foram quantificadas em contador automatizado *Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter* Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA). As mTEC 3.10 foram, então, submetidas à centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos. Aproximadamente 5x10⁸ células foram semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 5 ml de meio RPMI 1640 e 10% SFB, e colocadas em condições normais de cultura.

Após a colocação das células na estufa, procedeu-se a preparação dos complexos RNAi-lipofectamina. Nesta preparação, 5 e 10 nM de RNAi foram gentilmente misturados à 100 µl de *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium* Gibco (Paisley, Scotland, UK) e após, foram adicionados 6 µl de *HiperFect Transfection Reagent®* Qiagen (Valencia, CA, USA). Essa mistura foi vigorosamente agitada durante 10 segundos e em seguida, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para a formação dos complexos de transfecção RNAi-lipofectamina. Os complexos foram adicionados à cultura, e assim permaneceram por 24, e 48 horas. Como controle de transfecção foram utilizadas células mTEC 3.10 na presença apenas de lipofectamina. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.2 Extração do RNA total

A extração de RNA total foi realizada com a utilização do *mirVana miRNA Isolation Kit* Ambion® (Grand Island, NY, USA). Após 24 e 48 horas de silenciamento, as células foram destacadas das garrafas de cultura de 25 cm² por meio da adição de 5 ml de solução de tripsina/EDTA por 5 minutos. A tripsina foi inativada com meio de cultura contendo 10% de SBF, e as células colhidas por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos. O botão de células resultante foi lavado

duas vezes com PBS e, após, 1 ml de solução de lise foi adicionado. Agitou-se vigorosamente (pipetagem e 10 segundos no vórtex) para homogeneizar e lisar completamente as células. Adicionou-se 100 µl de *miRNA Homogenate Additive* e misturou-se bem (vórtex por 15 segundos).

A mistura foi deixada no gelo por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de Ácido-Fenol:Clorofórmio, e a mistura foi agitada vigorosamente no vórtex por 60 segundos. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, e então foi adicionado etanol 100% (1,25 vezes o volume recuperado após a centrifugação) à temperatura ambiente. Para cada amostra foi montada uma coluna em um tubo coletor. Cerca de 700 µl da mistura foi pipetado na coluna e centrifugado por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda a mistura lisado/etanol fosse filtrada.

Por último, 700 µl de *miRNA Wash Solution 1* foi adicionado à coluna e centrifugado por 10 segundos à 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 µl de *miRNA Wash Solution 2/3* foi aplicado na coluna e centrifugado por 10 segundos a 10.000 x g. O último passo foi repetido e, após descartar o líquido, o tubo foi centrifugado por 1 minuto para remover resíduos líquidos do filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e a ela foram adicionados 100 µl de água DEPC pré-aquecida a 95°C. O tubo foi centrifugado por 30 segundos para a recuperação do RNA total.

A fim de prevenir a contaminação das amostras por ribonucleases durante a extração e manuseio dos RNAs, o material utilizado foi previamente autoclavado, e todo o procedimento foi realizado com luvas de látex descartáveis sem talco.

5.2.3 Quantificação e Pureza do RNA Total

A quantificação e a determinação do grau de pureza das amostras de RNA total foram avaliadas por meio da utilização do aparelho *NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA), sendo que 1U (A_{260}) corresponde a 40 µg de RNA/ml. As amostras foram consideradas satisfatórias quando a razão $A_{260}/A_{280} \sim 1,8 - 2,0$ (indicando que a preparação estava livre de proteínas), e $A_{220}/A_{260} \sim 1,8$ (preparação livre de fenol).

5.2.4 Avaliação da integridade das preparações de RNA total

A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese microfluídica utilizando-se o RNA 6000 Nano chips no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer® Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA) (Figura 15).

Figura 15: Aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e *RNA 6000 Nano Chips* utilizados na eletroforese microfluídica. (1) *RNA 6000 Nano Chip* posicionado no "priming station" para espalhamento do gel e pipetagem dos reagentes. (2) *RNA 6000 Nano Chip* dentro do aparelho *Bioanalyzer 2100* pronto para ser lido. (3) *Agilent 2100 Expert Software* realizando a leitura do chip. (Fonte: <http://www.gene-quantification.de/rna-integrity.html>. Acesso em 22/01/2016).

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que anteriormente estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando-se 550 µl do RNA 6000 Nano gel em uma coluna com filtro, a qual foi submetida à centrifugação a 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 µl foi colocada em um tubo de 0,5 ml livre de nucleases e em seguida, foi adicionado 1 µl de RNA 6000 NanoDye. A amostra foi submetida ao vórtex por 10 segundos, seguido de centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano chip que foi colocado no "priming station" com os ajustes corretos. Primeiramente foram pipetados 9 µl da mistura gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa,

acoplada ao "*priming station*", o gel foi distribuído por todo o chip. Em seguida, outros 9 µl da mistura foram pipetados nos demais pontos indicados com a letra G.

Foi pipetado 1 µl do marcador de peso molecular na posição indicada e 5 µl do *RNA 6000 NanoMarker* em cada uma das amostras, bem como na posição do marcador. Por último, pipetou-se 1 µl de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 12, e com a ajuda de um *vórtex IKA MS 3* (Manca, HK, CHN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto, e em seguida colocou-se o chip no bioanalisador. O resultado foi obtido utilizando-se o *Agilent 2100 Expert Software* (que realiza o eletroforograma e a densitometria dos géis) em 10 minutos de corrida eletroforética. Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes aos padrões 28S, 18S, 5S e 4S do RNA mensageiro e com RIN (do inglês, *RNA Integrity Number*) ≥ 9.0 foram utilizadas para a síntese do cDNA.

5.2.5 Transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA

Na reação de transcrição reversa para síntese de cDNA foram utilizados 5 µg de RNA total de amostras de células mTEC 3.10 controles, e daquelas que tiveram o gene Aire silenciado. A esse RNA foi adicionado 1 µl de oligo (dT) e 1 µl de dNTPmix a 10 nM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) para um volume final de 12 µl. As amostras permaneceram a 65°C durante 5 minutos em um termociclador e, em seguida, foram colocadas em gelo para a adição de 4 µl de *Buffer 5x first-strand*, 2 µl de DTT e 1 µL de *RNasin® Ribonuclease Inhibitor Promega* (Sydney, NSW, Australia) após, procedeu-se a incubação por 2 minutos a 42°C. Finalmente, 1 µl da enzima *SuperScript II® Invitrogen* (Carlsbad, CA, USA) foi adicionado, resultando em um volume final de 20 µl. A reação permaneceu a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos.

5.2.6 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das amostras

Os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) do gene Aire, das amostras de células mTEC 3.10 controles, e daquelas que tiveram esse gene

silenciado, foram verificados por RT-qPCR em tempo real. O par de *primers* foi desenhado com o auxílio do programa *Primer3 Web Tool* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>), cujos parâmetros foram ajustados para que apresentassem temperatura de pareamento (*annealing*) de 60°C (Tabela 3).

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o reagente *SYBR® Green PCR Master Mix Applied Biosystems* (Life Technologies Corporation-Carlsbad, CA, USA), em placas de 48 poços, com ciclagem padrão de aproximadamente duas horas no aparelho *StepOne® Real-Time PCR System Applied Biosystems* (Life Technologies Corporation - Carlsbad, CA, USA) e *software* de leitura *StepOne® Real-Time PCR System Software* (versão 2.1).

A primeira etapa do processo de RT-qPCR foi a avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio da análise da curva de dissociação. Para isso, foi realizada uma quantificação absoluta do par de *primers*, utilizando-se diluições de cDNA de 1:10 a 1:1000 para calcular a eficiência da reação e, portanto, dos *primers* utilizados. A reação consiste na amplificação seguida de dissociação.

Visto que os *primers* apresentaram a eficiência adequada, a segunda etapa foi a da reação propriamente dita. Para tal, foram utilizados 10 µl de *SYBR Green PCR Master Mix*; 7,4 µl de água livre de nucleases; 0,8 µl de cada *primer* e 1 µl de cDNA, resultando em um volume final de 20 µl. O protocolo de ciclagem térmica foi: 1 x 95°C durante 10 minutos (*holding stage*); 40 x desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto (*cycling stage*) e obtenção da curva de *melting* (*melting curve stage*). A curva é obtida após três passos, sendo o primeiro de 15 segundos a 95°C, o segundo de 1 minuto a 60°C e o terceiro de 15 segundos a 95°C.

Os níveis de expressão do gene Aire foram normalizados considerando-se a expressão do gene constitutivo HPRT (*GenBank* NM_013556.2), o qual é normalmente utilizado como referência. As sequências dos *primers* desenhados para HPRT estão descritas na Tabela 3.

A avaliação da expressão dos transcritos do gene Aire por meio da RT-qPCR foi realizada por meio da comparação dos valores de quantificação relativa do gene de interesse com os valores de quantificação relativa do gene constitutivo, conforme descrito por Pfaffl (2001). Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste *t-Student* por meio do *software* estatístico *GraphPadPrism 6.0* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

Tabela 3. *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR e suas respectivas sequências *sense* e *antisense*.

Gene	Número de acesso no <i>GenBank</i>	Sequências <i>sense</i> e <i>antisense</i>
Aire	NM_001271549.1	5'GAAGCTGTACCCACCTCTGG 3' 3'ATTGAGGAGGGACTCCAGGT 3'
Hprt	NM_013556.2	5' GCCCCAAAATGGTTAAGGTT 3' 5' CAAGGGCATATCCAACAACA 3'

5.3 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU DAS MOLÉCULAS DE mRNA DE Aire (RNA FISH)

Ainda com o objetivo de avaliar a inibição seletiva do transcrito do gene Aire a nível celular, utilizou-se uma técnica recentemente lançada de hibridização fluorescente de RNA *in situ*. A técnica denominada *Stellaris® RNA FISH* (Biosearch Technologies - Novato, CA, USA), é um método de visualização de mRNA que permite a detecção simultânea, localização e quantificação de moléculas de RNA individuais a nível sub-celular, por meio de microscopia de fluorescência. Um conjunto de sondas *Stellaris FISH* compreende vários oligonucleotídeos com sequências diferentes (cada um com um marcador fluorescente), que se ligam em conjunto ao longo de um mesmo transcrito alvo para produzir um sinal pontilhado.

Para a realização da técnica de *Stellaris RNA FISH*, aproximadamente 3×10^4 células foram plaqueadas em uma lâmina circular de vidro de 13mm² posicionada em uma placa de 24 poços, e o mesmo protocolo de silenciamento gênico descrito anteriormente foi aplicado.

Decorrido o tempo necessário para a inibição dos transcritos do gene Aire, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 500 µl de PBS. Após, foram adicionados 500 µl de tampão de fixação (3,7% formamida em PBS) e a placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas por mais duas vezes com PBS e permeabilizadas com etanol 70% durante, no mínimo, uma hora em temperatura de 2 a 8 °C.

Posteriormente, o etanol foi aspirado e o tampão de lavagem (10% formamida em 2x SSC - *Saline sodium citrate*) foi adicionado às células, e deixado por 5

minutos a temperatura ambiente. Após, o tampão de lavagem foi aspirado e um tampão de hibridização (100 mg/mL dextran sulfato e 10% formamida em 2x SSC) contendo as sondas fluorescentes, que hibridizam com o RNA mensageiro de Aire, foi adicionado sobre as células.

Esse material foi incubado a 37 °C por 16 horas. Finalmente, as células foram lavadas com tampão de lavagem por 30 minutos a 37°C, os núcleos corados com DAPI (dihidrocloreto 4', 6'-diamidino 2-fenilindole) e as lamínulas observadas por microscopia confocal de fluorescência, no microscópio confocal Leica SP5 (Buffalo Grove, Illinois, USA). A quantificação dos pontos fluorescentes foi realizada com o auxílio do programa *Image J 1.49*. Foi quantificada a intensidade de fluorescência presente em quatro áreas distintas de cada célula, de um total de 10 células controle e 10 células que tiveram o gene Aire silenciado, totalizando 40 áreas contadas para cada condição. Para a análise estatística dessa quantificação foi utilizado o teste *t-Student* por meio do software estatístico *GraphPadPrism 6.0* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>). A figura 16 apresenta a representação esquemática do protocolo de hibridização fluorescente *in situ* por *Stellaris® RNA Fish*.

Figura 16. Método de hibridização fluorescente *in situ* de moléculas de mRNA por *Stellaris® RNA Fish*. (1) As células aderidas à lamínula de vidro são fixadas e permeabilizadas com etanol 70% por pelo menos 1 hora. (2) As sondas fluorescentes são adicionadas e devem ficar hibridizando por no mínimo 4 horas. (3) A lavagem é realizada para a retirada do excesso de sondas. (4) A amostra está pronta para ser observada em um microscópio de fluorescência (Fonte: <https://www.biosearchtech.com/support/education/stellaris-rna-fish>. Acesso em 22/01/2016).

5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AIRE POR WESTERN BLOT

5.4.1 Extração de proteínas totais de células mTEC 3.10

Com a finalidade de avaliar a redução na expressão da proteína AIRE nas células tratadas com RNAi anti-Aire, foi realizado o método de *western blot*. Para tal, aproximadamente 1×10^6 células foram semeadas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo 5 ml de meio RPMI 1640 e 10% de SFB e após, procedeu-se com o protocolo de silenciamento descrito previamente.

Decorrido o tempo necessário para silenciamento, as proteínas totais das células mTEC 3.10 tratadas com RNAi anti-Aire, ou tratadas apenas com lipofectamina (controle), foram extraídas. Para isso, as células foram destacadas das garrafas de cultura de 75 cm² pela adição de 10 ml de solução de tripsina/EDTA e agitação suave por 5 minutos, seguido de inativação da tripsina pela adição de excesso de meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% SFB. As células foram centrifugadas a 1000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente, lavadas por três vezes com PBS e centrifugadas novamente a 1000 x g durante 5 minutos. Depois disto, adicionamos 400 µl de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP40; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) contendo inibidores de protease, e as células foram lisadas com o auxílio de um sonificador. O homogeneizado foi, então, centrifugado a 14.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dosado pelo método de *Bradford*, e 40 µg de proteínas totais de cada uma das amostras de células foi utilizado para o experimento de *western blot*.

5.4.2 Dosagem de proteínas pelo método de *Bradford*

A dosagem de proteínas pelo método de *Bradford* baseia-se no deslocamento do pico de absorbância do corante *Coomassie Blue G* de 465 nm para 595 nm quando se liga às proteínas. O corante se liga principalmente a arginina, mas também a lisina, histidina, tirosina, triptofano e fenilalanina. A dosagem é útil para

quantificar misturas de proteínas (sempre relativo ao padrão de albumina de soro bovino), sendo rápido e sensível.

As amostras contendo proteínas, ou apenas tampão (para calibração do aparelho), foram colocadas em tubos de ensaio, nos quais se completou o volume com água *Milli-Q* para 100 µl e adicionou-se 900 µl de reagente de Bradford (100 mg *Coomassie Blue G* em 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido fosfórico 98%, e água para volume final de 1 litro), seguido de agitação imediata. A leitura das amostras foi feita após 5 minutos utilizando-se cubetas de plástico em espectrofotômetro (*Hitachi U-2000*) a 595 nm.

5.4.3 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas totais em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada utilizando-se o sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973). Foram utilizados mini-géis de poliacrilamida (10 x 8 x 0,075 cm), com gel de empilhamento de 4% e gel de separação de 10%. As amostras foram preparadas para eletroforese obedecendo a proporção 3:1 (vol/vol), respectivamente, de amostra e tampão de amostra concentrado 4x (240 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% SDS; 40% glicerol; 20% 2-mercaptoetanol; e azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95°C em banho seco. O tampão dos eletrodos conteve 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS. O padrão de pesos moleculares de proteínas utilizado foi o *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad, Hercules, CA, USA) exibindo bandas proteicas com os seguintes pesos moleculares em kDa: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10.

5.4.4 Western blot

As proteínas, uma vez separadas por SDS-PAGE, foram eletrotransferidas a 70 volts, por duas horas, para uma membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, USA), utilizando-se como tampão de transferência 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina, 20% metanol e 0,1% SDS (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência, a membrana

foi corada com 0,2% Ponceau S em 3% ácido tricloracético, por 5 minutos. Em seguida, a membrana foi descorada com água deionizada. A imunomarcagem da proteína de interesse (neste caso AIRE) iniciou-se com o bloqueio de locais inespecíficos da membrana com banho de leite desnatado (MOLICO), diluído a 5% em TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20), por uma hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal (feito em cabra) Anti-Aire D17 Santa Cruz Biotechnology®, Inc (Dallas, Texas, USA), diluído em TBS-T (1:500) *overnight*, que foi seguida de lavagens com TBS-T (três vezes rapidamente e 5 vezes de 5 minutos). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-cabra) conjugado com peroxidase (horseradishperoxidase – HRP), diluído 1:10.000 em TBS-T, por 50 minutos. Após a incubação, fez-se novamente a lavagem da membrana em TBS-T, como anteriormente, e a revelação foi feita em aparelho *ImageQuant™ LAS 500 Ge Life Sciences* (Piscataway, NJ, USA), utilizando-se o substrato apropriado para a peroxidase (*Luminata™ Forte*, Merck Millipore). A reação foi conduzida protegida da luz e fizemos exposições da membrana em diferentes intervalos de tempo. A conversão da intensidade das imagens das bandas de proteína em valores numéricos foi feita com o auxílio do programa *Image J 1.49* (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>), e a comparação desses valores entre as amostras de células mTEC 3.10 controle e Aire-silenciadas foi feita pelo teste *t-Student* na plataforma estatística *GraphPadPrism 6.0*. A proteína GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) foi utilizada como normalizador nas análises estatísticas, assim, a membrana também foi incubada com o anticorpo primário policlonal (feito em coelho) anti-GAPDH Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Nesse caso, foi utilizado um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase. O procedimento de marcação e revelação foi o mesmo utilizado para Aire.

5.5 ENSAIO DE IMUNOLocalização DA PROTEÍNA AIRE

A imunolocalização da proteína AIRE em células mTEC 3.10 e sua redução após o silenciamento do seu respectivo mRNA foi avaliada por imunofluorescência qualitativa, utilizando o anticorpo anti-Aire D17 Santa Cruz Biotechnology® (Dallas,

Texas, USA). Para esse ensaio, foram plaqueadas 3×10^4 células mTEC 3.10 em lamínulas de vidro de 13 mm^2 dispostas sobre uma placa de 24 poços. O protocolo de silenciamento foi aplicado como anteriormente descrito. Foram avaliadas células controle, as quais foram tratadas apenas com lipofectamina, e células que tiveram o transcrito do gene Aire inibido por meio de RNAi anti-Aire como anteriormente descrito. Transcorrido o tempo necessário para ocorrência do silenciamento do gene Aire, o meio de cultura foi retirado dos poços e as lamínulas lavadas com PBS por cinco vezes.

As células foram fixadas sobre as lamínulas com 300 μl de paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a três lavagens de cinco minutos cada com PBS e, então, permeabilizadas com PBS contendo 0,5% triton X-100 por cinco minutos. Seguiram mais três lavagens com PBS (de 5 min. cada), e as células foram bloqueadas por uma hora com 2% BSA em PBS. O anticorpo primário (anti-Aire D17) foi adicionado, diluído em PBS (1:50) contendo 1% BSA e incubado por uma hora. Decorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas com PBS por três vezes (de 10 min. cada), e adicionado o anticorpo secundário *Novex TM Mouse anti-Goat IgG (H+L) Rhodamine Red Conjugate* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) diluído 1:500 em PBS contendo 1% BSA por uma hora. As lamínulas foram lavadas com PBS (3 x 10 min.). Para a visualização da região citoplasmática, os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com *AlexaFluor® 488 Life TechnologiesTM* (Eugene, Oregon, USA) conforme instruções do fabricante. Por último, as lamínulas foram montadas com *ProlongGold® Antifade Mountant* (Life TechnologiesTM - Eugene, Oregon, USA) contendo DAPI (para visualização do núcleo). As lamínulas foram visualizadas em microscópio de fluorescência ApoTome Zeiss (Oberkochen, German).

5.6 ENSAIO DE ADESÃO DE CÉLULAS mTEC 3.10 COM TIMÓCITOS

5.6.1 Separação dos timócitos de camundongos

Camundongos C57BL/6 com de 5-6 semanas de idade foram sacrificados em câmara de CO₂ e os timos foram rapidamente removidos por cirurgia torácica. Os órgãos foram pinçados em meio de cultura RPMI 1640 numa placa de Petri. Os timócitos foram separados pela passagem da suspensão celular através de uma membrana de nylon (Sefar Inc. Depew, NY, USA) com porosidade de 10 µm.

A suspensão de timócitos foi centrifugada por 5 minutos a 1000 x g e as células foram lavadas duas vezes com PBS, e depois ressuspensas em meio RPMI 1640. Os timócitos assim obtidos foram utilizados no ensaio de adesão celular com as células mTEC 3.10.

5.6.2 Ensaio de adesão celular

Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento do gene Aire na adesão de mTECs com timócitos, foi realizado o ensaio estabelecido pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro/RJ (RIBEIRO-CARVALHO *et al.*, 2002; SAVINO *et al.*, 2004, 2007; OCAMPO *et al.*, 2008, LINHARES-LACERDA *et al.*, 2010), com algumas modificações. As células mTEC 3.10 em estado de semi-confluência foram retiradas dos frascos, contadas e plaqueadas na concentração de 2×10^6 células por garrafa de 75 cm². Essas células foram submetidas ao protocolo de silenciamento de Aire como já descrito. As células controle foram tratadas somente com lipofectamina.

Após o tempo necessário para o silenciamento do gene Aire, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com um novo volume de meio (para que a lipofectamina fosse retirada). Em seguida, os timócitos recém coletados (ver detalhes no item 5.6.1) foram adicionados às células mTEC na proporção de 50:1 (timócitos/mTEC). Essa co-cultura permaneceu em estufa a 37°C com 5% CO₂ durante 1 hora. Após esse período, os timócitos não aderidos às mTECs foram removidos com cuidado, e um volume de PBS a 37°C foi adicionado às garrafas, as

quais foram então deixadas na posição vertical por 5 minutos para que o restante dos timócitos não aderidos, ou aqueles fracamente aderidos fossem depositados no fundo do frasco para serem desprezados. Em seguida, as garrafas foram lavadas vigorosamente, mas agora com PBS a 4°C. Isso garantiu a remoção dos timócitos aderidos, os quais foram reservados para posterior contagem. O próximo passo consistiu em destacar as células mTEC das garrafas com o uso de uma solução de tripsina/EDTA.

Tanto os timócitos que estavam aderidos quanto as células mTEC 3.10 foram quantificados em um contador automático *Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter* *Nexcelom Bioscience* (Lawrence, MA, USA). De cada garrafa (três amostras controles e três amostras tratadas com RNAi anti-Aire), calculamos a razão entre o número total de timócitos aderidos e o número total de células mTEC. Ou seja:

$$IA = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de timócitos aderidos}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células mTEC}}$$

IA = Índice de adesão

A análise estatística foi realizada pelo *teste t-Student* na plataforma estatística GraphPadPrism 6.0 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>). Todos os ensaios de adesão foram realizados em triplicata.

5.6.3 Fenotipagem de timócitos e avaliação da apoptose por citometria de fluxo

Os timócitos provenientes do ensaio de adesão (tanto das células mTEC 3.10 controle, quanto das células tratadas com RNAi anti-Aire) foram lavados com 3 ml de PBS, e transferidos para uma placa de 96 poços com fundo "U". Os botões de células foram obtidos por centrifugação a 400 x g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os botões de células ressuspensos em 100 µl de

tampão de marcação (PBS, 2% de SFB) contendo os anticorpos monoclonais: anti-*mouse* CD3-APC Cy7, anti-*mouse* CD4-FITC e anti-*mouse* CD8-APC, diluídos em 1:250. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após, as células foram submetidas a nova centrifugação a 400 x g por 6 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 200 µl de PBS gelado. Já para a marcação de eventos de apoptose, foram adicionados às células (já ressuspensas em 100 µl de tampão de marcação) 3 µl de Anexina V (PE) e 3 µl de 7-AAD (PerCP) (BD Biosciences, CA, USA). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Decorrido o tempo necessário, 300 µl do 1x *Binding Buffer* (0,01 M HEPES, pH 7.4; 0,14 M NaCl; 2,5 mM CaCl₂) foram adicionados às amostras. Como controle, tanto para a imunofenotipagem, quanto para a marcação de apoptose, foram utilizados timócitos "frescos", recém extraídos de um *pool* de timos de camundongos C57BL/6 antes da co-cultura. A concentração das células marcadas foi de 1x10⁶ por poço. Os experimentos foram realizados em triplicata. A aquisição das amostras marcadas com os respectivos anticorpos foi feita no citômetro de fluxo *FACSCanto II* (BD Biosciences - San Jose, CA, USA), e as análises realizadas por meio do software "*FlowJo*" (Tree Star, Ashland, OR, EUA). A análise estatística dos dados gerados pelo programa "*FlowJo*", foi feita com a plataforma estatística "*GraphPadPrism 6.0*".

5.7 AVALIAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS mTEC 3.10 APÓS ADESÃO COM TIMÓCITOS

5.7.1 Hibridização das lâminas de oligomicroarrays

A avaliação do transcriptoma das células mTEC 3.10 após a adesão com timócitos (duas amostras controle e duas amostras tratadas com RNAi anti-Aire), foi feita pelo uso da tecnologia de oligomicroarrays (*Agilent Technologies* - Santa Clara, CA, USA). As etapas e reações bioquímicas deste processo estão esquematizadas na Figura 17.

Figura 17 - Representação dos processos e reações de transcrição reversa, amplificação, purificação, hibridização do *microarray* da plataforma *Agilent*. [Adaptado de G4140-90040 - *Gene Expression One-Color* - v6.5.pdf].

Os *microarrays Agilent 8x60k* são preparados por meio do processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual 60.000 oligos são depositados uniformemente em lâminas de vidro previamente preparadas (Figura 18). Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, de 60-mer de comprimento, com extrema precisão, utilizando arquivos de RNAs mensageiros baseados em bancos de dados.

Figura 18 - Representação de uma lâmina de vidro para microarray *Agilent Technologies* no formato 8x60k contendo oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de mRNAs.

A marcação das amostras foi feita com a utilização do *Quick Amp Labeling Kit One-Color* (Agilent Technologies - Santa Clara, CA, USA). O primeiro passo envolve a diluição do *Agilent One-Color Spike-Mix*. Inicialmente ele foi aquecido a 37°C em banho-maria por 5 minutos, homogeneizado por meio de agitação em vórtex, e depois centrifugado brevemente antes do uso.

Em seguida, foram feitas diluições seriadas segundo recomendação do fabricante, levando em consideração a quantidade inicial de RNA total. A primeira diluição (1:20) foi feita a partir de 2 µL do *Agilent One-Color Spike-Mix* adicionados a 38 µL do *Dilution Buffer* proveniente do kit. Após homogeneização em vórtex, retirou-se 2 µL da primeira diluição e adicionou-se 48 µL do *Dilution Buffer*, obtendo-se assim a segunda diluição (1:25). A terceira diluição (1:10) foi preparada a partir de 4 µL da segunda diluição adicionados a 36 µL do *Dilution Buffer*.

Feitas as diluições, iniciou-se o protocolo de marcação das amostras. Em um tubo de 1,5 ml foi adicionado 200 ng de RNA em um volume total de 1,5 µL, 2 µl de

Spike Mix, e 0,8 µL de *T7 Promoter Primer* diluído em 1 µL de água livre de nucleases. As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e posteriormente em gelo por 5 minutos. Durante o período de incubação, uma solução de cDNA *Master Mix* foi preparada com 2 µL do 5X *First Strand Buffer* (pré-aquecido a 80°C por 4 minutos), 1 µL de 0,1 M DTT, 0,5 µL de 10 mM dNTP mix e 1,2 µL de *Affinity Script RNase Block Mix*. Após, 84,7 µL de mix foi distribuído em cada tubo de amostra. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 40°C por 2 horas, a 70°C por 15 minutos e em gelo por mais 5 minutos. Imediatamente antes do uso, foi preparado um *Transcription Master Mix* com 0,75 µL de água livre de nucleases, 3,2 µL de 5X *Transcription Buffer*, 0,6 µL de 0,1 M DTT; 1 µL de NTP mix, 0,21 µL de T7 RNA Polymerase e 0,24 µL de Cyanine 3-CTP. Cada tubo de amostra recebeu 6 µL *Transcription Master Mix* e, após homogeneização, as amostras foram incubadas a 40°C em um banho-maria por 2 horas.

O passo que sucede a incubação envolve a purificação do RNA amplificado e marcado. Para tal procedimento foi utilizado o *IllustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare - Little Chalfont, BUX, UK). Um passo inicial de limpeza do RNA foi realizado adicionando-se tampão RA1 (3,5 vezes o volume da reação) em cada amostra, e esse mesmo volume de etanol 100% com posterior homogeneização.

A purificação do RNA foi realizada com o uso das colunas RNAspin Mini, aplicando-se o volume total de cada amostra na coluna, seguida de centrifugação por 30 segundos a 8.000 x g. Cada coluna foi, então, transferida para outro tubo coletor. Foram aplicados posteriormente 600 µL do tampão RA3 em cada coluna, seguido de uma centrifugação de 1 minuto a 11.000 x g. O líquido foi descartado e uma coluna nova foi colocada no tubo para uma terceira lavagem, na qual foram aplicados 250 µL do tampão RA3, seguido de centrifugação por 2 minutos a 11.000 x g. O último passo do kit envolve a eluição do RNA em alta concentração, por meio da adição de 40 µL de água livre de nucleases e centrifugação por 1 minuto a 11.000 x g. Em seguida, o RNA foi quantificado no *NanoDrop ND-2000 UV-VIS* espectrofotômetro (Thermo Scientific - Waltham, MA USA), e foi feito o cálculo para a massa total. Além disso, nessa etapa, é também detectada a incorporação do fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras pela leitura dada em pmol/µL. O valor da incorporação total dividido pela massa total serve como referência para o

prosseguimento do passo de hibridização. Somente as amostras que obtiveram os valores acima de seis são utilizadas.

Anterior ao passo de hibridização, as amostras passaram por um processo de fragmentação com o *Fragmentation Mix* para 8x60K microarrays. Cada amostra contendo 1,65 µg de RNA marcado e amplificado (cRNA) recebeu 11 µL de 10X *Blocking Agent* (preparado com a adição de 500 µL de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos). Nesse momento o volume da reação não deve ser superior a 52,8 µL, sendo necessário completar cada amostra com o volume de água livre de nucleases correspondente. Por último, são adicionados 2,2 µL de 25x *Fragmentation Buffer* em cada tubo sendo o volume final da reação de 55 µL. Em seguida as amostras são incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

Após a incubação, seguindo a recomendação do kit para lâminas de microarrays 8x60K, adicionou-se 25 µL do 2x *GExHybridization Buffer HI-RPM* em cada tubo, e após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 x g. Um volume de 40 µL de cada amostra foi utilizado imediatamente para o processo de hibridização no forno a 65°C em rotação durante 17 horas.

Após a hibridização, as lâminas passaram por um processo de lavagem na seguinte ordem: tampão 1 (GE *Wash Buffer* 1 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto à temperatura ambiente, tampão 2 (GE *Wash Buffer* 2 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto a 37°C. Ambas as lavagens foram feitas em um agitador com o auxílio de barras magnéticas. A lavagem das lâminas foi o último passo do protocolo de hibridização dos *microarrays*

5.7.2 Aquisição das imagens de hibridização

Após as etapas de lavagem, as lâminas foram imediatamente escaneadas, evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais. As imagens de hibridização foram obtidas com a leitura do espectro em 550 nm, utilizando-se o scanner para microarrays *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com a tecnologia de alta resolução *Surescan*.

5.7.3 Análise dos dados de *microarray*

Após o escaneamento das lâminas, os dados foram extraídos com o uso do *Agilent Feature Extraction Software* e os arquivos gerados foram analisados no ambiente R (versão 2.13.1 - *R Development Core Team*, 2011). A linguagem de programação R ("*The R Project for Statistical Computing*") consiste em um ambiente estatístico-matemático que permite a execução de cálculos e visualização gráfica dos dados. Existem inúmeros pacotes de funções múltiplas, amplamente utilizados em análises de dados de *microarrays*.

Utilizamos na fase de pré-processamento dos dados, as ferramentas contidas nos pacotes *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al., 2009) e *Agi4x44PreProcess* (López-Romero et al., 2010) possuem vários algoritmos que permitem avaliar qualitativamente os *arrays* obtidos, além de fazer a correção do *background* e a normalização dos dados.

Para análise dos mRNAs diferencialmente expressos, utilizamos as funções do pacote *limma* (Wettenhall & Smyth, 2004), o qual aplica um modelo linear na análise estatística *gene-wise*. Além disso, *Empirical Bayes* e outros métodos de correção são usados para medir as informações por meio de genes que fazem as análises estáveis, mesmo para experimentos com pequeno número de matrizes. O método de *Benjamini-Hochberg* foi aplicado para a correção para múltiplos testes (Benjamini et al., 1995)

Neste trabalho, foram considerados diferencialmente expressos genes com valor de $p < 0.05$, com correção por FDR (*Benjamini Hochberg*) e *foldchange* de no mínimo 1.5. Os genes diferencialmente expressos obtidos foram submetidos ao agrupamento hierárquico e o *heatmap* foi construído para avaliar o padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos. A distância euclidiana e o método *complete linkage* foi utilizado para a clusterização das amostras e genes.

5.7.4 Enriquecimento funcional dos mRNAs diferencialmente expressos

A lista dos mRNAs diferencialmente expressos foi submetida à análise de enriquecimento funcional a partir da ferramenta de anotação DAVID (*Database for*

Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) versão 6.7, que integra dados de diversos bancos e está disponível no endereço: (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

Esta ferramenta foi utilizada para identificação dos principais processos biológicos e vias representadas pelos genes diferencialmente expressos. Uma categoria foi considerada significativa caso tivesse no mínimo três genes e um *score* <0.05 com correção de *Benjamini-Hochberg*.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR mTEC 3.10

A caracterização das células da linhagem mTEC 3.10 foi feita por meio de marcação específica com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-mouse CD45-PerCP; anti-mouse CD326 (Ep-CAM), anti-mouse Ly51-PE (BD Biosciences - Sao Jose, CA, USA) e ainda com a Lectina Aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA I)-FITC (Vector Labs - Burlingame, Ca,USA). As células foram marcadas ainda com anti-mouse CD80-APC e anti-mouse MHCII-PE PE (BD Biosciences - Sao Jose, CA, USA) (Figura 19) (GRAY et al., 2002; ALEXANDROPOULOS & DANZL, 2012). As características medulares distintas foram confirmadas pelo fenótipo: CD45⁺Ep-CAM⁺Ly51⁺UEA-1⁺ (figura 19). Verificou-se ainda que tratava-se de uma população celular heterogênea, visto que muitas células não apresentavam a expressão de MHCII e CD80 (Figura 19).

Figura 19 - Fenotipagem da linhagem celular mTEC 3.10 por citometria de fluxo. Os histogramas representativos mostram a expressão de marcadores de superfície pelas células mTEC 3.10. Os marcadores examinados foram: CD45; Ep-CAM; Ly51; UEA-1; CD80 e MHCII. (A) Os dados confirmam o fenótipo medular dessas células que foram negativas para o marcador hematopoiético CD45 e positivas para o marcador de células epiteliais Ep-CAM, para UEA-1 e negativas para o marcador de células tímicas epiteliais corticais Ly51 (CD45⁻Ep-CAM⁺ Ly51⁻ UEA-1⁺). (B) A marcação com CD80 e MHCII revela uma população celular heterogênea no que diz respeito ao estágio de maturação, sendo que a maioria das células apresentava-se negativa para esses marcadores.

6.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL

A qualidade do RNA total extraído das células mTEC 3.10 controle e tratadas com RNAi anti-Aire foi avaliada por eletroforese microfluídica por meio do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*. A integridade das amostras pode ser observada pela imagem do gel virtual (figura 20) e da densitometria, as quais mostram as frações de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAr 4-5S e também de RNAs de baixo peso molecular. Todas as amostras exibiram um perfil que indica excelente integridade (figura 21).

Figura 20 - Representação de um gel virtual das amostras de RNA estudadas: RNAr 28S, RNAr 18S e RNAr 4-5S. C1 24h, C2 24h e C3 24h = mTEC 3.10 tratadas somente com lipofectamina por 24 horas (controle). A1 24h, A2 24h e A3 24h = mTEC 3.10 tratada com lipofectamina + RNAi anti-Aire por 24 horas. Ladder = marcador de peso molecular em pares de bases.

Figura 21 - Densitometria das amostras de RNA estudadas mostrando as frações de RNAr 28S, RNAr 18S e RNAr 4-5S. C1_24h, C2_24h e C3_24h = mTEC 3.10 tratadas somente com lipofectamina por 24 horas (controle). A1_24h, A2_24h e A3_24h = mTEC 3.10 tratada com lipofectamina + RNAi anti-Aire por 24 horas.

6.3 INIBIÇÃO SELETIVA DOS TRANSCRITOS DO GENE AIRE COM RNAi

Os transcritos do gene Aire (das células mTEC 3.10) foram silenciados por meio de lipofecção com RNAi anti-Aire (sequência: GGAUUCUCUUUAAGGACUAC AAUCTAGAUUGUAGUCCUUAAGAGAAUCCUC). Para a determinação da melhor concentração de RNAi e tempo de silenciamento, realizou-se um experimento piloto no qual foram testadas as concentrações de 5 e 10 nM em 24, 48 e 72 horas, como descrito na metodologia. A concentração de 5 nM de RNAi anti-Aire e o tempo de silenciamento de 24 horas mostraram-se mais eficientes na inibição dos transcritos do gene Aire, e portanto, tanto essa concentração de RNAi, quanto o tempo de silenciamento foram utilizados nos experimentos subsequentes. Na figura 22 podemos observar o efeito do silenciamento parcial e transitório do gene Aire pela ação do RNAi nas diferentes condições testadas.

Figura 22 - Avaliação da inibição parcial e transitória do transcrito do gene Aire por PCR em tempo real. As RT-qPCRs foram realizadas nas seguintes condições: mTEC 3.10 na ausência de RNA interferente e mTEC na presença e diferentes concentrações de RNAi anti-Aire (5 e 10 nM) nos tempos de 24 e 48 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A melhor resposta de inibição do gene Aire foi obtida no tempo de 24 horas de silenciamento e concentração de RNAi anti-Aire de 5 nM. one-way ANOVA. $p < 0,05$.

6.4 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU DAS MOLÉCULAS DE RNA MENSAGEIRO DE Aire COM STELLARIS® RNA FISH

Com o objetivo de avaliar a inibição seletiva do transcrito do gene Aire por uma metodologia adicional, utilizou-se a técnica de hibridização fluorescente *in situ* com *Stellaris® RNA FISH*. Essa técnica permite a visualização, localização e quantificação de moléculas de RNA mensageiro a nível subcelular por meio de microscopia de fluorescência.

O teste estatístico (*t-Student*) revelou uma diminuição significativa na intensidade do sinal fluorescente das amostras tratadas com RNAi anti-Aire, em relação às amostras controle (figura 23). Nas imagens feitas por microscopia confocal, a redução na quantidade de pontos fluorescentes nas células tratadas com RNAi anti-Aire fica evidente (Figura 24).

Figura 23 - Gráfico resultante da análise estatística da comparação entre a quantificação do sinal fluorescente das amostras tratadas com RNAi anti-Aire, em relação às amostras controle provenientes do ensaio de hibridização fluorescente *in situ* por *Stellaris RNA FISH*. Teste *t-Student* *** $p < 0,0001$.

Figura 24 - Hibridização fluorescente *in situ* das moléculas de RNA mensageiro de Aire por *Stellaris® RNA FISH*. (A) Células mTEC 3.10 controle (células tratadas apenas com lipofectamina por 24 horas). (B) Células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado (células tratadas com RNAi anti-Aire e lipofectamina por 24 horas). Os pontos verdes marcam as moléculas de RNA mensageiro de Aire. Os núcleos estão corados com DAPI (azul). Escala de 20 µm.

6.5 WESTERN BLOT DA PROTEÍNA AIRE

Com o objetivo de verificar redução nos níveis da proteína AIRE, foi realizado o *western blot* das amostras controle, e das amostras que tiveram o gene Aire silenciado. Para o silenciamento, utilizou-se a concentração de 5 nM de RNAi (a qual apresentou melhor eficiência na inibição do gene) nos tempos de 24 e também 48 horas, visto que nem sempre as quantidades de RNA mensageiro e de proteína são proporcionais. Foi observada redução parcial (aproximadamente 51%) nos níveis da proteína AIRE das células que tiveram seu gene silenciado, em relação ao controle após 24 horas da transfecção. Teste *t-Student* $p=0,0129$. Em 48 horas após a transfecção, os níveis da proteína AIRE já estão quase totalmente restituídos (figura 25).

Figura 25 - *Western blot* evidenciando a diminuição dos níveis da proteína AIRE após tratamento com RNAi anti-Aire. (A) *Western blot* mostrando a marcação da proteína AIRE (aproximadamente 55 kDa) de amostras obtidas pela extração total de proteínas das células mTEC 3.10 controle, e tratadas com 5 nM de RNAi anti-Aire por 24 horas. O gráfico representa a quantificação da intensidade das bandas em pixels/área. Foi observada uma redução de aproximadamente 51% nos níveis da proteína AIRE nas células tratadas em relação ao controle. Teste *t-Student* * $p = 0,0129$. (B) *Western blot* mostrando a marcação da proteína AIRE (aproximadamente 55 kDa) de amostras obtidas pela extração total de proteínas das células mTEC 3.10 controle, e tratadas com 5 nM de RNAi anti-Aire por 48 horas. O gráfico representa a quantificação da intensidade das bandas em pixels/área. Nesse caso pode-se observar que os níveis da proteína AIRE estão quase completamente restituídos. Teste *t-Student* $p = 0,1627$. O gene constitutivo GAPDH foi utilizado para a normalização das quantificações e os experimentos foram realizados em triplicata.

6.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA PROTEÍNA AIRE

A imunolocalização da proteína AIRE foi analisada por imunofluorescência com o anticorpo anti-Aire D17 conforme descrito na seção "Material e Métodos". Para esse ensaio foram utilizadas células controle e células transfectadas com 5 nM de RNAi anti-Aire por 24 horas. A proteína AIRE pode ser observada como pontos vermelhos distribuídos pelo núcleo das células. Nas células que tiveram o gene Aire silenciado, praticamente não foi observada a presença de proteínas por esse método (Figura 26).

Figura 26 - Imunofluorescência da proteína AIRE. As células da linhagem mTEC 3.10 foram fixadas em lamínulas de 13mm². A proteína AIRE foi marcada com o anticorpo primário anti-Aire D17 conjugado com anticorpo secundário marcado com rodamina (vermelho). Os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com *AlexaFluor® 488* (verde), e o núcleo foi corado com DAPI (dihidrocloreto 4', 6'-diamidino 2-fenilindole). As lamínulas marcadas foram observadas por microscopia confocal de fluorescência no microscópio Leica SP5. (A) Células controle. A proteína AIRE pode ser observada como pontos vermelhos espalhados pelo núcleo. (B) Células que tiveram o gene *Aire* silenciado. Pode-se observar a ausência da proteína. Escala de 20 μ m.

6.7 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR mTEC 3.10/TIMÓCITOS

Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento do gene Aire na adesão de timócitos às mTECs, foi realizado um ensaio de adesão conforme detalhado na metodologia.

Tanto os timócitos, quanto as células mTEC 3.10, provenientes do ensaio de adesão, foram quantificados e de cada garrafa (três controles e três tratadas com RNAi anti-Aire), foi calculada a razão entre o número total de timócitos aderidos e o número total de mTECs presentes na garrafa. Esse valor representou a média de timócitos aderidos por mTEC e foi chamado de índice de adesão (IA). Aos IAs obtidos, aplicamos o teste t-*Student* com o intuito de verificar se houve diferença entre as situações experimentais (células controle x células tratadas). Verificamos que a adesão dos timócitos às células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado, foi significativamente menor que a adesão dos timócitos às células, cujo gene não foi silenciado (controle) ($p=0,0019$) (figura 27).

Figura 27 - Ensaio de adesão mTEC 3.10/timócitos. (A) Foto proveniente do ensaio de adesão entre células mTEC 3.10 controle e timócitos. (B) Foto proveniente do ensaio de adesão entre células mTEC 3.10 transfectadas com RNAi anti-Aire e timócitos. Pode-se observar nitidamente o menor número de timócitos (seta) aderidos às células mTEC 3.10 que tiveram do gene Aire inibido por meio de RNAi. Escala de 20 μ m. (C) Gráfico resultante da análise comparativa entre os IAs das células nas diferentes condições experimentais. O gráfico representa o número médio de timócitos aderidos por mTEC. Teste *t-Student* ** $p = 0,0019$. Os ensaios de adesão foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes.

6.8 FENOTIPAGEM DOS TIMÓCITOS E AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Por meio do ensaio de adesão verificamos que a inibição parcial do gene Aire nas células mTEC 3.10 resultou em um decréscimo significativo na capacidade destas células em permitir a adesão de timócitos. Tal diminuição na adesão é composta por todos os conjuntos de timócitos CD3 positivos, uma vez que suas proporções são semelhantes nas três populações: duplo positivos ($CD4^+CD8^+$); simples positivos $CD4^+$ e simples positivos $CD8^+$, como avaliado por citometria de fluxo (figura 28). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de apoptose dos timócitos entre as duas condições experimentais (figura 29).

Figura 28. Imunofenotipagem das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo. Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região das células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominadas *singlets*, determinado pelo tamanho em relação à altura (FSC-H) e em relação à área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na população de células vivas e posteriormente na população CD3⁺. A partir daí foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de timócitos: CD4⁻CD8⁻ (DN); CD4⁺CD8⁺ (DP); CD4⁺CD8⁻ (CD4SP) e CD4⁺CD8⁺ (CD8SP). (A) O gráfico de pontos mostra o perfil CD4/CD8 de timócitos frescos extraídos do timo de um camundongo C57BL/6 que não passaram pelo ensaio de adesão. (B) Os gráficos de pontos mostram que a significativa redução na adesão dos timócitos às células mTEC que tiveram o gene Aire silenciado em relação às células controle, compreende todos os subconjuntos de timócitos, uma vez que essas proporções são semelhantes nas duas condições experimentais. (C) O gráfico de barras mostra o percentual de cada subpopulação de timócitos que passou pelo ensaio de adesão nas duas condições experimentais. A comparação entre os percentuais de cada subpopulação que foi co-cultivada com células mTEC controle, e células mTEC que tiveram o gene Aire silenciado não apresentou significância estatística. Teste *t-Student* $p = 0,7893$. Timócitos = timócitos frescos que não passaram pelo ensaio de adesão. Controle = timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC 3.10 controle. RNAi_Aire = timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado.

Figura 29. Avaliação da apoptose dos timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC 3.10 controle, e que tiveram o gene Aire silenciado. Os timócitos foram incubados com um tampão contendo Anexina V-PE e 7AAD e analisados por citometria de fluxo. Células viáveis são Anexina V-7AAD⁻, células em apoptose são Anexina V+7AAD⁻, células em estágios finais de apoptose são Anexina V+7AAD⁺ e células mortas ou necróticas são Anexina V-7AAD⁺. (A) O gráfico de pontos mostra o perfil de apoptose de timócitos frescos extraídos do timo de um camundongo C57BL/6 que não passaram pelo ensaio de adesão. (B) Os gráficos de pontos mostram que praticamente não houve diferença nos níveis de apoptose entre os timócitos que passaram pelo ensaio de adesão nas duas condições experimentais. (C) O gráfico de barras apresenta a comparação entre os percentuais de timócitos (em cada estágio de apoptose) nas condições experimentais analisadas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Teste t-Student $p = 0,6846$. Timócitos = timócitos frescos que não passaram pelo ensaio de adesão. Controle = timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC 3.10 controle. RNAi_Aire = timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado.

6.9 AVALIAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM mTEC 3.10 QUE PASSARAM PELO ENSAIO DE ADESÃO

A análise da expressão dos mRNAs em escala genômica foi realizada na plataforma da *Agilent* (60000 oligos), e os dados processados com as funções estatísticas do *software* R. Na fase de pré-processamento, foram utilizadas as ferramentas contidas nos pacote *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al., 2009) e *Agi4x44PreProcess* (López-Romero et al., 2010), os quais possuem vários algoritmos que permitem avaliar qualitativamente os *arrays* obtidos, além de fazer a correção do *background* e a normalização dos *arrays* (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico *boxplot* das amostras de mRNA extraídos das células mTEC 3.10 que passaram pelo ensaio de adesão após a normalização. Em azul estão representadas as amostras controle, e em salmão as amostras que tiveram o gene Aire silenciado por meio de RNA de interferência.

Na fase da análise, a primeira abordagem utilizada foi a comparação do perfil de expressão global dos RNAs das células mTEC 3.10 controle, e das células mTEC 3.10 tratadas com RNAi anti-Aire que passaram pelo ensaio de adesão. Essa abordagem foi utilizada com o intuito de avaliar a similaridade dos perfis de

expressão gênica transcricional entre as condições estudadas. Para isso, foi utilizada a correlação de *Pearson* como medida de similaridade de expressão gênica e o agrupamento hierárquico dos dados de expressão pré-processados.

Essa análise gerou um gráfico de coeficiente de correlação entre as amostras, no qual podemos observar que o valor da escala numérica da legenda de cor aponta a presença de alta correlação entre as amostras controle; alta correlação entre as amostras que tiveram o gene Aire silenciado; e uma correlação mais baixa entre os dois grupos. O dendrograma apresenta a relação hierárquica entre as amostras. Podemos verificar que apesar de haver correlação entre as células controle e as células que tiveram o gene Aire silenciado há distinção entre os grupos (figura 31).

Figura 31 - Agrupamento hierárquico resultante da aplicação do coeficiente de correlação de *Pearson* mostrando a relação entre a expressão de transcritos de mRNA entre as amostras controle (C1 e C2) e as amostras que tiveram o gene Aire silenciado (RNAi_Aire1 e RNAi_Aire2).

Procedeu-se então com a análise estatística para a caracterização do perfil transcricional das amostras estudadas por meio da definição da expressão gênica diferencial utilizando os recursos de modelagem linear do pacote limma. A matriz de

contraste foi desenhada de modo que permitisse a comparação das amostras controle e das amostras que tiveram o gene Aire silenciado.

Evidenciou-se um total de 1278 genes diferencialmente expressos, sendo que 426 estavam induzidos e 852 estavam reprimidos. Foi utilizado como *cutoff pvalue* ajustado $< 0,05$ (*Benjamini-Hochberg-FDR*) e *fold change* $\geq 1,5$. Uma tabela contendo os genes diferencialmente expressos entre as amostras controle e as amostras que tiveram o gene Aire silenciado, bem como os valores de *fold change*, encontra-se no "Apêndice A".

Em seguida, empregou-se uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado com base nos 1278 genes diferencialmente expressos, a qual permitiu a identificação dos grupos de genes induzidos e reprimidos, bem como a relação de similaridade entre amostras (em relação aos genes diferencialmente expressos) (figura 32). É possível observar a variabilidade nas assinaturas de hibridização entre os dois grupos de amostras. Na parte superior horizontal do dendrograma vemos as amostras agrupadas em dois grupos distintos (figura 32).

Figura 32 - *HeatMap* do agrupamento hierárquico não supervisionado das amostras de células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado por meio de RNAi anti-Aire, com base nos 1278 genes diferencialmente expressos ($FC \geq 2$ e $FDR \leq 0,05$).

6.10 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

Para verificarmos o efeito da perturbação na expressão do gene Aire no transcriptoma das células mTEC 3.10, o conjunto de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre as células controle e as células que tiveram o gene Aire silenciado foi submetido à anotação por categorias funcionais através da ferramenta DAVID, com o intuito de identificar categorias de *Gene Ontology* (GO) enriquecidas. As categorias de GO abrangem três domínios: Componente Celular (CC, do inglês *Cellular Component*), as partes de uma célula ou de seu ambiente extracelular; Função Molecular (MF, do inglês *Molecular Function*), as atividades elementares de um produto do gene ao nível molecular, tais como a ligação ou catalização; e Processo Biológico (BP, do inglês *Biological Process*), operações ou conjuntos de eventos moleculares com um começo e fim definidos, pertinentes ao funcionamento de unidades vivas integradas como células, tecidos, órgãos e organismos.

Como os genes podem estar enriquecidos em mais de uma categoria, utilizamos a ferramenta de agrupamento do próprio DAVID para agrupar os termos que possuem significado similar por compartilharem genes. Os grupos são dispostos em ordem de importância de acordo com a pontuação de enriquecimento (*score*), que é calculada de acordo com o *EASE score* (*p value*) de cada membro do grupo. Uma categoria foi considerada significativa quando tinha no mínimo três genes e um $\text{score} < 0.05$ com correção de *Benjamini-Hochberg*.

Os termos mais enriquecidos de cada categoria funcional de GO e os genes que as compreendem estão representados nas tabelas 4 e 5 (genes reprimidos) e 6 e 7 (genes induzidos) respectivamente.

Tabela 4: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (reprimidos) entre células mTEC 3.10 controle, e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Reprimidos			
Grupo 1			
Score de Enriquecimento: 3,07			
Categoria	Termos Enriquecidos	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
CC (GOTERM)	GO:0005576~extracellular region	66	<0,0001
MF (PANTHER)	MF00178:Extracellular matrix	21	<0,0001
BP (PANTHER)	BP00124:Cell adhesion	28	<0,0001
CC (GOTERM)	GO:0031012~extracellular matrix	18	0,0014
CC (GOTERM)	GO:0044421~extracellular region part	33	0,0021
CC (GOTERM)	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	17	0,0024
Grupo 2			
Score de Enriquecimento: 2,62			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (PANTHER)	BP00122:Ligand-mediated signaling	19	0,0018
CC (GOTERM)	GO:0044421~extracellular region part	33	0,0021
BP (PANTHER)	BP00274:Cell communication	41	0,0036
Grupo 3			
Score de Enriquecimento: 2,41			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (PANTHER)	BP00124:Cell adhesion	28	<0,0001
BP (PANTHER)	BP00274:Cell communication	41	0,0036
MF (PANTHER)	MF00258:CAM family adhesion molecule	6	0,0394

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 4: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (reprimidos) entre células mTEC 3.10 controle, e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Reprimidos			
Grupo 4			
Score de Enriquecimento: 2,15			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
CC (GOTERM)	GO:0031224~intrinsic to membrane	171	0,0011
CC (GOTERM)	GO:0016021~integral to membrane	166	0,0011
BP (PANTHER)	BP00142:Ion transport	27	0,0016
MF (PANTHER)	MF00001:Receptor	70	0,0031
BP (PANTHER)	BP00141:Transport	46	0,0033
BP (GOTERM)	GO:0006811~ion transport	28	0,0092
BP (PANTHER)	BP00102:Signal transduction	110	0,0131
Grupo 5			
Score de Enriquecimento: 2,00			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
CC (GOTERM)	GO:0031012~extracellular matrix	18	0,0014
BP (GOTERM)	GO:0030324~lung development	8	0,0154
BP (GOTERM)	GO:0030323~respiratory tube development	8	0,0168
BP (GOTERM)	GO:0060541~respiratory system development	8	0,0265
Grupo 6			
Score de Enriquecimento: 1,94			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (GOTERM)	GO:0006954~inflammatory response	16	<0,0001
CC (GOTERM)	GO:0044421~extracellular region part	33	0,0021

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 4: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (reprimidos) entre células mTEC 3.10 controle, e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Reprimidos			
Grupo 6			
Score de Enriquecimento: 1,94			
BP (GOTERM)	GO:0002252~immune effector process	10	0,0028
BP (GOTERM)	GO:0009611~response to wounding	18	0,0033
BP (GOTERM)	GO:0045087~innate immune response	9	0,0036
BP (GOTERM)	GO:0006952~defense response	21	0,0045
BP (GOTERM)	GO:0002541~activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	5	0,0096
BP (GOTERM)	GO:0006956~complement activation	5	0,0096
BP (GOTERM)	GO:0002526~acute inflammatory response	7	0,0117
BP (GOTERM)	GO:0006955~immune response	20	0,0151
MF (GOTERM)	GO:0030246~carbohydrate binding	15	0,0165
MF (PANTHER)	MF00174:Complement component	5	0,0222
BP (GOTERM)	GO:0002684~positive regulation of immune system process	11	0,0233
BP (PANTHER)	BP00153:Complement-mediated immunity	5	0,0300
Grupo 7			
Score de Enriquecimento: 1,84			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (PANTHER)	BP00142:Ion transport	27	0,0016
BP (PANTHER)	BP00141:Transport	46	0,0033
MF (GOTERM)	GO:0015293~symporter activity	10	0,0036
BP (GOTERM)	GO:0006811~ion transport	28	0,0092
MF (PANTHER)	MF00082:Transporter	26	0,0107

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 5: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (reprimidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
1	Extracellular region	Retnla, Aebp1, A2m, Mug1, Enam, Igfbp6, Il19, Arsj, Hp, Postn, C1qc, Serpina3b, Kiss1, Art5, Saa2, Serpina7, Cfh, Sema3b, Defb34, Hhip, Lbp, Mmp1a, Shbg, Kng1, Hhip11, Wnt10b, Hyal3, Icam4, Scube1, Mgp, Tcn2, Mmp12, Slit2, Adamts7, Pla2g2d, Chl1, Smr3a, Ay074887, Fras1, Cxcl1, Ccl3, Apoc1, Col2a1, Pf4, Psap11, Il33, Islr, Calcb, Crisp1d2, Sftpd, C2, Rnase13, Plat, Hapln1, Cpa4, Pla2g10, Olr1, Nid1, Emilin2, Emilin3, Lama1, Gkn2, Frem3, Dmbt1, Ai182371, Habp2
1	Extracellular matrix	Hapln1, Tlr11, Flrt1, Rxfp1, Scube1, Enam, Lrrc4b, Mgp, Nid1, Col2a1, Emilin2, Lgr5, Emilin3, Mmp12, Slit2, Islr, Lama1, Lingo4, Gm12, Clec3a, Mmp1a
1	Cell adhesion	Megf9, Lrrc4b, Col2a1, Postn, Scarf1, Vcam1, Cdh7, Ceacam2, Ceacam14, Hapln1, Hyal3, Icam4, Sipa112, Lgals12, Nfasc, Timd4, Nid1, Nrnx1, Ptpu, Emilin2, Cercam, Pcdh17, Emilin3, Lama1, Itgad, Clec4b1, Chl1, Habp2
1	Extracellular matrix	Fras1, Hapln1, Wnt10b, Enam, Nid1, Col2a1, Postn, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Adamts7, Lama1, Frem3, Crisp1d2, Sftpd, Mmp1a, Chl1, Dmbt1
1	Extracellular region part	Fras1, Cxcl1, Ccl3, A2m, Mug1, Enam, Il19, Apoc1, Postn, Pf4, Col2a1, Il33, Saa2, Crisp1d2, Sftpd, Lbp, Mmp1a, Kng1, Plat, Hapln1, Wnt10b, Mgp, Nid1, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Slit2, Adamts7, Lama1, Frem3, Chl1, Dmbt1, Ay074887
1	Proteinaceous extracellular matrix	Fras1, Hapln1, Wnt10b, Enam, Nid1, Col2a1, Postn, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Adamts7, Lama1, Frem3, Sftpd, Mmp1a, Chl1, Dmbt1
2	Ligand-mediated signaling	Cxcl1, Ccl3, Wnt10b, Gabra2, A2m, Mug1, Il2ra, Adora2b, Gabra6, Il19, Mgp, Pf4, Slit2, Insrr, Calcb, Pgpep1l, Cd80, Pira7, Slc1a6, Gm14548
2	Extracellular region part	Fras1, Cxcl1, Ccl3, A2m, Mug1, Enam, Il19, Apoc1, Postn, Pf4, Col2a1, Il33, Saa2, Crisp1d2, Sftpd, Lbp, Mmp1a, Kng1, Plat, Hapln1, Wnt10b, Mgp, Nid1, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Slit2, Adamts7, Lama1, Frem3, Chl1, Dmbt1, Ay074887
2	Cell communication	Cxcl1, A2m, Ccl3, Mug1, Adora2b, Igfbp6, Il19, Pf4, Scarf1, Insrr, Vcam1, Sphkap, Cdh7, Calcb, Stac2, Slc1a6, Gm14548, Ceacam2, Ceacam14, Gabra2, Wnt10b, Il2ra, Scube1, Gabra6, Nfasc, Mgp, Ptpu, Nrnx1, Pcdh17, Slit2, Adamts7, Lama1, Pgpep1l, Cd80, Frem3, Pira7, Fabp3, Kcnh6, Ophn1, Clec4b1, Kcnh8, Chl1
3	Cell adhesion	Megf9, Lrrc4b, Col2a1, Postn, Scarf1, Vcam1, Cdh7, Ceacam2, Ceacam14, Hapln1, Hyal3, Icam4, Sipa112, Lgals12, Nfasc, Timd4, Nid1, Nrnx1, Ptpu, Emilin2, Cercam, Pcdh17, Emilin3, Lama1, Itgad, Clec4b1, Chl1, Habp2

Tabela 5: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (reprimidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
3	Cell communication	Cxcl1, A2m, Ccl3, Mug1, Adora2b, Igfbp6, Il19, Pf4, Scarf1, Insrr, Vcam1, Sphkap, Cdh7, Calcb, Stac2, Slc1a6, Gm14548, Ceacam2, Ceacam14, Gabra2, Wnt10b, Il2ra, Scube1, Gabra6, Nfasc, Mgp, Ptpru, Nrnx1, Pcdh17, Slit2, Adamts7, Lama1, Pgpep1l, Cd80, Frem3, Pira7, Fabp3, Kcnh6, Ophn1, Clec4b1, Kcnh8, Chl1
3	CAM family adhesion molecule	Vcam1, Icam4, Nfasc, Ceacam2, Chl1, Ceacam14
4	Intrinsic to membrane	Slc36a2, Olfr1259, Olfr157, Slc6a4, Lrrc4b, Olfr551, Kcnu1, Atp2b3, Slc2a6, Bc018242, Clec4e, Ms4a1, Mcoln2, Rab27a, Ms4a7, Atg9a, Duoxa1, Pld5, Fa2h, Gm11735, Timd4, Ptpru, Abcc12, Lpcat4, Bcl2l10, Mgat3, Sstr3, Cd59a, Fer1l4, Gpr52, Olfr92, Vmn2r43, Fras1, Gal3st2, Scn1b, Adora2b, Rtp1, Enpp4, Olfr829, Olfr763, Ric3, Olfr49, Slc11a1, Gpr26, Olfr481, Slc35f3, Slc30a3, Gpr20, Olfr898, Gpr156, Tlr11, Gabra2, Tmem221, Syt11, Gabra6, Tmem225, Acer1, Vmn1r37, Pcdh17, Ggt5, Cd55, Frem3, Kcnj8, Tas2r107, Olfr1024, Ms4a10, Itgad, Olfr470, Slc46a2, Kcnj16, Lrrc8e, Gpr84, Olfr312, Olfr1061, Olfr316, Rtn1, Vmn1r65, Lgr5, Olfr251, Insrr, St6galnac5, Far2, Slc23a1, Olfr198, Olfr20, Slc24a3, Slc1a6, Ugt1a6a, Pigb, Dpep3, Slc25a2, Stra6, Cldnd2, Hhip, Af251705, Ceacam2, Kcnq1, Olfr25, Tmco5, Rxfp1, Icam4, Car12, Olfr1305, Sel1l2, Nrnx1, Fcamr, Mctp1, Tmem67, Slc26a3, Dhrr3, Chrm5, Cd80, Clic5, Skint2, Olfr11, Kpna7, Kcnh6, Olfr10, Kcnh8, Olfr394, Vmn2r60, Skint5, Chl1, Alpl, Hsd3b3, Vmn1r181, Megf9, Olfr131, Olfr538, Galnt6, Hsd3b4, Galnt5, Vcam1, Shisa7, Cdh7, Lingo4, Hrh2, Slc39a8, Slc4a7, Gpr101, Slc39a5, Fut2, Ppap2b, Slc36a2, Olfr1259, Olfr157, Slc6a4, Lrrc4b, Olfr551, Kcnu1, Atp2b3, Slc2a6, Bc018242, Clec4e, Ms4a1, Mcoln2, Ms4a7, Atg9a, Duoxa1, Pld5, Fa2h, Gm11735, Timd4, Ptpru, Abcc12, Lpcat4, Bcl2l10, Mgat3, Sstr3, Fer1l4, Gpr52, Olfr92, Vmn2r43, Fras1, Gal3st2, Scn1b, Adora2b, Rtp1, Enpp4, Olfr829, Olfr763, Ric3, Olfr49, Slc11a1, Gpr26, Olfr481, Slc35f3, Slc30a3, Gpr20, Olfr898, Gpr156, Tlr11, Gabra2, Tmem221, Syt11, Gabra6, Tmem225, Acer1, Vmn1r37, Pcdh17, Ggt5, Frem3, Kcnj8, Tas2r107, Olfr1024, Ms4a10, Itgad, Olfr470, Slc46a2, Kcnj16, Lrrc8e, Gpr84, Olfr312, Olfr1061, Olfr316, Rtn1, Vmn1r65, Lgr5, Olfr251, Insrr, St6galnac5, Far2, Slc23a1, Olfr198, Olfr20, Slc24a3, Slc1a6, Ugt1a6a, Pigb, Slc25a2, Stra6, Cldnd2, Hhip, Af251705, Ceacam2, Kcnq1, Olfr25, Tmco5, Rxfp1, Icam4, Car12, Olfr1305, Kcnj16, Scn1b, Kcnu1, Slc11a1, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc39a5, Mcoln2, Slc30a3, Slco5a1, Kcnq1, Gabra2, Gabra6, Slc10a5, Atp1a2, Gria4, Tcn2, Slc26a3, Frem3, Kcnj8, Clic5, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4
4	Integral to membrane	
4	Ion transport	

Tabela 5: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (reprimidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
4	Receptor	Gpr84, Olfr312, Olfr316, Lrrc4b, Vmn1r65, Lgr5, Insrr, Clec4e, Ms4a1, Vmn2r77, Spred3, Af251705, Vmn2r72, Ms4a7, Hyal3, Rxfp1, Pim1, Timd4, Ptpru, Nrnx1, Nr0b2, Fcamr, Slit2, Chrm5, Sstr3, Cd80, Vmn2r67, Gm12, Pira7, Clec4b1, Gpr52, Vmn2r60, Vmn2r43, Vmn1r181, Adora2b, Olfr538, Olfr763, 7530428d23rik, Scarf1, Islr, Olfr49, Lingo4, Hrh2, Gpr26, Olfr481, Gpr101, Gpr20, Gm14548, Aatk, Gpr156, Vmn2r16, Tlr11, Gabra2, Flrt1, Il2ra, Olr1, Olfr1095, Gabra6, Flt4, Vmn1r37, Tspan13, Gria4, Vmn2r121, Vmn2r82, Olfr1024, Ms4a10, Olfr470, Nr5a2, Htr2c, Dmbt1, Htr2a
4	Transport	Kcnj16, Frk, Scn1b, Slc6a4, Apoc1, Psap11, Sec14l4, Kcnu1, Slc11a1, Slc23a1, Slc2a6, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc25a2, Slc39a5, Slc30a3, Lbp, Mcoln2, Slco5a1, Kcnq1, Slc25a40, Shbg, Gabra2, Acta1, Gabra6, 2010107g12rik, Atp1a2, Slc10a5, Abcc12, Gria4, Tcn2, Slc26a3, Frem3, Slc6a7, Kcnj8, Clic5, Fabp3, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4, Slc15a3, Dmbt1, Slc46a2
4	Ion transport	Kcnj16, Slc36a2, Scn1b, Kcnu1, Slc11a1, Slc23a1, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc39a5, Mcoln2, Slc30a3, Kcnq1, Gabra2, Gabra6, Slc10a5, Atp1a2, Gria4, Tcn2, Cnrm1, Slc26a3, Kcnj8, Clic5, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4
4	Signal transduction	A2m, Mug1, Il19, Lrrc4b, Rrad, Gpcpd1, Ms4a1, Rgn, Eras, Cib3, Rab27a, Pik3cg, Wnt10b, Scube1, Timd4, Mgp, Ptpru, Bcl2l10, Sag, Adamts7, Grb10, Sstr3, Pira7, Ophn1, Pla2g2d, Vmn2r43, Ccl3, Adora2b, Olfr763, Ric3, Pde6a, Olfr49, Rasal1, Gpr26, Olfr481, Gpr20, Gpr156, Tlr11, Gabra2, Gabra6, Vmn1r37, Pcdh17, Lama1, Frem3, Fabp3, Olfr1024, Olfr470, Srms, Gpr84, Olfr312, Igfbp6, Olfr316, Pip5k1b, Vmn1r65, Insrr, Stac2, Slc1a6, Vmn2r77, Sema3b, Shc2, Vmn2r72, Ceacam2, Ceacam14, Rxfp1, Rab3il1, Nrnx1, Slit2, Chrm5, Pgpep1l, Cd80, Ppef2, Vmn2r67, Gm12, Kcnh6, Gnb4, Clec4b1, Kcnh8, Vmn2r60, Chl1, Cxcl1, Frk, Vmn1r181, Olfr538, Pf4, 7530428d23rik, Scarf1, Islr, Vcam1, Sphkap, Calcb, Cdh7, Lingo4, Hrh2, Gm14548, Ppap2b, Aatk, Vmn2r16, Flrt1, Il2ra, Pla2g10, Dtx1, Flt4, Olfr1095, Nfasc, Vmn2r121, Pdc, Vmn2r82, Chn2, Nr5a2, Htr2c, Htr2a
5	Extracellular matrix	Fras1, Hapln1, Wnt10b, Enam, Nid1, Col2a1, Postn, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Adamts7, Lama1, Frem3, Crispld2, Sftpd, Mmp1a, Chl1, Dmbt1
5	Lung development	Lama1, Slc23a1, Rxfp1, Hoxa5, Crispld2, Sftpd, Mgp, Hhip
5	Respiratory tube development	Lama1, Slc23a1, Rxfp1, Hoxa5, Crispld2, Sftpd, Mgp, Hhip
5	Respiratory system development	Lama1, Slc23a1, Rxfp1, Hoxa5, Crispld2, Sftpd, Mgp, Hhip
6	Inflammatory response	Kng1, Cxcl1, Tlr11, Ccl3, Olr1, Mecom, C1qc, Slc11a1, Ggt5, Cd55, Nod2, Saa2, Cfh, C2, Lbp, Ai182371

Tabela 5: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (reprimidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
6	Extracellular region part	Fras1, Cxcl1, Ccl3, A2m, Mug1, Enam, Il19, Apoc1, Postn, Pf4, Col2a1, Il33, Saa2, Crispd2, Sftpd, Lbp, Mmp1a, Kng1, Plat, Hapln1, Wnt10b, Mgp, Nid1, Emilin2, Emilin3, Mmp12, Slit2, Adamts7, Lama1, Frem3, Chl1, Dmbt1, Ay074887
6	Immune effector process	Slc11a1, Cd55, Nod2, Kcnj8, Cfh, C2, Lbp, C1qc, Rab27a, Ai182371
6	Response to wounding	Kng1, Cxcl1, Tlr11, Ccl3, Olr1, Pf4, Mecom, C1qc, Slc11a1, Ggt5, Cd55, Nod2, Saa2, Cfh, C2, Lbp, Ai182371, Rab27a
6	Innate immune response	Slc11a1, Tlr11, Cd55, Nod2, Cfh, C2, Lbp, C1qc, Rab27a
6	Defense response	Kng1, Cxcl1, Tlr11, Ccl3, Lyz1, Olr1, Mecom, C1qc, Slc11a1, Ggt5, Cd55, Nod2, Saa2, Kcnj8, Cfh, Nlrp4a, Defb34, C2, Lbp, Ai182371, Rab27a
6	Activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	Cd55, Cfh, C2, C1qc, Ai182371
6	Complement activation	Cd55, Cfh, C2, C1qc, Ai182371
6	Acute inflammatory response	Cd55, Saa2, Cfh, C2, Lbp, C1qc, Ai182371
6	Immune response	Cxcl1, Tlr11, H2-M9, Ccl3, Olr1, Pf4, Skap1, C1qc, Fcamr, Slc11a1, Cd55, Nod2, Clec4e, Kcnj8, Cfh, C2, Af251705, Lbp, Ai182371, Rab27a
6	Carbohydrate binding	Hapln1, Olr1, Galnt6, Galnt5, Lgals12, Pf4, Postn, Gpcpd1, Nod2, Clec4e, Crispd2, Clec3a, Sftpd, Cfh, Clec4b1
6	Complement component	Cd55, Cfh, C2, C1qc, Ai182371
6	Positive regulation of immune system process	Slc11a1, Cd55, Nod2, Il2ra, Adora2b, Cd80, Cfh, C2, Lbp, C1qc, Ai182371
6	Complement-mediated immunity	Cd55, Cfh, C2, C1qc, Ai182371
7	Ion transport	Kcnj16, Scn1b, Kcnu1, Slc11a1, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc39a5, Mcoln2, Slc30a3, Slco5a1, Kcnq1, Gabra2, Gabra6, Slc10a5, Atp1a2, Gria4, Tcn2, Slc26a3, Frem3, Kcnj8, Clic5, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4
7	Transport	Kcnj16, Frk, Scn1b, Slc6a4, Apoc1, Psap11, Sec14l4, Kcnu1, Slc11a1, Slc23a1, Slc2a6, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc25a2, Slc39a5, Slc30a3, Lbp, Mcoln2, Slco5a1, Kcnq1, Slc25a40, Shbg, Gabra2, Acta1, Gabra6, 2010107g12rik, Atp1a2, Slc10a5, Abcc12, Gria4, Tcn2, Slc26a3, Frem3, Slc6a7, Kcnj8, Clic5, Fabp3, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4, Slc15a3, Dmbt1, Slc46a2

Tabela 5: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (reprimidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
7	Symporter activity	Slc23a1, Slc2a6, Slc36a2, Slc6a7, Slc24a3, Slc1a6, Slc6a4, Slc4a7, Slc10a5, Slc15a3
7	Ion transport	Kcnj16, Slc36a2, Scn1b, Kcnu1, Slc11a1, Slc23a1, Atp2b3, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc4a7, Slc39a5, Mcoln2, Slc30a3, Kcnq1, Gabra2, Gabra6, Slc10a5, Atp1a2, Gria4, Tcn2, Cnnm1, Slc26a3, Kcnj8, Clic5, Kcnh6, Kcnh8, Atp6v0a4
7	Transporter	Slc6a4, Apoc1, Sec14l4, Slc11a1, Slc23a1, Slc2a6, Atp2b3, Saa2, Slc24a3, Slc1a6, Slc39a8, Slc25a2, Slc4a7, Slc30a3, Slc39a5, Slco5a1, 2010107g12rik, Abcc12, Slc10a5, Atp1a2, Tcn2, Slc26a3, Frem3, Slc6a7, Atp6v0a4, Slc15a3

Tabela 6: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (induzidos) entre células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Induzidos			
Grupo 1 Score de Enriquecimento: 3,57			
Categoria	Termos Enriquecidos	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (GOTERM)	GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction	61	<0,0001
BP (GOTERM)	GO:0007600~sensory perception	40	<0,0001
BP (GOTERM)	GO:0007608~sensory perception of smell	34	<0,0001
BP (GOTERM)	GO:0050890~cognition	41	<0,0001
MF (GOTERM)	GO:0004984~olfactory receptor activity	33	0,0001
BP (GOTERM)	GO:0050877~neurological system process	44	0,0001
BP (GOTERM)	GO:0007186~G-protein coupled receptor protein signaling pathway	47	0,0002
BP (PANTHER)	GO:0007606~sensory perception of chemical stimulus	34	0,0002
BP (PANTHER)	BP00102:Signal transduction	76	0,0003
BP (PANTHER)	BP00103:Cell surface receptor mediated signal transduction	46	0,0039
BP (PANTHER)	BP00104:G-protein mediated signaling	31	0,0169

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 6: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (induzidos) entre células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Induzidos			
Grupo 2			
Score de Enriquecimento: 2,17			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (PANTHER)	BP00274:Cell communication	34	<0,0001
BP (PANTHER)	BP00102:Signal transduction	76	0,0003
BP (PANTHER)	BP00193:Developmental processes	46	0,0011
BP (PANTHER)	BP00103:Cell surface receptor mediated signal transduction	46	0,0039
MF (PANTHER)	MF00016:Signaling molecule	19	0.0135
MF (GOTERM)	GO:0004175~endopeptidase activity	13	0.0166
Grupo 3			
Score de Enriquecimento: 1,92			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (PANTHER)	BP00035:DNA replication	8	0,0007
BP (GOTERM)	GO:0006270~DNA replication initiation	3	0.0088
BP (GOTERM)	GO:0006260~DNA replication	7	0.0244
BP (PANTHER)	BP00203:Cell cycle	20	0.0299
MF (PANTHER)	MF00043:DNA-directed DNA polymerase	3	0.0415
BP (PANTHE)	BP00035:DNA replication	8	0,0007

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 6: Análise por DAVID para determinar os termos mais enriquecidos em cada categoria de GO pelos genes diferencialmente expressos (induzidos) entre células mTEC 3.10 controle e que tiveram o gene Aire silenciado por RNAi.

Genes Induzidos			
Grupo 4 Score de Enriquecimento: 1,74			
Categoria	Termo	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
BP (GOTERM)	GO:0002052~positive regulation of neuroblast proliferation	3	0.0088
BP (GOTERM)	GO:0050769~positive regulation of neurogenesis	4	0.0219
BP (GOTERM)	GO:0010720~positive regulation of cell development	4	0.0313

Nota: CC = Componente Celular; BP = Biological Process; MF = Molecular Function. Entre parênteses estão os bancos de dados/fontes que orientaram a busca.

Tabela 7: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (induzidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
1	Cell surface receptor linked signal transduction	Olfr1352, Olfr786, Pax6, Gnrhr, Olfr782, Vmn1r168, Olfr554, Sh2d1b1, Galr2, Olfr652, Olfr24, Ms4a2, Olfr699, Apln, Olfr266, Olfr1107, Adamts20, Fgf21, Zfp128, Olfr1287, Olfr1431, Vegfc, Olfr666, Adrb1, Olfr661, Olfr935, Olfr94, Mst1r, Olfr495, Olfr90, Olfr52, Vmn2r91, Drd2, Olfr1402, Ffar2, Olfr172, Olfr135, Vmn1r87, Gng11, Olfr432, Olfr577, Foxh1, Olfr1449, Olfr384, Nms, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Vav3, Smad9, Adam24, Vmn1r174, Olfr1260, Olfr815, Dkk4, Nps, Olfr1198, Avpr1b, Olfr1417, Mesp1, Olfr1124
1	Sensory perception	Rp1, Drd2, Olfr1402, Olfr1352, Olfr172, Olfr786, Olfr135, Olfr432, Olfr782, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Olfr384, Slc24a1, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Cacna2d4, Gjb2, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Otoa, Olfr1124, Olfr52, Ngf
1	Sensory perception of smell	Drd2, Olfr1402, Olfr1352, Olfr172, Olfr135, Olfr786, Olfr432, Olfr782, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Olfr384, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Olfr1124, Olfr52
1	Cognition	Rp1, Olfr1402, Drd2, Olfr1352, Olfr172, Olfr786, Olfr135, Olfr432, Olfr782, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Olfr384, Slc24a1, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Egr2, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Cacna2d4, Gjb2, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Otoa, Olfr1124, Olfr52, Ngf
1	Olfactory receptor activity	Olfr1402, Olfr1352, Olfr135, Olfr786, Olfr172, Olfr432, Olfr782, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Olfr384, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Olfr1124, Olfr52

Tabela 7: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (induzidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
1	Neurological system process	Sv2b, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Egr2, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Cacna2d4, Gjb2, Hoxc10, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Otoa, Olfr1124, Olfr52, Ngf
1	Protein coupled receptor protein signaling pathway	Vmn2r91, Olfr1402, Drd2, Ffar2, Olfr1352, Olfr172, Olfr786, Olfr135, Vmn1r87, Olfr432, Gng11, Gnrhr, Olfr782, Vmn1r168, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Galr2, Olfr384, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Nms, Apln, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Vmn1r174, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Nps, Olfr666, Adrb1, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Avpr1b, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Olfr1124, Olfr52
1	Sensory perception of chemical stimulus	Drd2, Olfr1402, Olfr1352, Olfr172, Olfr135, Olfr786, Olfr432, Olfr782, Olfr577, Olfr1449, Olfr554, Olfr384, Olfr652, Olfr24, Olfr699, Olfr1180, Olfr205, Olfr284, Olfr266, Olfr1107, Olfr1260, Olfr1287, Olfr815, Olfr1431, Olfr666, Olfr1198, Olfr935, Olfr661, Olfr94, Olfr1417, Olfr90, Olfr495, Olfr1124, Olfr52
1	Signal transduction	Nxph3, Cttnal1, Rp1, Psg16, Klrc3, Vtn, Gnrhr, Vmn1r168, Sh2d1b1, Htra1, Galr2, Ms4a2, Olfr699, Cntnap1, Foxb2, Apln, Gnl3, Olfr266, Psg28, Olfr1107, Camk1g, Adamts20, Pcdh9, Psg20, Fgf21, Il24, Psg21, Ncr1, Olfr1431, Vegfc, Adrb1, F5, Prl3d2, Capn13, Olfr661, Mst1r, Olfr495, Ngf, Nmi, Olfr1402, Drd2, 4930525m21rik, Vmn2r91, Ffar2, Adamts15, Vmn1r87, Gng11, Olfr432, Foxh1, Prl2c5, Ece2, Olfr1449, Il17a, Rasgrp4, Vmn2r115, Ifna4, Vmn2r98, Prl2c1, Hhatl, Olfr284, Vav3, Smad9, Vmn1r174, Lrrn4, Adam24, Pcdh10, Gjb2, Cacna2d4, Dusp2, Foxi3, Avpr1b, Ifna12, Olfr1417, Areg, Cd200, Olfr1124
1	Cell surface receptor mediated signal transduction	Vmn2r91, Drd2, Olfr1402, Ffar2, Vmn1r87, Olfr432, Gng11, Gnrhr, Vmn1r168, Foxh1, Il17a, Prl2c5, Ece2, Olfr1449, Rasgrp4, Galr2, Vmn2r115, Ifna4, Ms4a2, Olfr699, Foxb2, Vmn2r98, Apln, Prl2c1, Hhatl, Olfr284, Olfr266, Smad9, Olfr1107, Vav3, Lrrn4, Vmn1r174, Fgf21, Il24, Olfr1431, Adrb1, Foxi3, Prl3d2, Olfr661, Avpr1b, Ifna12, Olfr1417, Mst1r, Olfr495, Olfr1124, Ngf

Tabela 7: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (induzidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
1	G-protein mediated signaling	Vmn2r98, Prl2c1, Olfr284, Olfr266, Vav3, Olfr1107, Vmn1r174, Olfr1431, Adrb1, Prl3d2, Avpr1b, Olfr661, Olfr1417, Olfr495, Olfr1124
2	BP00274:Cell communication	Nxph3, Rp1, Psg16, Klrc3, Adamts15, Vtn, Foxh1, Il17a, Ece2, Htra1, Ifna4, Cntnap1, Foxb2, Apln, Hhatl, Psg28, Smad9, Adam24, Adamts20, Pcdh10, Pcdh9, Psg20, Fgf21, Il24, Psg21, Ncr1, Vegfc, Foxi3, Adrb1, Avpr1b, Ifna12, Areg, Cd200, Ngf
2	BP00102:Signal transduction	Nxph3, Ctnnal1, Rp1, Psg16, Klrc3, Vtn, Gnrhr, Vmn1r168, Sh2d1b1, Htra1, Galr2, Ms4a2, Olfr699, Cntnap1, Foxb2, Apln, Gnl3, Olfr266, Psg28, Olfr1107, Camk1g, Adamts20, Pcdh9, Psg20, Fgf21, Il24, Psg21, Ncr1, Olfr1431, Vegfc, Adrb1, F5, Prl3d2, Capn13, Olfr661, Mst1r, Olfr495, Ngf, Nmi, Olfr1402, Drd2, 4930525m21rik, Vmn2r91, Ffar2, Adamts15, Vmn1r87, Gng11, Olfr432, Foxh1, Prl2c5, Ece2, Olfr1449, Il17a, Rasgrp4, Vmn2r115, Ifna4, Vmn2r98, Prl2c1, Hhatl, Olfr284, Vav3, Smad9, Vmn1r174, Lrrn4, Adam24, Pcdh10, Gjb2, Cacna2d4, Dusp2, Foxi3, Avpr1b, Ifna12, Olfr1417, Areg, Cd200, Olfr1124
2	BP00193:Developmental processes	Mef2b, Psg16, Fignl1, Pax6, Dscaml1, Gnrhr, Trim15, Foxh1, Prl2c5, Hand1, Htra1, Galr2, Piwil2, Foxb2, Lmod1, Ifrd2, Tlx2, Etv5, Negr1, Apln, Etv4, Prl2c1, Hhatl, Muc2, Psg28, Smad9, Egr2, Lrrn4, Fscn3, Pcdh9, Psg20, Vax2, Psg21, Dkk4, Hoxc10, Afp, Vegfc, Foxi3, Dusp2, Prl3d2, Krt79, Avpr1b, Sp5, Mst1r, Mab21l1, Ngf
2	BP00103:Cell surface receptor mediated signal transduction	Vmn2r91, Drd2, Olfr1402, Ffar2, Vmn1r87, Olfr432, Gng11, Gnrhr, Vmn1r168, Foxh1, Il17a, Prl2c5, Ece2, Olfr1449, Rasgrp4, Galr2, Vmn2r115, Ifna4, Ms4a2, Olfr699, Foxb2, Vmn2r98, Apln, Prl2c1, Hhatl, Olfr284, Olfr266, Smad9, Olfr1107, Vav3, Lrrn4, Vmn1r174, Fgf21, Il24, Olfr1431, Adrb1, Foxi3, Prl3d2, Olfr661, Avpr1b, Ifna12, Olfr1417, Mst1r, Olfr495, Olfr1124, Ngf
2	GO:0005576~extracellular region	Nxph3, Cthrc1, Prss40, Adamts15, Vtn, Il17a, Prl2c5, Rnase10, Isg15, Htra1, Ccbe1, Ifna4, Nms, Glpir1l2, Prl2c1, Spp1, Muc2, Adam24, Adamts20, Dhrr11, F9, Fgf21, Il24, Mcpt8, Mmp13, Dkk4, Pcolce2, 4931414p19rik, Afp, Vegfc, Nps, F5, Prl3d2, Ifna12, Areg, Otoa, Gm9706, Ngf

Tabela 7: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (induzidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
2	MF00016:Signaling molecule	Nxph3, Fgf21, Il24, Necab2, Dkk4, Vegfc, Il17a, Prl2c5, Prl3d2, Rasgrp4, Ifna4, Ifna12, Cntnap1, Areg, Apln, Prl2c1, Ngf, Gnl3, Spp1
2	GO:0004175~endopeptidase activity	Adam24, Astl, Adamts20, Prss40, Adamts15, F9, Mcpt8, Mmp13, Mcpt9, Ece2, Peg10, Htra1, Capn13
2	GO:0044421~extracellular region part	Muc2, Cthrc1, Adam24, Adamts20, Adamts15, Vtn, Il24, Mmp13, Afp, Vegfc, Il17a, Prl2c5, F5, Prl3d2, Ifna4, Ifna12, Areg, Otoa, Spp1
2	BP00148:Immunity and defense	Cthrc1, Nmi, Klrc3, Gm14446, Ppil1, Oas3, I830012o16rik, Il17a, Rasgrp4, Ifna4, Aif1l, Ms4a2, Apln, Ciita, Gsta2, Vav3, Lrrc2, F9, Il24, Mcpt8, Ncr1, Mcpt9, Ifit3, Ifit1, Adrb1, H2-Eb2, F5, Ifna12, Defb46, Mst1r, Cd200, Gbp3
2	MF00153:Protease	Astl, Adam24, Adamts20, Prss40, Adamts15, F9, Mcpt8, Mcpt9, Mmp13, Usp18, Ece2, F5, Htra1, Capn13, Usp13
2	MF00040:Cell adhesion molecule	Ctnnal1, Psg28, Psg16, Pcdh10, Dscaml1, Pcdh9, Vtn, Psg20, Psg21, Negr1, Spp1
2	GO:0070011~peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	Astl, Adam24, Adamts20, Prss40, Adamts15, F9, Mcpt8, Mcpt9, Mmp13, Peg10, Usp18, Ece2, Htra1, Capn13, Usp13
3	BP00035:DNA replication	Gins1, Exo1, Pole2, Pola1, Mcm3, Mybbp1a, Mcm5, Dscc1
3	GO:0006270~DNA replication initiation	Pola1, Mcm3, Mcm5
3	GO:0006261~DNA-dependent DNA replication	Pole2, Pola1, Mcm3, Mcm5
3	GO:0006260~DNA replication	Gins1, Pole2, Pola1, Mcm3, Chaf1b, Mcm5, Dscc1
3	BP00203:Cell cycle	Exo1, Gins1, 4930525m21rik, Pola1, Mcm3, Hmga2, Mcm5, Foxh1, Vegfc, Actg2, Actrt2, Foxi3, Dusp2, Pole2, Dkc1, Aif1l, Foxb2, Mst1r, Mybbp1a, Dscc1

Tabela 7: Genes que compõem cada termo enriquecido das diferentes categorias de GO (induzidos).

Grupo	Termo Enriquecido	Genes Envolvidos
3	MF00043:DNA-directed DNA polymerase	Pole2, Pola1, Mybbp1a
4	GO:0002052~positive regulation of neuroblast proliferation	Vegfc, Drd2, Pax6
4	GO:0050769~positive regulation of neurogenesis	Vegfc, Drd2, Pax6, Ngf
4	GO:0010720~positive regulation of cell development	Vegfc, Drd2, Pax6, Ngf

Ainda, em relação aos genes que foram reprimidos pelo silenciamento de Aire, verificamos a ocorrência da expressão desses genes em outros tecidos, que não o timo (tabela 8). Apesar de tecidos como cérebro, testículos e fígado terem apresentado o maior número de genes envolvidos (Apêndice B), o resultado da análise de enriquecimento funcional revelou que os termos (tecidos) estatisticamente mais enriquecidos ($p < 0,05$) foram: "*PCR rescue clones*", "*Unfertilized egg*", "*Diencephalon*"; "*Vomer nasal organ*", "*Ovary*" e "*Uterus*" (Tabela 9). Isso se deve ao fato de que as análises por DAVID levam em consideração não somente a quantidade de genes envolvidos mas também outros fatores como o valor de expressão individual.

Tabela 8 - Resultado da análise da expressão tecidual dos genes modulados (reprimidos) pelo silenciamento do gene Aire com RNAi na linhagem celular mTEC 3.10.

Categoria	Termo Enriquecido (tecido)	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
UP_TISSUE	PCR rescued clones	55	0,0003
UP_TISSUE	Unfertilized egg	4	0,0263
UP_TISSUE	Diencephalon	15	0,0392
UP_TISSUE	Vomer nasal organ	3	0,0405
UP_TISSUE	Ovary and uterus	6	0,0416
UP_TISSUE	Plasma	6	0,0601
UP_TISSUE	Pituitary gland	7	0,0644
UP_TISSUE	Bone	11	0,1313
UP_TISSUE	Cerebellum	44	0,1548
UP_TISSUE	Ovary	12	0,1834
UP_TISSUE	Cochlea	3	0,1856
UP_TISSUE	Embryonic body between diaphragm region and neck	7	0,2355
UP_TISSUE	In vitro fertilized eggs	8	0,2813
UP_TISSUE	Oviduct	6	0,3172
UP_TISSUE	Cecum	8	0,3932
UP_TISSUE	Eye	37	0,4346
UP_TISSUE	Olfactory brain	7	0,4664
UP_TISSUE	Retina	16	0,4808
UP_TISSUE	Brain	170	0,5301
UP_TISSUE	Mullerian duct includes surrounding region	3	0,5421
UP_TISSUE	Pituitary	6	0,6068

Nota: UP_TISSUE = UniProt, categoria *Tissue*. Bancos de dados/fonte original consultada pelo DAVID.

Tabela 8 (continuação) - Resultado da análise da expressão tecidual dos genes modulados (reprimidos) pelo silenciamento do gene Aire com RNAi na linhagem celular mTEC 3.10.

Categoria	Termo Enriquecido (tecido)	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
UP_TISSUE	Dendritic cell	5	0,6107
UP_TISSUE	Corpora quadrigemina	13	0,6412
UP_TISSUE	Egg	10	0,6509
UP_TISSUE	Embryonic stem cell	6	0,6626
UP_TISSUE	Adipose tissue	3	0,6661
UP_TISSUE	B-cell	3	0,6874
UP_TISSUE	Vein	3	0,7124
UP_TISSUE	Head	36	0,7409
UP_TISSUE	Spleen	22	0,7417
UP_TISSUE	Brain cortex	13	0,7572
UP_TISSUE	Mast cell	4	0,7773
UP_TISSUE	Pancreas	13	0,79872
UP_TISSUE	Hypothalamus	9	0,8062
UP_TISSUE	Embryonic head	3	0,8067
UP_TISSUE	Testicle	4	0,8110
UP_TISSUE	Eyeball	6	0,8272
UP_TISSUE	Colon	21	0,8361
UP_TISSUE	Mammary tumor metastatized to lung, MMTV-LTR/Wnt1 model, Expression driven by an MMTV-LTR enhancer,	3	0,8524
UP_TISSUE	Spinal cord	10	0,8584
UP_TISSUE	Aorta	3	0,8602
UP_TISSUE	Medulla oblongata	10	0,8641
UP_TISSUE	Activated spleen	12	0,8873

Nota: UP_TISSUE = UniProt, categoria *Tissue*. Bancos de dados/fonte original consultada pelo DAVID.

Tabela 8 (continuação) - Resultado da análise da expressão tecidual dos genes modulados (reprimidos) pelo silenciamento do gene Aire com RNAi na linhagem celular mTEC 3.10.

Categoria	Termo Enriquecido (tecido)	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
UP_TISSUE	Salivary gland	10	0,8935
UP_TISSUE	Olfactory epithelium	7	0,8939
UP_TISSUE	Skeletal muscle	3	0,8999
UP_TISSUE	Epididymis	3	0,8999
UP_TISSUE	Placenta	13	0,9040
UP_TISSUE	Visual cortex	4	0,9072
UP_TISSUE	Stomach	7	0,9158
UP_TISSUE	Tongue	11	0,9214
UP_TISSUE	Testis	73	0,9256
UP_TISSUE	Skin	13	0,9284
UP_TISSUE	Cortex	3	0,9328
UP_TISSUE	Aorta and vein	3	0,9378
UP_TISSUE	Mammary tumor, WAP-TGF alpha model, 7 months old	6	0,9702
UP_TISSUE	Small intestine	5	0,9702
UP_TISSUE	Heart	15	0,9704
UP_TISSUE	Amnion	4	0,9723
UP_TISSUE	Urinary bladder	4	0,97328
UP_TISSUE	Kidney	39	0,9773
UP_TISSUE	Limb	3	0,9798
UP_TISSUE	Lung	22	0,9808
UP_TISSUE	Spinal ganglion	5	0,9826
UP_TISSUE	Fetal brain	4	0,9839

Nota: UP_TISSUE = UniProt, categoria *Tissue*. Bancos de dados/fonte original consultada pelo DAVID.

Tabela 8 (continuação) - Resultado da análise da expressão tecidual dos genes modulados (reprimidos) pelo silenciamento do gene Aire com RNAi na linhagem celular mTEC 3.10.

Categoria	Termo Enriquecido (tecido)	Quantidade de genes envolvidos	Valor de P
UP_TISSUE	Macrophage	5	0,9997
UP_TISSUE	Mammary tumor metastatized to lung, Tumor arose spontaneously	5	0,9853
UP_TISSUE	Inner ear	3	0,9876
UP_TISSUE	Mammary tumor, C3	6	0,9911
UP_TISSUE	Embryonic tail	4	0,9960
UP_TISSUE	Hippocampus	14	0,9968
UP_TISSUE	Thymus	40	0,9979
UP_TISSUE	Liver	57	0,9992
UP_TISSUE	Embryo	29	0,9996
UP_TISSUE	Bone marrow	17	0,9997
UP_TISSUE	Mammary gland	28	0,9999
UP_TISSUE	Whole body	11	0,9999
UP_TISSUE	Mammary tumor	26	0,9999

Nota: UP_TISSUE = UniProt, categoria *Tissue*. Bancos de dados/fonte original consultada pelo DAVID.

Tabela 9 - Genes reprimidos em mTEC 3.10 após o silenciamento do gene Aire que estão associados a expressão em outros tecidos que não o timo e tiveram mais significância estatística no enriquecimento funcional ($p < 0,05$).

Termo enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
PCR rescued clones	0,0003	Cyp24a1, Olfr312, Enam, Il19, Slc6a4, Arsj, Dsty, 4932414j04rik, 1700080o16rik, Olfr251, Atp2b3, Galntl6, Slc25a2, Clnd2, Af251705, Slco5a1, Wnt10b, Olfr1305, Mecom, Pira7, Olfr11, Kcnh6, Vgl2, Kcnh8, Trem3, Cryba1, Pla2g2d, Olfr92, Chl1, Ccl3, 5430427o19rik, Adora2b, Galnt5, Psap11, Nphp3, Slc11a1, Calcb, Plekhg1, Hrh2, Tekt5, Clasp2, Tgm5, Gm14548, Olfr898, Tlr11, Gabra2, Flrt1, H2-M9, Il2ra, Nid1, Neurog3, Ggt5, Olfr1024, Tcstv1, Htr2a, Ai182371
Unfertilized egg	0,0263	Zfp92, Gm10436, Aurkc, Gm2042, Slc30a3
Diencephalon	0,0392	Ncald, Pld5, Fa2h, Arsj, Sphkap, St6galnac5, Cdh7, Sstr3, Plekhg1, Ganc, Crispd2, Gm10033, Htr2c, Zfp536, Slc25a40
Vomer nasal organ	0,0405	Vmn2r43, H2-M9, Vmn2r82
Ovary and uterus	0,0416	5430416o09rik, Frk, Adora2b, Scin, Slc30a3, Scarf1

Discussão

7. DISCUSSÃO

As células tímicas epiteliais (TECs) são essenciais para o desenvolvimento dos timócitos e para a indução da tolerância central no timo. Essas células são classificadas como medulares (mTECs) e corticais (cTECs) de acordo com a sua localização na estrutura do timo e sua função. Enquanto as cTECs suportam a proliferação, diferenciação e seleção positiva das células T restritas ao auto-MHC, as mTECs desempenham um papel crítico na prevenção do aparecimento de doenças autoimunes em humanos e camundongos por meio da apresentação de autoantígenos (TRAs) aos timócitos em desenvolvimento. Tal apresentação é garantida pela expressão de milhares de genes que codificam TRAs, fenômeno denominado de expressão gênica promíscua (PGE) (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004). Quando os timócitos reconhecem os TRAs expressos pelas mTECs com alta avides, eles sofrem apoptose (seleção negativa) ou são convertidos em células T reguladoras (Tregs). Além disso, a expansão e a organização da medula do timo é também governada pelos timócitos em desenvolvimento, e a interação recíproca entre esses dois tipos celulares (as mTECs com os timócitos) é referida como "crosstalk tímico" (LOPES et al., 2015).

Por sua vez, as mTECs constituem uma população celular heterogênea que representa menos de 1% do total de células tímicas (GRAY et al., 2002; 2006). As mTECs podem ser identificadas por citometria de fluxo e mostram um fenótipo CD45⁻ Ep-CAM⁺ Ly51^{-/lo} UEA-1⁺ (GRAY et al., 2002; revisado por SUN, et al., 2014). Além disso, os diferentes subconjuntos de mTECs podem ser definidos por meio de outros marcadores como a expressão de MHCII e CD80, além do fator de transcrição AIRE (LOPES et al., 2015). Avanços recentes estabeleceram a relação entre os diferentes subconjuntos de mTECs, demonstrando que a diferenciação dessas células prossegue ao longo dos distintos estágios de maturação. Experimentos com RTOC (do inglês, *Reaggregated Thymus Organ Culture*) demonstraram que MHCII^{-/lo}CD80^{-/lo}AIRE⁻ (mTEC^{lo}) dão origem às mTECs maduras MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE⁺ (mTEC^{high}). De acordo com isto, observou-se que durante a embriogênese, as células mTEC^{lo} aparecem antes das mTEC^{high} (GABLER et al., 2007; ROSSI et al., 2007). As mTECs imaturas expressam um conjunto limitado de

TRAs, enquanto que as maduras apresentam uma maior diversidade desses autoantígenos (revisado por PASSOS et al., 2015).

Como já mencionado, as mTECs desempenham uma importante função na indução da tolerância central das células T em desenvolvimento por meio de sua habilidade de expressar uma ampla gama de TRAs (DERBINSKI et al., 2001). Um estudo recente demonstrou por meio de *deep-sequencing* do transcriptoma que mTECs maduras expressam 19.923 genes, o que representa quase 85% do genoma murino (SANSOM et al., 2014). Deste modo, as mTECs constituem o único tipo celular descrito a expressar um número tão amplo de genes. O fator de transcrição Aire é um regulador transcricional que dirige a expressão de muitos TRAs (ANDERSON et al., 2002). A proteína AIRE regula sozinha a expressão de 3.980 genes, os quais são considerados genes Aire-dependentes (revisado por AKIYAMA et al., 2015). Recentemente, atribuiu-se ao gene *Fzf2* a função de regulador transcricional de genes Aire-independentes (TAKABA et al., 2015; KLEIN, 2015).

O gene Aire foi primeiramente identificado por clonagem posicional do *locus* gênico ligado a uma doença rara chamada APECED (do inglês, *Autoimmune-Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal-Dystrophy*). Essa síndrome geralmente começa na infância com o aparecimento de candidíase mucocutânea crônica, a qual pode correlacionar-se a presença de autoanticorpos contra IL-17 e IL-22. Os estados mais tardios dessa doença são caracterizados pela presença de autoanticorpos contra múltiplos antígenos próprios e infiltração linfocitária de várias glândulas endócrinas, o que leva ao aparecimento de manifestações endócrinas autoimunes (revisado por LAAN & PETERSON, 2013).

Modelos de animais knockout (KO) têm sido amplamente utilizados para demonstrar o papel central de Aire na indução da tolerância ao próprio (ANDERSON et al., 2002; DERBINSKI et al., 2005; JIANG et al., 2005). Apesar de apresentarem uma doença mais branda, os animais Aire KO sempre desenvolvem infiltrados linfocitários e autoanticorpos (ANDERSON et al., 2002; KURODA et al., 2005). O papel de Aire como o principal regulador da expressão de TRAs foi primeiramente proposto por Anderson e colaboradores (2002), os quais relataram uma acentuada redução na expressão de TRAs no timo de camundongos Aire KO. Entre os antígenos que tiveram sua expressão reduzida estavam a insulina, a proteína salivar tipo 1, a proteína de ligação de ácidos graxos entre outros. Além disso, foi também verificada uma redução na seleção negativa das células T específicas nesses

animais. Essas observações forneceram a prova direta do papel de AIRE na indução da tolerância induzida por antígenos e, análises mais aprofundadas desses resultados, revelaram o papel das mTECs no processo (ANDERSON et al., 2002).

Outra prova da ação de Aire no controle da prevenção de doenças autoimunes foi verificada pela reintrodução do estroma tímico de camundongos Aire-deficientes e Aire-suficientes em camundongos atímicos. Timos Aire-deficientes não foram capazes de prevenir o desenvolvimento de autoimunidade nos camundongos receptores, conforme verificado pelo aumento de autoanticorpos nas glândulas salivares, fígado, estômago e retina (GARDNER et al., 2008).

Por um outro lado, Kont e colaboradores (2008) demonstraram que não somente a total anulação, mas também a diminuição na expressão de Aire regula negativamente a expressão de TRAs de uma maneira dose-dependente. Foi observado que a expressão de TRAs no timo de camundongos heterozigotos do gene Aire (Aire^{MUT}/Aire^{WT}) correspondia a apenas 10-20% dos níveis de expressão observados nos camundongos do tipo Aire^{WT}/Aire^{WT} e não 50%, como era de se esperar quando um dos alelos genômicos de Aire permanece selvagem (KONT et al., 2008). Essa expressão de níveis abaixo do normal, como observado em animais heterozigotos, sugere a haploinsuficiência de Aire na regulação dos genes de TRAs alvo. Na haploinsuficiência dos reguladores da transcrição, ou seja, apenas uma cópia gênica no estado selvagem, não é o suficiente para a atividade funcional do produto gênico regulado (COOK et al., 1998; KAERN, et al., 2005). Suporte adicional para a teoria da haploinsuficiência de Aire foi dado pelo trabalho de Liston e colaboradores (2004) que demonstrou que a perda de uma cópia do alelo Aire em camundongos transgênicos causa defeitos severos na seleção negativa de células T e resulta na insulite de células pancreáticas, com a incidência de diabetes comparada com a de camundongos Aire KO (LISTON et al., 2004).

Nosso grupo de pesquisa também já evidenciou que variações nos níveis de expressão de Aire no estroma tímico de camundongos NOD, precedem a emergência do diabetes do tipo 1 (DM1). Uma diminuição na expressão desse gene em animais considerados pré-diabéticos precede o aparecimento de DM1. Além disso, TRAs relacionados ao DM1 e expressos no timo como Ins2 e Gad1, apresentaram expressão reprimida no timo de camundongos diabéticos. Esses achados indicam que a desregulação cronológica de genes importantes para a seleção negativa pode estar associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes

agressivas (FORNARI et al., 2010). Outro trabalho recente do nosso grupo demonstrou que perturbações leves e transitórias na expressão do gene Aire, no timo de camundongos Balb/c eletrotransfectados *in vivo* com RNAi, podem ocasionar alterações na expressão de diversos genes, entre eles TRAs (OLIVEIRA et al., 2013).

Essas observações nos levaram a questionar se alterações temporais e parciais na expressão do gene Aire, poderiam desregular o *crosstalk* tímico entre mTECs e timócitos, o que poderia contribuir para o desenvolvimento da autoimunidade. Segundo o que conhecemos, nada ainda foi mensurado, considerando as principais células envolvidas na indução da tolerância central no timo. Para testar essa hipótese, manipulamos a expressão do gene Aire e realizamos um ensaio de adesão entre mTECs e timócitos. Nossa visão é que esse ensaio representa um sistema modelo útil por meio do qual poderíamos quantificar a funcionalidade de Aire.

Neste trabalho, utilizamos uma linhagem primária de células tímicas epiteliais medulares denominada mTEC 3.10. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Wilson Savino, então coordenador do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro/RJ.

As células mTEC 3.10 foram estabelecidas a partir do timo de camundongos recém-nascidos da linhagem C57BL/6 e o fenótipo medular determinado por imunomarcação com os anticorpos Th-3 e Th-4 mAb, que reconhecem fenótipos corticais e medulares, respectivamente. Além disso, foi demonstrado que as TECs medulares são capazes de apresentar antígenos solúveis para às células T (HIROKAWA et al., 1986; MIZUOCHI et al., 1992). Essas células também foram avaliadas por meio da utilização de um painel de anticorpos monoclonais anti-citoqueratina que comprovou o fenótipo medular distinto (NIHEI et al., 2003).

Ainda com o propósito de confirmar o fenótipo medular das células mTEC 3.10, empregamos o seguinte painel de anticorpos monoclonais: anti-*mouse* CD45-PerCP; anti-*mouse* CD326 (Ep-CAM) e anti-*mouse* Ly51-PE (BD Biosciences - Sao Jose, CA, USA). Foi realizada também a marcação das células com a Lectina Aglutinina I de *Ulex europaeus* (UEA I) marcado com FITC (Vector Labs - Burlingame, Ca, USA). As células foram ainda marcadas com anti-*mouse* CD80-APC e anti-*mouse* MHCII-PE (BD Biosciences - Sao Jose, CA, USA) (GRAY et al., 2002; ALEXANDROPOULOS & DANZL, 2012).

As características medulares das células mTEC 3.10 foram confirmadas pelo fenótipo: CD45⁻ Ep-CAM⁺ Ly51⁻ UEA-1⁺ (Figura 19). Verificou-se ainda que uma cultura de células mTEC 3.10 pode apresentar células em diferentes estágios de maturação, visto que apenas algumas expressavam CD80 e MHCII em sua superfície (Figura 19). Sabe-se que mTECs apresentam fenótipo heterogêneo no que diz respeito a expressão de CD80 e MHCII (revisado por DERBINSKI et al., 2005).

A linhagem mTEC 3.10 que cresce *in vitro* em cultura, mostrou fraca positividade com relação a esses dois marcadores, com valores percentuais abaixo do que é observado quando se faz esse tipo de fenotipagem a partir de células mTEC separadas de timo fresco, as quais podem mostrar até 30% de mTEC^{high} (XING & HOGQUIST, 2014). A baixa frequência de células mTEC 3.10 expressando CD80 e MHCII pode ser devida ao fato de que essas células vêm sendo mantidas em cultura por um longo período de tempo e por isso não recebem os estímulos peculiares do microambiente tímico *in vivo*. Mesmo assim, optamos por utilizar essa linhagem em nosso sistema modelo, já que ela mantém claramente as características medulares e também por expressar o gene Aire e um conjunto diverso de genes que codificam TRAs (MACEDO et al., 2009).

Com o intuito de avaliar o efeito de oscilações na expressão de Aire no "crosstalk" das células mTEC com timócitos, silenciámos o gene Aire na linhagem mTEC 3.10 por meio da técnica de RNAi, neste caso RNAi anti-Aire. A interferência por RNA é uma técnica amplamente utilizada por sua seletividade e eficiência, pois permite o alto grau de inibição dos transcritos do gene alvo *in vitro* (FIRE, 1998). Essa técnica baseia-se na utilização de moléculas de RNA dupla fita que apresentam aproximadamente 21-23 pares de bases e, quando inseridas nas células, são incorporadas pelo complexo RISC e processadas para que possam interagir com o RNA mensageiro alvo por complementaridade de sequência. Essa interação resulta na degradação do RNA mensageiro alvo e consequente interrupção da tradução e, portanto, da síntese de proteínas (CULLEN & ARNDT, 2005).

Para determinar qual concentração de RNAi e o tempo de silenciamento que seria mais eficiente, foi realizado um experimento piloto no qual foram testadas as concentrações de 5 e 10 nM e a expressão de Aire foi analisada após 24 e 48 horas. A concentração de 5nM de RNAi anti-Aire e o tempo de silenciamento de 24 horas

mostraram-se mais eficientes na inibição parcial dos transcritos do gene Aire. Nessas condições foi possível obter em torno de 70% de silenciamento (figura 22).

Ainda com o objetivo de avaliar a eficiência da inibição dos transcritos do gene Aire, foi utilizada uma metodologia adicional de hibridização fluorescente *in situ* das moléculas de RNA mensageiro com *Stellaris® RNA FISH*. Essa técnica nos permitiu visualizar, localizar e quantificar o RNA mensageiro de interesse a nível subcelular por meio de microscopia de fluorescência. O teste estatístico (*t-Student*) revelou uma diminuição significativa na intensidade do sinal fluorescente das amostras tratadas com RNAi anti-Aire em relação as amostras controle ($p < 0,0001$) (figura 23) e, ainda, as imagens de microscopia confocal mostraram claramente a redução da quantidade de pontos fluorescentes nas amostras que tiveram o gene Aire silenciado (Figura 24).

Além disso, como seria realizado um ensaio funcional entre mTECs e timócitos, quantificamos não somente o RNA mensageiro de Aire mas também os níveis de expressão de sua proteína. Com esse objetivo, foi realizado o procedimento de *western blot* das amostras controle e das amostras que tiveram o gene Aire silenciado. Foi também observada redução parcial (aproximadamente 51%) nos níveis de proteína das células que tiveram o gene Aire silenciado em relação ao controle após 24 horas da transfecção com 5nM de RNAi anti-Aire (teste *t-Student* $p=0,0129$). Foi constatado também que em 48 horas após a transfecção, os níveis de proteína Aire já estão quase totalmente restituídos (figura 25).

A imunolocalização da proteína AIRE foi analisada por imunofluorescência com o anticorpo anti-Aire D17. Para esse ensaio foram utilizadas células controle e células transfectadas com 5 nM de RNAi anti-Aire por 24 horas. A proteína AIRE pode ser observada como pontos vermelhos distribuídos pelo núcleo das células (Figura 26), o que condiz com o fato de se tratar de um fator de transcrição e está de acordo com o que já foi relatado na literatura. Nas células que tiveram o gene AIRE silenciado, praticamente não foi observada a presença de proteínas (Figura 26) (BJÖRSES *et al.*, 1999).

Com a observação de que a expressão do gene Aire nas células mTEC 3.10 é responsiva ao silenciamento gênico, prosseguimos com o ensaio de adesão. A realização desse ensaio teve como objetivo avaliar o efeito do silenciamento do gene Aire na adesão de mTECs com timócitos e apresentar uma forma de mensurar a relação funcional do gene Aire no *crosstalk* mTEC-timócito.

O ensaio de adesão celular foi realizado a partir de um protocolo estabelecido pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro/RJ (RIBEIRO-CARVALHO *et al.*, 2002; SAVINO *et al.*, 2004, 2007; OCAMPO *et al.*, 2008, LINHARES-LACERDA *et al.*, 2010) e por nós adaptado.

Observamos que a inibição parcial do gene Aire nas células mTEC3.10 resultou em um decréscimo significativo na capacidade destas células aderirem com timócitos ($p=0,0019$) (figura 27). Observamos também que tal diminuição na adesão abrangeu todos os conjuntos de timócitos CD3 positivos, uma vez que suas proporções são semelhantes nas três populações: duplo positivos ($CD4^+CD8^+$); simples positivos $CD4^+$ e simples positivos $CD8^+$, como avaliado por citometria de fluxo (figura 28). Segundo nosso conhecimento, nenhum trabalho até o momento havia mensurado a função do gene Aire no *crosstalk* tímico da forma como fizemos.

Visto que a apoptose constitui o principal mecanismo pelo qual os timócitos autoreativos são eliminados durante a seleção negativa no timo, avaliamos ainda se a inibição parcial do gene Aire poderia acarretar em alterações na apoptose dos timócitos. Alguns trabalhos *in vitro* indicam que a super expressão de Aire poderia desempenhar um papel na apoptose das próprias mTECs (COLOMÉ *et al.*, 2010; LIIV *et al.*, 2012). Entretanto, até o momento, somente dois trabalhos do mesmo grupo de pesquisa correlacionam diretamente a expressão de Aire com a apoptose de timócitos. Yamagushi e colaboradores (2011 e 2014) demonstraram a relação entre a expressão do gene Aire e a apoptose de timócitos em um modelo de cocultura com células mTEC isoladas do timo gigante de um camundongo transgênico (YAMAGUCHI *et al.*, 2011 e 2014).

Em vista disso, nós questionamos se com a diminuição da expressão do gene Aire e consequentemente dos TRAs haveria menos apresentação de autoantígenos pelas células mTEC 3.10 e, portanto, menos reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC pelos timócitos, o que poderia diminuir a frequência de apoptose dos timócitos co-cultivados com mTECs que tiveram o gene Aire silenciado. Essa hipótese não foi comprovada em nosso modelo experimental, visto que não ocorreu diferença significativa na frequência da apoptose de timócitos entre as duas condições experimentais testadas (Figura 29).

Acreditamos que uma das possibilidades para não ter havido diferença na frequência de apoptose entre os timócitos co-cultivados com células mTEC 3.10

controle e células que tiveram o gene Aire silenciado, está no fato de que essas células permaneceram em cocultura somente por uma hora e esse tempo talvez não seja suficiente para acarretar alterações nos eventos de apoptose dos timócitos.

Não foi possível testar maiores tempos de adesão entre as células mTEC 3.10 e os timócitos devido a limitação da técnica de silenciamento gênico com RNAi, visto que após 24 horas de silenciamento tanto os níveis dos transcritos do gene Aire quanto de sua proteína já começam a ser restituídos nesse modelo. Outra possível causa deve ser a baixa expressão de MHCII e CD80, e portanto, a maioria das células não está no nível de maturação adequado para uma ótima apresentação de autoantígenos em termos de variedade e quantidade e, por isso, os timócitos cocultivados com as mTECs controle não estariam recebendo sinalização suficiente para apresentar maior frequência de apoptose em relação aos timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com mTECs que tiveram o gene Aire silenciado.

Apesar da inibição parcial do gene Aire não ter sido suficiente para alterar a frequência de apoptose dos timócitos, verificamos que foi suficiente para gerar um decréscimo significativo na capacidade das células mTEC 3.10 aderirem com timócitos, como discutido anteriormente. Para entender melhor os mecanismos pelos quais isso pode ter ocorrido, optamos por utilizar a técnica de hibridização com *oligomicroarrays* para estudarmos o transcriptoma das células mTEC 3.10. Essa ferramenta mostrou-se eficaz e muito difundida nas pesquisas sobre expressão gênica transcricional com aplicações no estudo de vários organismos (PASSOS, 2015). A tecnologia dos microarrays nos permite verificar a expressão de milhares de genes simultaneamente e fornece as assinaturas moleculares dos processos biológicos nos modelos estudados. Além disso, a partir da análise da expressão gênica diferencial é possível detectar diferenças na expressão de genes modulados entre diferentes situações experimentais (FATHMAN et al., 2005).

A avaliação do transcriptoma das células mTEC 3.10 após o ensaio de adesão foi feita por meio da tecnologia de *oligomicroarrays* da *Agilent Technologies*. A inibição parcial do gene Aire foi capaz de promover um perfil transcricional distinto entre as células controle e as células que tiveram o gene Aire silenciado. Isso foi visualizado pela aplicação do coeficiente de correlação de Pearson, que é utilizado como medida de similaridade de expressão gênica. A análise estatística para identificação do perfil transcricional diferencial entre as condições avaliadas revelou um total de 1278 genes diferencialmente expressos, sendo que 852 estavam

reprimidos e 426 estavam induzidos (Apêndice A). Para este trabalho, foram considerados diferencialmente expressos genes com valor de $p < 0.05$, com correção por FDR (*Benjamini Hochberg*) e *foldchange* de no mínimo 1.5.

O conjunto de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre as células controle e as células que tiveram o gene Aire silenciado foi submetido então à análise de enriquecimento funcional por meio da ferramenta de anotação do DAVID, para que pudéssemos identificar as categorias de GO mais enriquecidas. As categorias de GO abrangem três domínios: componente celular, função molecular e processo biológico. Uma categoria foi considerada significativa quando tinha no mínimo três genes e um score < 0.05 com correção de *Benjamini-Hochberg*.

Como os genes podem estar enriquecidos em mais de uma categoria, utilizamos a ferramenta de agrupamento do próprio DAVID para agrupar os termos que possuem significado similar por compartilharem genes. Os grupos de genes mais enriquecidos foram dispostos em ordem de importância de acordo com a pontuação de enriquecimento (*score*), que é calculada de acordo com o *EASE score* (*p value*) de cada membro do grupo. A análise dos genes modulados pelo silenciamento de Aire nas células mTEC 3.10 gerou sete grupos de genes reprimidos e quatro grupos de genes induzidos. Cada grupo de genes foi associado a vários processos biológicos e funções moleculares. Primeiramente discutiremos os genes que tiveram sua expressão reprimida e após, os genes que tiveram sua expressão induzida com o silenciamento de Aire.

Os genes reprimidos categorizados nos três primeiros grupos foram relacionados principalmente com as categorias funcionais: região extracelular; matriz extracelular; adesão celular e família de moléculas de adesão CAM. De particular relevância, destacamos os genes *Lama1* (LM-111), *Vcam1*, *Icam4*, *Col2a1*, *Cxcl1*, *Ccl3*, e *CD80*.

Sabe-se que os timócitos em desenvolvimento interagem com o microambiente tímico enquanto migram e se diferenciam nesse órgão. As regiões tímicas são compostas por proteínas da matrix extracelular (ECM) como os colágenos, fibronectinas, lamininas, integrinas e também por moléculas solúveis como hormônios, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e esfingolipídeos (SAVINO et al., 2015). As TECs ligam-se aos timócitos em maturação por meio dos ligantes da ECM e seus receptores.

Caracterizam-se como importantes componentes da ECM as glicoproteínas denominadas lamininas. Cada laminina é composta por três polipeptídeos (uma cadeia pesada α e duas diferentes cadeias leves β e γ), que exibem propriedades adesivas em vários sistemas biológicos. As lamininas constituem uma família de proteínas composta por pelo menos 18 variantes com variável distribuição tecidual (SAVINO et al., 2011). As lamininas são numeradas de acordo com o número de cadeias α , β e γ que possuem. Por conseguinte, a laminina 1 (LM-1), heterodímero $\alpha 1\beta 1\gamma 1$, por exemplo, é denominada LM-111 e assim por diante (AUMAILLEY et al., 2005). Estudos *in vitro* revelaram que as TECs produzem lamininas em várias espécies de mamíferos, o que sugere um papel relevantes dos componentes da ECM na fisiologia tímica modulando a interação entre TECs e timócitos (OCAMPO et al., 2008).

A expressão intratímica de algumas isoformas de LM já foi descrita. A expressão das isoformas LM-211, LM-221; LM-511 e LM-521 foi relatada na região supcapsular do córtex e na região perivascular, enquanto que as isoformas LM-411 e LM-421 foram encontradas somente na região perivascular. Já a expressão da LM-332, foi demonstrada na região subcapsular do córtex e principalmente na medula. Estudos indicam o envolvimento da LM-332 na diferenciação de subpopulações de timócitos SP CD8+

Em nosso estudo, a isoforma LM-111 teve sua expressão reprimida com o silenciamento do gene Aire. Essa laminina aparece cedo no desenvolvimento e é a principal laminina associada a embriogênese. Entretanto, a expressão de LM-111 em adultos é bastante limitada, sendo detectada apenas em algumas membranas epiteliais basais (FALK et al., 1999; MURRAY & EDGAR, 2000; VIRTANEN et al., 2000).. Alguns estudos relataram a presença de LM-111 em TECs e "*thymic Nurse Cells*" (TNCs). Além do seu papel na migração dos timócitos, a LM-111 é capaz de estimular a proliferação de TECs em humanos e camundongos (revisado por SAVINO et al., 2015) . Até o momento, não havia relatos que correlacionassem os níveis de expressão de Aire com a modulação da expressão da LM-111.

Linfócitos T fazem uso do complexo do TCR durante o reconhecimento específico de antígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) via MHC. O complexo do TCR participa da transdução de sinal para a ativação das células T. Além disso, para que ocorra a ativação adequada das células T, faz-se necessária a participação de sinais coestimuladores, os quais são

fornecidos por moléculas coestimuladoras presentes nas APCs. É bem estabelecido que as moléculas de adesão VCAM-1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*) e ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*) atuam na adesão firme de leucócitos ao endotélio e coestimulam a proliferação de células T por meio da ligação com as integrinas VLA-4 e LFA-1, respectivamente (DAMLE & ARUFFO, 1991, DAMLE et al., 1992).

Visto que a seleção positiva e negativa dos timócitos também requer a ligação do complexo do TCR e das moléculas coestimuladoras com os complexos peptídeo MHC expressos pelas células epiteliais tímicas, Paessens e colaboradores (2008) investigaram se VCAM-1 e ICAM-1 também poderiam atuar como coestimuladores durante os eventos de seleção dos timócitos *in vitro* (PAESSENS et al., 2008). Foi observado que a ativação do complexo do TCR juntamente com a coestimulação por VCAM-1 e ICAM-1 induziu a geração de timócitos SP CD4⁺ derivados de timócitos DP CD4⁺CD8⁺ no córtex tímico. Portanto, essas moléculas atuariam como coestimuladoras na seleção positiva do timócitos *in vitro*. Nesse trabalho foi demonstrado que a expressão de VCAM-1 é restrita ao córtex, enquanto que ICAM-1 é encontrado no córtex e na medula (PAESSENS et al., 2008). O fato de ICAM-1 estar também localizado na medula, indica que essa molécula poderia exercer participação na seleção negativa, entretanto, resultados provenientes de outras investigações não suportam essa hipótese (KISHIMOTO et al., 1996; PAESSENS et al., 2008)

Em desacordo com o trabalho de Paessens e colaboradores (2008), observamos a expressão transcricional de VCAM-1 nas células mTEC 3.10 e também de um outro membro da família das ICAMs, denominado ICAM-4 (o qual foi recentemente caracterizado como molécula de adesão). A expressão de ICAM-4 é descrita nos estágios iniciais da eritropoiese humana e funciona como um ligante de integrina (LEE et al., 2003). Até o momento, não havia sido relatada a presença de ICAM-4 no epitélio tímico e, como no caso da LM-111, também não há relatos correlacionando a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-4 com os níveis de expressão do gene Aire.

Visto que VCAM-1 caracteriza-se como uma importante molécula envolvida na adesão de leucócitos ao endotélio, acreditamos que a repressão de sua expressão nas células mTEC 3.10, após o silenciamento do gene Aire, possa ter contribuído para a menor adesão dos timócitos às mTECs. Não descartamos a

hipótese de ICAM-4 também desempenhar o papel de molécula de adesão em mTECs, entretanto, relatos da alta especificidade de sua expressão em determinados tecidos, sugerem fortemente que esta molécula pode estar sendo expressa em mTECs como um TRA.

Ainda entre os genes reprimidos nas células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado, encontramos o Col2a1 (do inglês, *collagen, type II, alpha 1*). Inúmeros trabalhos relatam esse tipo de colágeno como o principal componente da cartilagem e humor vítreo do olho. Camundongos que possuem mutações no gene Col2a1 exibem severa condrodisplasia, deformidades craniofaciais e fissura palatina (CIONNI et al, 2014; FAROOQ et al., 2014; YANG et al., 2014. Nossa interpretação é que esse tipo de colágeno é expresso pelas células mTEC 3.10 como um autoantígeno e não como componente estrutural da EMC tímica.

Vários trabalhos já demonstraram o papel de quimiocinas e seus respectivos receptores no direcionamento e localização do timócitos. Por exemplo, a entrada dos progenitores de células T no timo é controlada pelas interações com CCL21/CCR7 e CCL25/CCR9 (quimiocina/receptor de quimiocina). A migração das células imaturas dentro do timo é controlada por CXCL12/CXCR4 e CCL20/CCR6 e, além disso, a sinalização por CCR7 é essencial para a migração dos timócitos duplo positivo para a medula. CCR7 também está envolvido no egresso dos timócitos do timo, processo que é também controlado pela sinalização do receptor de esfingosina-1-fosfato (revisado por PASSOS et al., 2015). Em nosso modelo experimental, nenhuma dessas moléculas foi modulada pelo silenciamento do gene Aire nas mTECs.

Por um outro lado, observamos modulação dos genes Cxcl1 e Ccl3. O gene Cxcl1 codifica uma proteína membro da família CXC de quimiocinas, as quais estão relacionadas com o recrutamento e ativação de leucócitos. Alguns trabalhos relacionam a expressão de Cxcl1 com o recrutamento de neutrófilos. Em camundongos, a deficiência desse gene está associada a colite e defeitos no recrutamento de células do sistema imune para o pulmão (BRYANT-HUDSON et al, 2012; JIN et al., 2014). A proteína codificada por Ccl3 é uma citocina que desempenha papel nas respostas imunes inflamatórias por meio de sua ligação aos receptores CCR1, CC34 e CCR5 (PERRY et al., 2014). Nossa interpretação imediata é que as células da linhagem mTEC 3.10 expressam Cxcl1 e Ccl3 como autoantígenos, entretanto, não descartamos a hipótese de que essas moléculas possam estar envolvidas na migração de timócitos.

Outro resultado interessante do nosso trabalho, proveio da observação de que a molécula CD80 sofreu modulação nas células mTEC 3.10 que tiveram o gene Aire silenciado. Um trabalho recente demonstrou que a ausência de coestimulação por C28-CD80/86 ou por CD40-CD40L resulta em defeitos severos no desenvolvimento de mTECs. Esses defeitos são tão graves que implicam na ausência de timócitos simples positivos (SP). Além disso, os timócitos CD4 SP que maturaram no microambiente tímico alterado em animais CD40/CD80/86 KO, apresentaram alta autoreatividade em respostas proliferativas *in vitro* e são letais quando transferidos adotivamente para recipientes congênicos atímicos *in vivo*. Também foi observado que a perturbação da via CD40-CD40L causou defeitos no desenvolvimento de mTECs, mas bem menos severos do que os observados em camundongos deficientes de CD40-CD40L e de CD28-CD80/CD86 conjuntamente. (WILLIAMS et al., 2014).

Em outro trabalho foi demonstrado o desenvolvimento defeituoso de timócitos quando as células mTEC tiveram D80/CD86 deletado em um modelo tridimensional *in vitro* (IRLA et al., 2013). Nossa interpretação é que a repressão da expressão de CD80 nas células mTEC 3.10 possa ter gerado o fraco reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC pelos timócitos e, conseqüentemente, a menor adesão dessas células às mTECs (índice de adesão).

Verificamos também que termos mais enriquecidos nos grupos 4 e 7 estavam relacionados a processos biológicos e funções moleculares intrínsecas ao metabolismo celular como, por exemplo, o transporte de íons e proteínas integrais da membrana. Já no grupo 5, os termos mais enriquecidos foram: "*lung development*"; "*respiratory tube development*" e "*respiratory system development*". Esta é mais uma evidência da expressão de TRAs pelas células mTEC 3.10.

No grupo 6, os genes categorizados foram relacionados a processos biológicos inerentes a resposta imunológica como: "*inflammatory response*", "*immune effector process*", "*innate immune response*" e "*complement activation*". Destacamos aqui o gene Cd55 que codifica uma proteína de mesmo nome.

CD55 é um dos principais membros da família de proteínas reguladoras do complemento (CRPs), essa molécula em conjunto com CD59 protege as células próprias contra a ativação inapropriada do complemento. O papel primário de CD55 é a desativação da C3 e C5 convertases do complemento (OGLESBY et al., 1996). Sladowski e colaboradores (2006) verificaram a expressão de CRPs no timo. Foi

relatado que no timo humano fetal e posnatal, CD55 e CD59 estão primariamente localizadas nos corpúsculos de Hassall, nas células medulares epiteliais tímicas, entretanto, sua função não está clara (Sladwski et al., 2006). Este resultado é o primeiro relato sobre o efeito modulador de Aire sobre a expressão desta molécula.

Quanto à inibição dos outros genes relacionados a resposta imunológica que foram categorizados no grupo 6, duas possibilidades surgem: a primeira é que os genes que tiveram sua expressão reprimida com o silenciamento de Aire poderiam codificar autoantígenos AIRE dependentes; e a segunda é que Aire poderia atuar como um regulador da resposta imune como um todo no timo.

Ainda, em relação aos genes que foram reprimidos pelo silenciamento de Aire, verificamos a ocorrência da expressão desses genes em outros tecidos, que não o timo (tabela 8). Apesar de tecidos como cérebro, testículos e fígado terem apresentado o maior número de genes envolvidos, o resultado da análise de enriquecimento funcional revelou que os termos (tecidos) estatisticamente mais enriquecidos ($p < 0,05$) foram: "*PCR rescue clones*", "*Unfertilized egg*", "*Diencephalon*"; "*Vomeroneasal organ*", "*Ovary*" e "*Uterus*". Isso se deve ao fato de que as análises por DAVID levam em consideração não somente a quantidade de genes envolvidos, mas também outros fatores como o valor de expressão individual. Os genes pertencentes a cada um dos termos enriquecidos estão descritos na tabela 9 (estatisticamente significantes) e os demais nos apêndices (apêndice B). Verificamos, desta forma, mais uma importante evidência da expressão de TRAs pelas células mTEC 3.10.

Os genes cuja expressão foi induzida após o silenciamento de Aire, foram categorizados em quatro grupos. Destacamos alguns dos termos mais enriquecidos nos grupos 1 e 4: "*sensory perception*"; "*sensory perception of smell*"; "*cognition*"; "*olfactory receptor activity*"; "*neurological system process*"; "*sensory perception of chemical stimulus*" e "*positive regulation of neuroblast proliferation*".

Salientamos que os genes categorizados em cada um desses processos codificam TRAs. Considerando-se que Aire é um controlador transcricional da expressão gênica promíscua, conclui-se que ele pode controlar tanto positivamente quanto negativamente a expressão de TRAs. Outra hipótese sugere que com o silenciamento do gene Aire, outros fatores de transcrição que controlam a expressão de TRAs Aire-independentes, poderiam ter sua função potencializada, talvez por meio de um mecanismo compensatório. Por fim, os termos enriquecidos nos grupos

2 e 3 foram relacionados a processos biológicos normais do metabolismo celular, como transdução de sinais, replicação de DNA, ciclo celular entre outros.

O *crosstalk* entre timócitos e células epiteliais tímicas é fundamental para o correto desenvolvimento de células T e o estabelecimento de tolerância central. Sabe-se que as mTECs contribuem para o estabelecimento da autotolerância por meio da expressão ectópica de TRAs no timo. A expressão desses TRAs em mTECs é amplamente controlada por Aire. Pelo reconhecimento de TRAs, os timócitos autoreativos são selecionados negativamente. Embora o papel de Aire na indução de tolerância central seja bem conhecido, os mecanismos celulares e moleculares precisos envolvidos no processo permanecem obscuros.

-Neste trabalho fizemos uso de um sistema modelo no qual células mTEC que expressam Aire de maneira constitutiva foram manipuladas com RNAi, o que resultou na inibição parcial da expressão deste gene. Isso nos possibilitou avaliar se este tipo de perturbação na expressão transcricional e traducional de Aire poderia afetar a adesão das mTECs com timócitos. Os resultados mostraram que sim, ou seja, variações parciais e transitórias na expressão de Aire, implicam na diminuição da adesão.

Como esse efeito foi mensurado por meio do ensaio de adesão, nossa interpretação é que conseguimos, pela primeira vez, estabelecer um paralelo entre os níveis de expressão de Aire em células mTEC, e sua propriedade de possibilitar a adesão de timócitos, a qual é essencial para que ocorra a seleção negativa e a prevenção de autoreatividade.

Considerações Finais

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As características medulares das células tímicas da linhagem mTEC 3.10, utilizadas nesse trabalho, foram confirmadas pelo fenótipo: CD45- Ep-CAM+ Ly51- UEA-1+.
- Verificou-se ainda que uma cultura de células mTEC 3.10 é heterogênea quanto a expressão dos marcadores de maturação CD80 e MHCII.
- As células tímicas da linhagem mTEC 3.10 expressam o gene Aire e um conjunto diverso de genes que codificam TRAs.
- O gene Aire pode ser silenciado em *in vitro* na linhagem celular mTEC 3.10.
- A proteína AIRE também sofre redução parcial em seus níveis quando as células mTEC 3.10 têm o gene Aire silenciado.
- Observamos que a inibição parcial do gene Aire nas células mTEC 3.10 resulta em um decréscimo significativo na capacidade destas células aderirem a timócitos.
- A redução na quantidade de timócitos aderidos às mTECs que tiveram o gene Aire silenciado abrange todos os conjuntos de timócitos CD3 positivos, uma vez que suas proporções são semelhantes nas três populações: duplo positivos (CD4+CD8+); simples positivos CD4+ e simples positivos CD8+.
- Em nosso modelo experimental *in vitro*, não verificamos diferença significativa na frequência de apoptose dos timócitos que passaram pelo ensaio de adesão com células mTEC controle ou que tiveram o gene Aire silenciado.

- A inibição parcial do gene Aire foi capaz de promover um perfil transcricional distinto entre as células controle e as células que tiveram o gene Aire silenciado.
- Genes que codificam moléculas que promovem a adesão estável de leucócitos ao endotélio, como VCAM-1, também foram moduladas, o que poderia explicar o fato de ter ocorrido menos adesão de timócitos sobre mTECs que tiveram o gene Aire silenciado.
- O silenciamento do gene Aire reprimiu a expressão de CD80, uma molécula coestimuladora essencial para o "diálogo" que ocorre entre as células T e as APCs na periferia e, segundo relatado em trabalhos recentes, um elemento crítico do *crosstalk* tímico que molda o desenvolvimento de timócitos e mTECs.
- Nossa interpretação geral dos resultados desse trabalho é de que conseguimos, pela primeira vez, estabelecer um paralelo entre os níveis de expressão de Aire em células mTEC e sua propriedade de aderir com timócitos, a qual que é essencial para que ocorra a seleção negativa apropriada e a prevenção de autoreatividade.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS

Aaltonen, J., Björnses, P., Sandkuijl, L., Perheentupa, J., Peltonen, L. An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. *Nat. Genet.* v.8(1), p.83-87, 1994.

Aaltonen, J., Horelli-Kuitunen, N., Fan, J. B., Björnses, P., Perheentupa, J., Myers, R., Palotie, A., Peltonen, L. High-resolution physical and transcriptional mapping of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy locus on chromosome 21q22.3 by FISH. *Genome Res.* v.7(8), p.820-829, 1997.

Abramson J., Goldfarb, Y. AIRE: From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression. *Eur. J. Immunol.* v.46(1), p.22-33, 2016.

Akirav, E. M., Ruddle, N. H., Herold, K. C. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* v.7(1), p.25-33, 2011.

Akiyama, T., Tateishi, R., Akiyama, N., Yoshinaga, R., Kobayashi, T. J. Positive and negative regulatory mechanisms for fine-tuning cellularity and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front. Immunol.* v.8:6, 2015.

Akiyoshi, H., Hatakeyama, S., Pitkänen, J., Mouri, Y., Doucas, V., Kudoh, J., Tsurugaya, K., Uchida, D., Matsushima, A., Oshikawa, K., Nakayama, K. I., Shimizu, N., Peterson, P., Matsumoto, M. Subcellular expression of autoimmune regulator is organized in a spatiotemporal manner. *J. Biol. Chem.* v.279(32), p.33984-33991, 2004.

Alexandropoulos, K., Danzl, N. M. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunol. Res.* v.54(1-3), p.177-190, 2012.

Alfaro, D., García-Ceca, J. J., Cejalvo, T., Jiménez, E., Jenkinson, E. J., Anderson, G., Muñoz, J. J., Zapata, A. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocytes-

epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur. J. Immunol.* v.37(9), p.2596-2605, 2007.

Anderson, G., Jenkinson, E. J., Moore, N. C., Owen, J. J. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature.* v.4:362(6415), p.70-73, 1993.

Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J., Jenkinson, E. J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* v.14, p.73-99, 1996.

Anderson, G., Jenkinson, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* v.1(1), p.31-40, 2001.

Anderson, M. S. Autoimmune endocrine disease. *Curr. Opin. Immunol.* v.14(6), p.760-764, 2002.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* V.15:298(5597), p.1395-1401, 2002.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., 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.* v.15:298(5597), p.1395-1401, 2002.

Annunziato, F., Romagnani, P., Cosmi, L., Lazzeri, E., Romagnani, S. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends. Immunol.* v.22(5), p.277-281, 2001.

Aschenbrenner, K., D`Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Rolink, A., Klein, L. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* v.8(4), p.351-358, 2007.

Atibalentja, D. F., Byersdorfer, C. A., Unanue, E. R. Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction. *J. Immunol.* v.15:183(12), p.7909-7918, 2009.

Barthlott, T., Keller, M. P., Krenger, W., Holländer, G. A.A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. *Swiss Med. Wkly.* v.136(23-24), p.365-369, 2006.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., Golani, I. Controlling the false Discovery rate in behavior genetics research. *Behav.Brain. Res.* v.1:125(1-2), p.279-284, 2001.

Bennett, A. R., Farley, A., Blair, N. F., Gordon, J. Sharp, L., Blackburn, C. C. Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity.* v.16(6), p.803-814, 2002.

Björkses, P., Pelto-Huikko, M., Kaukonen, J., Aaltonen, J., Peltonen, L., Ulmanen, I. Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum. Mol. Genet.* v.8(2), p.259-266, 1999.

Blackburn, C. C., Augustine C. L., Li, R., Harvey, R. P., Malin, M. A., Boyd, R. L., Miller, J. F., Morahan, G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.11:93(12), p.5742-5746, 1996.

Blackburn, C. C., Manley, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* v.4(4), p.278-289, 2004.

Bodey, B., Bodey B. Jr., Siegel, S. E., Kaiser, H. E. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo.* v.11(5), p.421-440, 1997.

Boehm, T., Bleul, C. C., Schorpp, M. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. *Immunol. Rev.* v.195, p.15-27, 2003a.

Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., Bleul, C. C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J. Exp. Med.* 198(5), p.757-769, 2003b.

Boehm, T. Thymus development and function. *Curr. Opin. Immunol.* v.20(2), p.178-184, 2008.

Boyd, R. L., Tucek, C. L., Godfrey, D. I., Izon, D. J., Wilson, T. J., Davidson, N. J., Bean, A. G., Ladyman, H. M., Ritter, M. A., Hugo, P. The thymic microenvironment. *Immunol. Today.* v.14(9), p.445-459, 1993.

Bredenkamp, N., Ulyanchenko, S., O'Neill, K. E., Manley, N. R., Vaidya, H. J., Blackburn, C. C. An organized and functional thymus generated from Foxn1-reprogrammed fibroblast. *Nat. Cell Biol.* v.16(9), 902-908, 2014.

Bunting, M. D., Comerford, I., McColl, S. R. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol. Cell Biol.* v.89(2), p.185-196, 2011.

Carpenter, A. C., Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat. Immunol.* v.11(8), p.666-673, 2010.

Chen, L., Xiao, S., Manley, N. R. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood.* v.15:113(3), p.567-574, 2009.

Chiba, K., Matsuyuki, H., Maeda, Y., Sugahara, K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol. Immunol.* v.3(1), p.11-19, 2006.

Ciofani, M., Zúñiga-Pflücker, J. C. The thymus as an inductive site for lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v.23 p.463-493, 2007.

Colomé, N., Collado, J., Bech-Serra, J. J., Liiv, I., et al. Increased apoptosis after autoimmune regulator expression in epithelial cells revealed by a combined quantitative proteomics approach. *J. Proteome. Res.* v.7:9(5), p.2600-2609, 2010.

Cook, D. L., Gerber, A. N., Tapscott, S. J. Modelling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.22:95(26), p.15641-15646, 1998.

Cullen, L. M., Arndt, G. M. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol. Cell. Biol.* v.83(3), p.217-223, 2005.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* v.2(11), p.1032-1039, 2001.

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.* v.4:202(1), p.33-45, 2005.

Donate, P. B., Fornari, T. A., Junta, C. M., Magalhães, D. A., Macedo, C., Cunha, T. M., Nguyen, C., Cunha, F. Q., Passos, G. A. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. *Immunobiology.* V.216(5), 591-603, p.2011.

Douagi, I., André, I., Ferraz, J. C., Cumano, A. Characterization of T cell precursor activity in the murine fetal thymus: evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. *Eur. J. Immunol.* v.30(8), p. 2201-2210, 2000.

Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E., Ekblom, P. Restricted distribution of laminin $\alpha 1$ chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol.* v.18(6), p.557-568, 1999.

Fathman, C. G., Soares, L., Chan, S. M., Utz, P. J. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature.* v.2:435(7042), p.605-611, 2005.

Fire, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell. Death Differ.* v.14(12), p.1998-2012, 2007.

Ferguson, B. J., Alexander, C., Rossi, S. W., Liiv, I., Rebane, A., Worth, C. L., Wong, J., Laan, M., Peterson, P., Jenkinson, E. J., Anderson, G., Acott, H. S., Cooke, A., Rich, T. AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem.* v.18:283(3), p.1723-1731, 2008.

Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* v.17(4), p.399-403, 1997.

Fornari, T. A., Donate, P. B., Macedo, C., Marques, M. M., Magalhães, D. A., Passos, G. A. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell Biochem.* v.342(1-2), p.21-28, 2010.

Gallegos, A. M., Bevan, M. J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* v.18:200(8), p.1039-1049, 2004.

Gardner, J. M., Devoss, J. J., Friedman, R. S., Wong, D. J., Tan, Y. X., Zhou, X., Johannes, K. P., Su, M. A., Chang, H. Y., Krummel, M. F., Anderson, M. S. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science.* v.8:321(5890), p.843-847, 2008.

Gäbler, J., Arnold, J., Kyewski, B. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* v.37(12), p.3363-3372, 2007.

Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* v.2(5), p.309-322, 2002.

Germeraad, W. T., 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.* v.51(9), p.1225-1235, 2003.

Giraud, M., Yoshida, H., Abramson, J., Rahl, P. B., Young, R. A., Mathis, D., Benoist, C. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.109(2), p.535-540, 2012.

Giraud, M., Jmari, N., Du, L., Carallis, F., Nieland, T. J., Perez-Campo, F. M., Bensaude, O., Root, D. E., Hacohen, N., Mathis, D., Benoist, C. An RNAi screen for AIRE cofactors reveals a role for Hnrnp1 in polymerase release and AIRE-activated ectopic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.111(14), p.1491-1496, 2014.

Goldrath, A. W., Bevan, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* v.398(6799), p.255-262, 1999.

Gordon, J., Wilson, V. A., Blair, N. F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., Manley, N. R., Blackburn, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. immunol.* v.5(5), p.546-553, 2004.

Gordon, J., Manley, N. R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development.* v.138(18), p.3865-3878, 2011.

Gray, D. H., Chidgey, A. P., Boyd, R. L. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* v.260(1-2), p.15-28, 2002.

Gray, D. H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C., Boyd, R. L. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymus epithelial cells. *Blood.* v.108(12), p.3777-3785, 2006.

Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., Nagamine, K., Lagerstedt, A., Ovod, V., Ranki, A., Rantala, I., Nieminen, M., Tuukkanen, J., Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Shimizu, N., Krohn, K. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating

immune tolerance in thymus medulla. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* v.21:257(3), p.821-825, 1999.

Heino, M., Peterson, P., Sillanpää, N., Guérin, S., Wu, L., Anderson, G., Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Kudoh, J., Shimizu, N., Jenkinson, E. J., Naquet, P., Krohn, K. J. RNA and protein expression of the murine autoimmune regulator gene (Aire) in normal, RelB-deficient and in NOD mouse. *Eur. J. Immunol.*v.30(7), p.1884-1893, 2000.

Hinterberger M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R., Klein, L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat. Immunol.*v.11(6), p.512-519, 2010.

Hogquist, K. A. Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr. Opin. Immunol.*v.13(2), p.225-231, 2001.

Hogquist, K. A., Xing, Y., Hsu, F. C., Shapiro, V. S. T Cell Adolescence: Maturation events beyond positive selection. *J. Immunol.* v.15:195(4), p.1351-1357, 2015.

Hirokawa, K., Utsuyama, M., Moriizumi, E., Handa, S. Analysis of the thymic microenvironment by monoclonal antibodies with special reference to thymic nurse cells. *Thymus.*v.8(6), p.349-360, 1986.

Hu, Z., Lancaster, J.N., Ehrlich, L. I. The contribution of chemokines and migration to the induction of central tolerance in the thymus. *Front. Immunol.* v.6:398, p.1-8, 2015.

Hubert, F. X., Kinkel, S. A., Davey, G. M., Phipson, B., Mueller, S. N., Liston, A., Proetto, A. I., Cannon, P. Z., Forehan, S., Smyth, G. K., Wu, L., Goodnow, C. C., Carbone, F. R., Scott, H. S., Heath, W. R. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blodd.* v.1:118(9), p.2462-2472, 2011.

Itoi, M., Kawamoto, H., Katsura, Y., Amagai, T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitor into the early thymus anlage. *Int. Immunol.*v.13(9), p.1203-1211, 2001.

Jenkinson, W. E., Jenkinson, E. J., Anderson, G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med.*v.198(2), p.325-332, 2003.

Jenkinson, W. E., Rossi, S. W., Jenkinson, E. J., Anderson, G. Development of functional thymic epithelial cells occurs independently of lymphostromal interactions. *Mech. Dev.*v.122(12), p.1294-1299, 2005.

Jiang, W., Anderson, M. S., Bronson, R., Mathis, D., Benoist, C. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J. Exp. Med.* v.19:202(6), p.805-815, 2005.

Jonkers, I., Lis, J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*v.16(3), p.167-177, 2015.

Kaern, M., Elston, T. C., Blake, W. J., Collins, J. J. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat. Rev. Genet.*v.6(6), p.451-464, 2005.

Kanno, T., Kanno, Y., LeRoy, G., Campos, E., Sun, H. W., Brooks, S. R., Vahedi, G., Heightman, T. D., Garcia, B. A., Reinberg, D., Siebenlist, U., O`Shea, J. J., Ozato, K. BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.*v.21(12), p.1047-1057, 2014.

Kauffmann, A., Gentleman, R., Huber, W. ArrayQualityMetrics – a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics.* v.1:25(3), p.415-416, 2009.

Kisand, K., Link, M., Wolff, A. S., Meager, A., Tserel, L., Org, T., Murumägi, A., Uibo, R., Willcox, N., Trebusak Podkrajsek, K., Battelino, T., Lobell, A., et al., Interferon

autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes. *Blood*. v.1:112(7), p.2657-2666, 2008.

Klein, L., Klein, T., Rther, U., Kyewski, B. CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J. Exp. Med.* v.6:188(1), p.5-16, 1998.

Klein, L., Kyewski, B. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med. (Berl)*v.78(9), p.483-494, 2000.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirsberger, G., Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.*v.9(12), p.833-844, 2009.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* v.14(6), p.377-391, 2014.

Klug, D. B., Carter, C., Gimenez-Conti, I. B., Richie, E. R. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J. Immunol.* v.15:169(6), p.2842-2845, 2002.

Kogawa, K., Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kudoh, J., Tamiya, S., Sakai, Y., Shimizu, N., Harada, M. Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol. Lett.* v.1:80(3), p.195-198, 2002.

Koh, A. S., Kuo, A. J., Park, S. Y., Cheung, P., Abramson, J., Bua, D., Carney, D., Shoelson, S. E., Gozani, O., Kingston, R. E., Benoist, C., Mathis, D. Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.14:105(41), p.15878-15883, 2008.

Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H. S., Peterson, P. Modulation of AIRE regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* v.45(1), p.25-33, 2008.

Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R. et al. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* v.15:174(4), p.1862-1870, 2005.

Kyewski, B., Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* v.4(9), p.688-698, 2004.

Kyewski, B., Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* v.24, p.571-606, 2006.

Laan, M., Peterson, P. The many faces of aire in central tolerance. *Front. Immunol.* v.11:4, 2013.

Laemmli, U. K., Favre, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* v.15:80(4), p.575-599, 1973.

Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D. M., Nogueira, A. C., Dardenne, M., Hermine, O., Savino, W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.27:104(13), p.5545-5550, 2007.

Liiv, I., Rebane, A., Org, T., Saare, M., Maslovskaja, J., Kisand, K., Juronen, E., Valmu, L., Bottomley, M. J., Kalkkinen, N., Peterson, P. DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1783(1), p.74-83, 2008.

Liiv, I., Haljasorg, U., Kisand, K., Maslovskaja, J., Laan, M., Peterson, P. Aire-induced apoptosis is associated with nuclear translocation of stress sensor protein GAPDH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.22:423(1), p.32-37, 2012.

Linhares-Lacerda, L., Ribeiro-Alves, M., Nogueira, A. C., Mendes-da-Cruz, D. A., Magalhães, D. A., Dardenne, N., Passos, G. A., Savino, W. RNA interference-mediated knockdown of CD49e ($\alpha 5$ integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics*. v.22:11, 2010.

Liston, A., Gray, D. H., Lesage, S., Fletcher, A. L., Wilson, J., Webster, K. E., Scott, H. S., Boyd, R. L., Peltonen, L., Goodnow, C. C. Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J. Exp. Med.* v.18:200(8), p.1015-1026, 2004.

Lo W. L., Allen, P. M. Self-awareness: how self-peptide/MHC complexes are essential in the development of T cells. *Mol. Immunol.* v.55(2), p.186-189, 2012.

Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P., Irla, M. Thymic crosstalk coordinates medulla organization and T-cell tolerance induction. *Front. Immunol.* v.20:6, p.1-13, 2015.

López-Romero, P., Gonzalez, M. A., Callejas, S., Dopazo, A., Irizarry, R. A. Processing of Agilent microRNA array data. *BMC Res. Notes*. v.22, p.3-18, 2010.

Love, P. E., Bhandoola, A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat. Rev. Immunol.* v.24:11(7), p.469-477, 2011.

Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A. Van den Brink, M. R., Boyd, R., Sempowski, G. D. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* v.30(7), p.366-373, 2009.

Macedo, C., Evangelista, A. F., Magalhães, D. A., Fornari, T. A., Linhares, L. L., Junta, C. M., Silva, G. L., Sakamoto-Hojo, E. T., Donadi, E. A., Savino, W., Passos, G. A. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression. In medullary thymic epithelial cells. *Mol. Immunol.* v.46(16), p.3240-3244, 2009.

Magalhães, D. A., Silveira, E. L., Junta, C. M., Sandrin-Garcia, P., Fachin, A. L., Donadi, E. A., Sakamoto-Hojo, E. T., Passos, G. A. Promiscuous gene expression. In

the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* v.13(2-4), p.81-99, 2006.

Manley, N. R., Capecchi, M. R. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev. Biol.* v.195(1), p.1-15, 1998.

Manley, N. R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin. Immunol.* v.12(5), p.421-428, 2000.

Manley, N. R., Condie, B. G. Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* v.92, p.103-120, 2010.

Mathis, D., Benoist, C. A decade of AIRE. *Nat. Rev. Immunol.* v.7(8), p.645-650, 2007.

Mathis, D., Benoist, C. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* v.27, p.287-312, 2009.

McCaughy, T. M., Wilken, M. S., Hogquist, K. A. Thymic emigration revisited. *J. Exp. Med.* v.29:204(11), p.2513-2520, 2007.

Meloni, A., Fiorillo, E., Corda, D., Incani, F., Serra, M. L., Contini, A., Cao, A., Rosatelli, M. C. DAXX is a new AIRE-interacting protein. *J. Biol. Chem.* v.23:285(17), p.13012-13021, 2010.

Mendes-da-Cruz, D. A., Smaniotto, S., Keller, A. C., Dardenne, M., Savino, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J. Immunol.* v.1:180(7), p.4639-4647, 2008.

Miller, J. F. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol. Rev.* v.185, p.7-14, 2002.

Millet, V., Naquet, P., Guinamard, R. R. Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* v.38(5), p.1257-1263, 2008.

Mizuochi, T., Kasai, M., Kokuho, T., Kakiuchi, T., Hirokawa, K. Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J. Exp. Med.* v.1:175(6), v.1601-1605, 1992.

Murray, P., Edgar, D. Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J. Cell Biol.* v.4;150(5), p.1215-1221, 2000.

Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J., Lalioti, M. D., Mullis, P. E., Antonarakis, S. E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., Simizu, N. Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* v.17(4), p.393-398, 1997.

Nakaoka, S., Sasaki, K., Ito, A., Nakao, Y., Yoshida, M. A genetically encoded FRET probe to detect intranucleosomal histone H3K9 or H3K14 acetylation using BRD4, a BET family member. *ACS Chem. Biol.* 2015.

Nihei, O. K., Campos de Carvalho, A. C., Spray, D. C., Savino, W., Alves, L. A. A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* v.285(5), p.C1304-1313, 2003.

Nitta, T., Murata, S., Ueno, T., Tanaka, K., Takahama, Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv. Immunol.* v.99, p.59-94, 2008.

Ocampo, J. S., de Brito, J. M., Corrêa-de-Santana, E., Borojevic, R., Villa-Verde, D. M., Savino, W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interaction. *Cell Immunol.* v.254(1), p.1-9, 2008.

Oliveira, E. H., Macedo, C., Donate, P. B., Almeida, R. S., Pezzi, N., et al. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). *Immunobiology.* v.218(1), p.96-104, 2013.

Org, T., Chignola, F., Heténvi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., Maran, U., Mollica, L., Bottomley, M. J., Musco, G., Peterson, P. The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to active gene expression. *EMBO Rep.*v.9(4), p.370-376, 2008.

Org, T., Rebane, A., Kisand, K., Laan, M., Haljasorg, U., Andreson, R., Peterson, P. AIRE activated tissue specific genes have histone modifications associated with inactive chromatin. *Hum. Mol. Genet.* v.15:18(24), p.4699-4710, 2009.

Oukka, M., Colucci-Guyon, E., Tran, P. L., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Lotteau, V., Kosmatopoulos, K. CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity*v.4(6), p.545-553, 1996a.

Oukka, M., Cohen-Tannoudji, M., Tanaka, Y., Babinet C., Kosmatopoulos, K. Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J. Immunol.* v.1:156(3), p.968-975, 1996b.

Oven, I., Brdicková, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M., Peterlin, B. M. AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Cell Biol.*v.27(24), p.8815-8823, 2007.

Palmer, E. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.*v.3(5), p.383-391, 2003.

Passos, G. A., Mendes-da-Cruz, D. A., Oliveira, E. H. The thymic orchestration involving Aire, miRNAs, and cell-cell interactions during the induction of central tolerance. *Front. Immunol.* v.14:6, 2015.

Patel, D. D., Haynes, B. F. Cell adhesion molecules involved in intrathymic T cell development. *Semin. Immunol.*v.5(4), p.282-292, 1993.

Perera, J., Huang, H. The development and function of thymic B cells. *Cell Mol. Life Sci.*v.72(14), p.2657-2663, 2015.

Perniola, R., Musco, G. The biophysical and biochemical properties of the autoimmune regulator (AIRE) protein. *Biochim.Biophys.Acta.v.1842(2)*, p.326-337, 2014.

Peterson, P., Peltonen, L. Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J. Autoimmun.v.25*, p.49-55, 2005.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuclei.Acids. Res. v.1:29(9)*, p.e45, 2001.

Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Quachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., et al,. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med. v.15:207(2)*, p.291-297, 2010.

Ribeiro-Carvalho, M. M., Farias-de-Oliveira, D. A., Villa-Verde, D. M., Savino, W. Triiodothyronine modulates extracellular matrix mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells. *Neuroimmunomodulation.v.10(3)*, p. 142-152, 2002.

Rodewald, H. R. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol. v.26*, p.355-388, 2008.

Rossi, S. W., Kim, M. Y., Leibbrandt, A., Parnell, S. M., Jenkinson, W. E., Glanville, S. H., McConnell, F. M., Scott, H. S., Penninger, J. M., Jenkinson, E. J., Lane, P. J., Anderson, G. RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med. v11:204(6)*, p.1267-1272, 2007.

Rothenberg, E. V., Moore, J. E., Yui, M. A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat. Rev. Immunol.v.8(1)*, p.9-21, 2008.

Ruan, Q. G., Tung, K., Eisenman, D., Setiady, Y., Eckenrode, S., Yi, B., Purohit, S., Zheng, W. P., Zhang, Y., Peltonen, L., She, J. X. The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function. *J. Immunol.* v.1:178(11), p.7173-7180, 2007.

Sansom, S. N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I. C., Deadman, M. E., Heger, A., Ponting, C. P., Holländer, G. A. Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* v.24(12), p.1918-1931, 2014.

Savino, W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* V.56, p.S46-49, 2002.

Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D. A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E., Villa-Verde, D. M. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* 75(6), p.951-961, 2004.

Savino, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* v.2(6), p.e62, 2006.

Savino, W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp. Physiol.* v.92(5), p.813-7, 2007.

Savino, W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. *Neuroimmunomodulation.* V.17(3), p.142-145, 2010.

Savino, W., Mendes-da-Cruz, D. A., Golbert, D. C., Riederer, I., Cotta-de-Almeida, V. Laminin-Mediated interactions in thymocyte migration and development. *Front. Immunol.* v.17;6:579, p.1-13, 2015.

Schatz, D. G., Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* v.11(4), p.251-263, 2011.

Sillanpää, N., Magureanu, C. G., Murumägi, A., Reinikainen, A., West, A., Manninen, A., Lahti, M., Ranki, A., Saksela, K., Krohn, K., Lahesmaa, R., Peterson, P. Autoimmune regulator induced changes in the gene expression profile of human monocyte-dendritic cell-lineage. *Mol. Immunol.*v.41(12), p.1185-1198, 2004.

Singer, K. H. Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. *J. Leukoc. Biol.*v.48(4), p.367-374, 1990.

Singer, A., Adoro, S., Park, J. H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.*v.8(10), p.788-801, 2008.

Sun, L., Li, H., Luo, H., Zhao, Y. Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *Biomed.Res. Int.* v.2014, p.1-14, 2014.

Takahama, Y. Journey through the thymus:stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* v.6(2), p.127-135, 2006.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*v.76(9), p.4350-4354, 1979.

Van Ewijk, W., Shores, E. W., Singer, A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol.Today.*v.15(5), p.214-217, 1994.

Van Ewijk, W., Kawamoto, H., Germeraad, W. T., Katsura, Y. Developing thymocytes organize thymic microenvironments. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*v.251, p.125-132, 2000a.

Van Ewijk, W., Holländer, G., Terhorst, C., Wang, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development.*v.127(8), p.1583-1591, 2000b.

Van Vliet, E., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Owen, J. J., Van Ewijk, W. Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur. J. Immunol.* v.15(7), p.675-681, 1985.

Villa-Verde, D. M., Mello-Coelho, V., Lagrota-Cândido, J.M., Chammas, R., Savino, W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellularmatrix-mediated intrathymic T cell migration. *Braz J Med Biol Res.* v.28(8), p.907-912, 1995.

Virtanen, I., Gullberg, D., Rissanen, J., Kivilaakso, E., Kiviluoto, T., Laitinen, L. A., et al. Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp. Cell Res.* 15;257(2), p.298-309, 2000.

Wettenhall, J. M., Smyth, G. K. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics.* v.12:20(18), p.3705-3706, 2004.

Wu, L., Shortman, K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin.Immunol.* v.17(4), p.304-312, 2005.

Xing, Y., Hogquist, K. A. Isolation, identification, and purification of murine thymic epithelial cells. *J. Vis. Exp.* v.8(90), p.e51780, 2014.

Yamaguchi, Y., Takayanagi, A., Chen, J., Sakai, K., Kudoh, J., Shimizu, N. Mouse thymic epithelial cell lines expressing Aire and peripheral tissue-specific antigens reproduce in vitro negative selection of T cells. *Exp. Cell. Res.* v.15:317(14), p.2019-2030, 2011.

Yamaguchi, Y., Kudoh, J., Yoshida, T., Shimizu, N. In vitro co-culture systems for studying molecular basis of cellular interactions between Aire-expressing medullary thymic epithelial cells and fresh thymocytes. *Biol. Open.* v.17:3(11), p.1071-1082, 2014.

Yang, S., Bansal, K., Lopes, J., Benoist, C., Mathis, D. Aire's plant homeodomain (PHD)-2 is critical for induction of immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.29:110(5), p.1833-1838, 2013.

Yoshida, H., Bansal, K., Schaefer, U., Chapman, T., Rioja, I., Proekt, I., Anderson, M. S., Prinjha, R. K., Tarakhovsky, A., Benoist, C., Mathis, D. Brd4 bridges the transcriptional regulators, Aire and P-TEFb, to promote elongation of peripheral-tissue antigen transcripts in thymic stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.11:112(32), p.E4448-4457, 2015.

Zook, E. C., Krishack, P. A., Zhang, S., Zeleznik-Le, N. J., Firulli, A. B., Witte, P. L., Le, P. T. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood.* v.24:118(22), p.5723-5731, 2011.

Apêndices

APÊNDICE A - Genes diferencialmente expressos entre as células mTEC 3-10 controle e as que tiveram o gene Aire silenciado por meio de RNAi

Genes induzidos	Fold change (log)
A130042O14Rik	-1.00974920245207
A130088B03Rik	-0.63871925431399
A230061C15Rik	-1.19888534945236
A230101C19Rik	0.750785725195884
A230107N01Rik	-0.822169974234474
A2m	-0.704234177255131
A330023F24Rik	-0.590229043493061
A330070K13Rik	-0.953484869753108
A330072L02Rik	-0.884764949560542
A430033K04Rik	-0.607480729757792
A530001N23Rik	-1.45888929246319
A530013C23Rik	0.842846732145627
A530065N20Rik	-0.855867830686816
A630026N12Rik	-0.895844025619896
A630052C17Rik	-0.957626801864554
A630076J17Rik	-1.36956457994985
A630081D01Rik	-0.851010103786512
A830054O07Rik	-0.733885564523517
A930006K02Rik	-0.7118076894822
A930007A09Rik	-0.751529653703887
A930026B05Rik	-0.60945591060374
A930028N01Rik	-0.756754940078275
A930029G22Rik	0.679963985099326
A930033H14Rik	-0.733814033917358
AA467197	0.839760975582777
AA536887	-0.969154957566741
AA667203	1.05432518286537
AA691150	-0.887241759555006
AA986695	-0.639319244588481
Aatk	-0.838428491941703
Abcc12	-0.609312309624594
Acacb	-1.03056405966342
Acer1	-0.627588177761807
Acot1	-0.66766409844324
Acox1	-0.752743027083309
Acsbg1	0.846887562687236
Acss2	-0.702273377079043
Acta1	-0.595884870701115
Actg2	1.79710029580381
Actrt2	0.928034931527767
Adam24	0.593858417496712

Genes inducidos	Fold change (log)
Adamts15	0.909510860293029
Adamts20	2.13940323558689
Adamts7	-0.733211166767068
Adora2b	-0.814071300736508
Adrb1	0.841879759176004
Aebp1	-0.878095478312067
AF138742	-0.692554260793985
AF251705	-0.671120127743638
Afp	1.16499240818088
AI182371	-0.750688072883356
AI662245	-0.617615279903589
AI847159	-0.648223800788173
AI849053	-0.659204312582376
Aif1l	0.604857965205944
AK020212	-0.654022221189162
AK037412	-0.793475195276272
AK037423	-0.706581713058825
AK038006	-0.946223554817553
AK039631	-0.724033184151846
AK039779	5.83349435052872
AK040646	-0.81586242834886
AK042566	-1.05745760403194
AK042906	-0.842210464119975
AK046703	-1.66544863921857
AK047219	-0.724011704048426
AK049642	-1.12453127725004
AK053437	-0.839209484392523
AK054031	-0.715432524424468
AK080325	-0.668489563358542
AK081938	-0.771841419387693
AK087124	-1.07201302168994
AK132421	-0.717729582045839
AK136460	0.956641932943475
AK136853	-0.645543458130608
AK137931	-0.81176520680356
AK138827	-0.750031331227909
AK139292	-0.683638319603089
AK143337	1.32922158844555
AK144919	0.6189549993971
AK157552	-1.04754828981097
AK170517	-0.737087758189006
Akr1b7	-0.823228297947704
Akr1c20	1.25922509213271
AL117821	-0.610022239608655
Aldh3b2	-0.738296904006436

Genes induzidos	Fold change (log)
Alpl	-0.94629003975537
Als2cr12	0.711439720615795
Ankk1	-1.00834531132757
Ankrd2	-0.67347374857171
Ankrd7	2.48303090169314
Ano3	1.47245971428021
Apln	0.764566978481816
Apoc1	-0.808589893016991
Areg	0.798751199301408
Arhgap18	-0.791499303608378
Arl11	1.01561592934937
Arl4aos	2.66419422083502
Arsj	-0.846600866054921
Art3	0.599403992607923
Art5	-0.615070341077282
Asic5	-0.691949457418032
Astl	0.987205781111165
Atg9a	-0.796517524705322
Atp1a2	-0.739843882193256
Atp2b3	-1.20600725384554
Atp6v0a4	-0.645705036939688
Atp6v0d2	0.851596772089763
AU015558	1.35020084529409
AU015836	0.740132819364568
AU017193	-0.752238235405452
AU019202	-0.879780481683847
AU019990	-1.06909772566704
AU042410	-0.903290535274858
Aurkc	-0.836442727956356
Avpr1b	5.12831855193931
AY074887	-0.647388648537674
B130019D13Rik	-0.603019551583544
B130055M24Rik	-0.743995065877027
B230303O12Rik	-0.686632170828494
B430203I24Rik	-0.923875579057746
B430316J06Rik	-0.705073274461288
B430319H21Rik	-0.841957528872932
BB157357	-0.897474564234658
BB163080	-0.643830388759879
BB166591	-0.622243607879224
BB287469	-0.799830821373566
BB325154	-0.609477132515677
Bbs2	-0.616335428883822
BC016548	0.855801864376636
BC018242	-0.972743610927553

Genes induzidos	Fold change (log)
BC028556	-0.783478130795958
BC035044	-0.627372841251823
BC037156	0.767061649166124
BC048373	0.667572751070454
BC048679	-0.665598646967769
BC055308	-0.828000179909973
BC068281	-0.688251980411185
Bcas3os2	-1.2546235540525
Bcl2l10	-0.744873709788909
Bend4	1.0092339404545
BI158793	1.01104812033673
Bicc1	-1.57806529940909
Bpifb4	0.655699857137678
C030005K06Rik	-0.748767369096545
C130051F05Rik	-1.01315952887517
C130057D09Rik	-0.658167457293303
C130073F10Rik	0.640172063582916
C1qc	-0.639616190854444
C2	-0.624187669176227
C230012O17Rik	-0.740103009412503
C230094B09Rik	-0.702450300267653
C230096K16Rik	-0.607203793781073
C2cd4d	1.83520137363921
C330013F16Rik	-0.782370752885343
C430002E04Rik	-1.09862442746242
C430049E01Rik	-0.605719296026971
C530008M17Rik	-0.823410274178169
C530014P21Rik	-0.797125747747792
C730002L08Rik	-0.770872410564973
C79798	1.00738342973961
C80360	0.8372069365352
C87125	-0.988458783806434
C920006O11Rik	-0.670723935915202
Cacna2d4	0.622740247477807
Cadps2	-0.715722853830197
Calcb	-0.707828184410663
Camk1g	0.624709739258419
Capn13	1.07498926294612
Car12	-1.14512799752282
CB194565	0.825725795847237
Ccbe1	0.684271181469448
Ccdc105	2.51412435625272
Ccdc121	1.23532609609137
Ccdc150	0.852745185674625
Ccdc175	-0.706678428821715

Genes inducidos	Fold change (log)
Ccdc177	-1.42118000519442
Ccdc7	-1.04338368111556
Ccl3	-0.822823994331788
Ccm2l	-0.615005949616251
Ccng2	-0.756762036301689
Cd200	0.88900866548439
Cd38	0.715920823523017
Cd3eap	0.739453578879212
Cd55	-0.650863798663756
Cd59a	-0.725739596351016
Cd80	-0.637208383738932
CD808055	0.825694443224535
Cdh7	-0.667408807369491
Ceacam14	-1.23151336522098
Ceacam2	-0.975680494333677
Cebpd	-0.842380597417781
Celf5	-0.914402278332602
Cercam	-0.610840682344512
Ces1h	1.2121665537828
CF550758	1.37635159642393
Cfh	-0.963853855527631
Chaf1b	0.716375033513183
Chil4	0.870749330503492
Chil6	-1.23883323841784
Chl1	-0.871345502729175
Chn2	-0.699559229753186
Chrm5	-1.14434084503764
Ciart	0.710704613555823
Cib3	-1.61010307320784
Ciita	1.73163890709608
CJ238986	0.941266491746457
CK626258	-0.691611693499054
Clasp2	-0.69757570467796
Cldnd2	-0.675092267803767
Clec3a	-1.44625410085705
Clec4b1	-0.700743629528922
Clec4e	-0.78698886096196
Clhc1	0.676784447180051
Clic5	-0.985733912396354
Cmb1	-1.0756204565846
Cmpk2	0.733894796910667
Cmya5	-0.831022935788298
CN835660	-0.638571222119163
Cnnm1	-1.14880820852699
Cntnap1	0.891902173608097

Genes induzidos	Fold change (log)
CO811977	1.36700399876302
Col2a1	-0.590115018461201
Cpa4	-0.704515261061156
Crispld2	-0.870397144657013
Cryba1	-0.654919589207434
Csad	-0.657565073908517
Csrnp3	0.837266038581404
Cthrc1	1.9826798654906
Ctnnal1	0.812834325993968
Cxcl1	-0.985915721535001
Cym	-1.40689025487357
Cyp11b1	1.06828383500992
Cyp24a1	-0.593631777079739
Cyp26b1	-0.658718579020368
Cyp2d26	-0.624384546144546
Cyp2d37-ps	-0.60069286928492
Cyp2f2	-0.855344648029856
Cyp4a32	0.732553775443964
Cyp7b1	-0.685265550897674
D10Ert755e	-1.16937479565041
D11Ert80e	-0.685736895878732
D130061D10Rik	-0.635890313195635
D14Ert670e	-0.759272223149914
D230014I24Rik	-0.663411982312226
D230034L24Rik	-0.650155314056971
D230040A04Rik	-0.617392525659198
D230040J21Rik	-0.661683683898008
D230044B12Rik	-0.877504663146218
D230044P21Rik	-1.04935564361012
D2Ert295e	-0.701058343973249
D2Ert640e	-0.761313406430821
D330022H12Rik	-0.70747828306078
D430018E03Rik	-0.64277646031127
D4Ert681e	-0.822939279265704
D5Ert605e	-0.756952354042255
D630028G08Rik	1.29952677916775
D730003K21Rik	1.60602329032893
D8Ert158e	-0.740248125164854
D930021N14	-0.78605023709236
D930030O05Rik	-0.93428045477919
D9Wsu90e	-0.735174919633899
Dbp	-0.62964213426681
Dcll2	-0.757539151969373
Dctd	0.844496501537432
Defb34	-0.879715637236651

Genes induzidos	Fold change (log)
Defb45	0.641325867035897
Defb46	0.609490070108842
Dennd2a	-1.16812210226598
Dfnb59	-0.855376871647178
Dhdh	-1.42991305484177
Dhrs11	1.33610572816395
Dhrs3	-1.64975297253406
Dkc1	0.69360504870119
Dkk4	0.949535365020168
Dmbt1	-0.632361095135023
Dnah7a	-0.722731270701738
Dnah7b	-0.799944359922082
Dpep3	-0.842878399787486
Dppa4	-1.05453691196633
Dpy19l2	1.4642426658057
Dpysl2	-0.613430836930675
Drd2	1.45913295532528
Dscaml1	2.0041350740068
Dscc1	0.686365897370886
Dsty	-0.664754722320639
Dtx1	-0.800341881092822
Duoxa1	-0.733109006011647
Dusp15	1.81598668604498
Dusp2	0.996029356720252
DXBay18	0.606530725358548
Dydc2	1.11262437503135
Dyrk4	0.962045985699385
E130012A19Rik	0.610088214797619
E130104P22Rik	-0.794151442994202
E130202H07Rik	-0.754598876609615
E230008O15Rik	-0.728115344790679
E330013P08Rik	-0.881098964796619
E330021D16Rik	-1.04505715826324
E530001F21Rik	-0.857513286151432
Ear7	-0.829299170163272
Ece2	1.12049946009235
Eef1e1	0.68180860008637
Efcab10	-0.937657740619322
Efcab11	0.600641039865232
Efcab12	-0.7105252990089
Efcc1	-0.676553767173033
Efhd1	-0.618763610643368
Egr2	0.654507019436576
Eif3j2	0.865781894953743
Elavl3	-0.653372077280846

Genes inducidos	Fold change (log)
Emilin2	-0.648700194146731
Emilin3	-0.753488274622191
Enam	-0.678112024142981
Enpp4	-0.621206980530829
ENSMUST00000021520	0.621212487439412
ENSMUST00000029552	-0.651210625936027
ENSMUST00000046116	1.19281974982341
ENSMUST00000048921	-0.627077030021803
ENSMUST00000050829	-0.624137810035596
ENSMUST00000054333	-0.60169893318401
ENSMUST00000054653	-0.780746788435864
ENSMUST00000056401	-0.804843559629969
ENSMUST00000057543	-0.862405879310258
ENSMUST00000060761	1.96032041608809
ENSMUST00000062127	-1.0432885764432
ENSMUST00000070420	-0.594554921361038
ENSMUST00000076071	-0.713822562198509
ENSMUST00000077067	-0.884295643105503
ENSMUST00000078701	0.643935606961198
ENSMUST00000086909	1.21952369233729
ENSMUST00000089689	0.593241319565415
ENSMUST00000090166	-0.751079271804039
ENSMUST00000090702	-1.15849199758313
ENSMUST00000093494	1.72048252847537
ENSMUST00000093768	-0.89275968163868
ENSMUST00000094969	-0.808746625553888
ENSMUST00000098110	-0.671519612511762
ENSMUST00000098384	-0.668042715962915
ENSMUST00000098571	-0.594926842861774
ENSMUST00000098589	-0.682628688396485
ENSMUST00000098634	1.52103126320588
ENSMUST00000098935	-1.00140575132339
ENSMUST00000101371	-0.640352642178797
ENSMUST00000103279	-0.767847302311823
ENSMUST00000103311	-0.73203999350434
ENSMUST00000103328	-0.755003598518512
ENSMUST00000103345	-0.6276311551983
ENSMUST00000103351	-0.790303907251764
ENSMUST00000103378	-0.69844513787976
ENSMUST00000103391	-0.690402359075385
ENSMUST00000103392	-1.16774056884946
ENSMUST00000103399	0.605291323617981
ENSMUST00000103410	-0.686636081227997
ENSMUST00000103426	-0.765360149227083
ENSMUST00000103443	-0.815236277955222

Genes induzidos	Fold change (log)
ENSMUST00000103473	-0.879206576229954
ENSMUST00000103476	1.54242467335701
ENSMUST00000103518	-0.732524279500103
ENSMUST00000103526	-0.915061928015781
ENSMUST00000103534	-0.655008783319357
ENSMUST00000103535	-1.00580051965434
ENSMUST00000103548	-0.881709099249979
ENSMUST00000103550	-0.696449003006075
ENSMUST00000103608	-0.847335058629971
ENSMUST00000103613	0.788646177234428
ENSMUST00000103634	0.803667831707793
ENSMUST00000103637	1.60549485374326
ENSMUST00000103648	-0.60885693029805
ENSMUST00000104964	1.71428081031386
ENSMUST00000110064	-0.85745337745551
ENSMUST00000137955	1.129965687829
ENSMUST00000160058	0.929761850071507
ENSMUST00000161308	-0.674098013866923
ENSMUST00000163627	1.16578283094534
ENSMUST00000164410	0.873588909781883
ENSMUST00000165661	-1.00600356813636
ENSMUST00000166373	0.819967230810448
ENSMUST00000170551	-0.840733825239312
ENSMUST00000171942	-0.874747806954517
ENSMUST00000176382	-0.622798501160103
ENSMUST00000180100	0.811888395116064
ENSMUST00000180541	-0.849889982231351
ENSMUST00000181588	-0.857411830787917
ENSMUST00000182901	0.702225710944325
Epsti1	0.670069202586292
Eras	-0.807449197478957
Etv4	1.34257130678085
Etv5	0.626438018421224
Exd1	-0.893608585480064
Exo1	0.77861775863537
F5	0.741373798133957
F830014O18Rik	-1.14582286077765
F8a	-0.696102504547844
F9	0.75585568699624
Fa2h	-0.614455440227719
Fabp3	-0.854074154815858
Fam154a	-1.21228353849336
Fam169a	2.37156791926439
Fam174b	-0.940535964923397
Fam184a	-0.754694106185865

Genes induzidos	Fold change (log)
Fam187a	-2.2835182228873
Fam196b	-1.12143487602788
Fam214a	-0.646954440820803
Fam216b	0.880604225218986
Fam229b	-0.793965930064596
Fam26d	1.0276404449145
Fam65b	-0.592309839608182
Far2	-0.630058280661029
Fbxw26	-0.910669486329451
Fcamr	-0.595045018110598
Fer1l4	-0.6539516596475
Ffar2	0.604534082649336
Fgf21	0.634169283849173
Fhod3	-0.942446322186532
Figl1	0.613295638277158
Flrt1	-0.60095402784575
Flt4	-1.01890306194585
Fmn2	-0.612580905704542
Foxb2	2.25564660380443
Foxh1	0.661843371294309
Foxi3	0.876003505434735
Fras1	-1.05530562119736
Frem3	-0.889368987958298
Frk	-0.605696453577997
Fsbp	-0.866111201034306
Fscn3	1.19383055945362
Fut2	-0.603145009053179
G530011O06Rik	-1.39174515873783
G6b	-0.713670407914115
Gabra2	-0.591150650188824
Gabra6	-0.726347168243005
Gal3st2	-0.712581755078631
Galnt5	-0.716203183448295
Galnt6	-0.595529140499929
Galntl6	-1.71596489751243
Galr2	1.376125650534
Ganc	-0.767744959039259
Gbp3	0.729664217184501
Gclc	1.63862176262036
Ggt5	-0.805902471933511
Gimap1os	-0.646476274697357
Gins1	0.602305975171019
Gjb2	1.95487213993984
Gkn2	-0.766228981305426
Glpr1l2	1.49143441748825

Genes inducidos	Fold change (log)
Gm10033	-0.960521793546933
Gm10204	-0.657536115490254
Gm10209	-0.766632893463626
Gm10354	-0.672954718277413
Gm10372	-0.727271646082503
Gm1043	-0.650049184702539
Gm10436	-0.600667375208584
Gm1045	0.635993259018776
Gm10561	-0.645322137579885
Gm10603	-0.600408109258911
Gm10639	0.737743897189565
Gm10673	0.606876495838788
Gm10687	-0.645694966730217
Gm10739	1.31460028000927
Gm10782	-0.904484006151606
Gm10787	2.83363698158344
Gm10814	1.00641962595976
Gm10860	-0.690653659928409
Gm10871	-1.23346112690952
Gm10910	-0.704690145658885
Gm11735	-0.922407564688285
Gm12	-0.671610183051158
Gm12371	-1.27319514194746
Gm12703	-1.17953623257883
Gm12758	-0.638881863515141
Gm12789	-0.968761664417895
Gm12887	-1.2114075478337
Gm12945	2.38594086688413
Gm13125	-0.616992214283854
Gm13570	-0.810876304139057
Gm13769	1.11539763193283
Gm14446	0.769713591976943
Gm14548	-0.687265133161628
Gm14703	-0.95143790756758
Gm15319	-1.05607452947675
Gm15482	-0.666289000805308
Gm1549	-0.609605309281335
Gm15520	-0.657880064582355
Gm16340	0.591789896130926
Gm16367	-0.791683482383849
Gm16495	2.59577699324328
Gm16523	-0.984669916816019
Gm166	-0.616629013879103
Gm17739	-1.12956437988429
Gm17821	-1.43750197491497

Genes induzidos	Fold change (log)
Gm2042	-0.66098008840912
Gm20554	-0.627744926771698
Gm20558	-0.844508964120037
Gm20837	0.751538609041723
Gm21292	1.6539356114721
Gm21319	-0.738071449630573
Gm21404	-0.609619930984119
Gm2590	-0.808585483579414
Gm2984	-1.36208846583133
Gm3081	-0.641312824357867
Gm3300	-0.691120894843189
Gm3364	-1.21007552230358
Gm3367	-1.27812205578806
Gm3414	-0.590256920283856
Gm3458	-0.827899917917713
Gm3527	1.17751445077492
Gm3718	-0.72957048342212
Gm3776	0.677640956041667
Gm3877	-0.83070495734233
Gm4022	1.05437666369261
Gm4123	-0.951875989294428
Gm4419	-0.705227929360172
Gm4470	1.00585221937919
Gm4598	0.600760582275613
Gm5	0.868207954556562
Gm5039	0.604632403291993
Gm5115	-0.909956457270213
Gm5118	-0.657369982044743
Gm5122	1.50963177452118
Gm5134	0.97183561134745
Gm5141	-0.894637604567654
Gm5166	0.777009103701275
Gm5177	-0.793433031501563
Gm5447	-1.04541414510251
Gm5463	-0.641552427325588
Gm5475	-1.26626705460066
Gm5524	-0.834922583175787
Gm567	-0.776078672736646
Gm595	-0.625448394579267
Gm6402	-1.0935942922716
Gm648	-0.768492836881169
Gm694	0.919856292962956
Gm6980	0.674933690275958
Gm7111	-0.81609205417314
Gm7134	-0.811430166711835

Genes induzidos	Fold change (log)
Gm7420	-0.948108774714547
Gm7696	-0.60264341548338
Gm7715	-1.23143841141866
Gm7759	-0.908803498006982
Gm7904	-0.735043078779683
Gm7968	-0.954968817648298
Gm8300	-0.907288178978895
Gm8700	1.77737335742439
Gm8702	-0.612808520506507
Gm9558	-0.767394629702528
Gm9694	-0.842514124964183
Gm9706	0.768798358530107
Gm9752	0.815206051526407
Gm9777	-0.755524833354723
Gm9869	-0.836047668661035
Gm9919	1.5179904312235
Gm9926	-1.24386401826413
Gm9959	-0.713134916553365
Gnb4	-1.03181798413789
Gng11	0.946591051944832
Gnl3	0.732792153367285
Gnrhr	0.991724311789308
Golt1a	1.54728737236362
Gpatch4	0.631835684131975
Gpcpd1	-0.649644374257322
Gpr101	-0.817214436389601
Gpr156	-0.798762625869312
Gpr20	-0.775726485851709
Gpr26	-0.60689644061722
Gpr52	-0.738189667931591
Gpr84	-0.630081960254648
Grb10	-0.939833695538363
Gria4	-0.864915633832132
Grin3a	0.618942658401712
Grip2	-0.858658770598634
Gsdma2	-0.967909094299044
Gsta2	0.847497392558314
Gucy2d	0.712116146128057
H1fx	-0.651414822277216
H2afy3	-0.70388507215159
H2-Eb2	0.959392669798238
H2-M9	-0.624080519027242
Habp2	-0.606979717542318
Hand1	1.55201848552146
Hapln1	-0.943473596434385

Genes induzidos	Fold change (log)
Hells	0.908562204813744
Hgd	1.37296896972079
Hhatl	0.838858017696839
Hhip	-0.76735781270024
Hhipl1	-0.704331257752793
Hist1h1d	-0.930808579562186
Hist2h2be	-0.676159854766839
Hmga2	0.737313825938211
Hmox1	1.72693059536871
Hnf4aos	0.903106543975505
Hoxa5	-0.664333517364597
Hoxb5os	-0.631013894702633
Hoxc10	0.74786851886685
Hp	-0.691805014511646
Hrh2	-0.910397959579728
Hrnr	1.5304049414194
Hsd17b1	0.958531836130823
Hsd3b3	-0.833787965677796
Hsd3b4	-1.05485723537764
Hsf2bp	-0.659517845527867
Hspa12a	-0.982496701888229
Htr2a	-0.921799068623559
Htr2c	-0.64939996699493
Htra1	0.71911196574462
Hyal3	-0.688590921007771
I830012O16Rik	0.850186617464054
Icam4	-0.65439160095526
Ifi47	0.616420692378728
Ifit1	0.621123940776087
Ifit3	0.893967841492856
Ifna12	1.10960209571565
Ifna4	1.70039113221337
Ifrd2	0.664252291794611
Igfbp6	-1.46735191068694
Igkv4-53	0.882322292764154
Il17a	2.18274709528803
Il19	-0.591142932661448
Il24	0.660394058622665
Il2ra	-0.775820166271474
Il33	-1.57491684372593
Insrr	-0.606348695311423
Iqcf3	-0.597822638065169
Iqsec3	1.78479066570597
Irf4	-0.610473739152464
Irx1	-1.08786460563316

Genes induzidos	Fold change (log)
Isg15	0.620533369424255
Islr	-1.35090925821596
Isoc2b	-0.607994225081516
Itgad	-0.609576572460535
Kcnh6	-0.858361890477591
Kcnh8	-1.18292867396336
Kcnj16	-0.898441780623853
Kcnj8	-1.03252737000026
Kcnq1	-0.849872839242082
Kcnu1	-0.859660562732821
Kif1a	1.36319131842511
Kif27	-1.01384945449102
Kiss1	-0.654189888780367
Klf15	1.36687845351039
Klhl41	-0.961116565460745
Klk1b7-ps	-0.599103199262094
Klrc3	0.673048793688044
Kmt2a	-0.590176552014118
Kng1	-0.641125745380448
Kpna7	-1.19201378858806
Krt15	-0.763542720040896
Krt28	1.11992996793361
Krt79	0.7999095472926
Krt84	-0.637459291206578
Lama1	-0.84295768692922
Lbp	-0.870118916811792
Lce1g	0.692252900238286
Lce1h	0.631470254811099
Lgals12	-0.599498616161009
Lgr5	-1.43497875304851
Lhx8	-1.15796321437957
Limch1	-0.693118271737358
Lingo4	-0.723309011276675
Lmod1	2.27037174247544
LOC100036540	-0.654481798082447
LOC102632036	0.737203172468625
LOC102632362	1.05663290885836
LOC102633118	-0.679975654323508
LOC102633662	0.603977118889972
LOC102634429	0.629062330895911
LOC102634430	-1.4549585579213
LOC102635638	-0.938834932835312
LOC102636451	-1.11641269227188
LOC102638165	0.966949203292591
LOC102638466	-0.736281303793644

Genes induzidos	Fold change (log)
LOC102639363	-0.761672924941763
LOC102639702	-0.592957528359165
LOC102641097	-0.751474937748933
LOC102642111	0.81743738977535
LOC102642272	2.30719114431841
LOC102642606	0.790562940835219
LOC545966	-0.656276240873269
LOC552902	-0.661610476195698
LOC552907	-0.689820992011486
LOC553096	-0.747416399976828
LOC628110	-0.593303204988484
Lpcat4	-0.782666632514334
Lpin1	-0.760539171615937
Lrrc2	0.596847022564219
Lrrc4b	-0.678172902788775
Lrrc8e	-0.653760596255424
Lrrn4	0.681005593902929
Ly6a	0.625905965120181
Ly6c1	0.639064219092203
Ly6f	0.950520149739146
Ly6g	0.638664654665718
Lyz1	-0.672192516206618
Mab21l1	0.683735305291539
Man1c1	-0.643410141680528
Map2k6	-0.691418122779053
Map3k19	-0.789682871678431
Mars2	1.08509462256243
Mcm3	0.776403348523836
Mcm5	0.754086484053936
Mcoln2	-0.66952154526084
Mcpt8	0.59399430854563
Mcpt9	0.667727113244089
Mctp1	-0.9716255561698
Mdfi	-1.11914026904709
Mecom	-0.968039507035668
Mef2b	1.13912609837034
Mef2c	-0.640452172287306
Megf9	-0.596677250071663
Mei4	-1.08926146907614
Mesp1	2.05680346314529
Mettl7b	1.16866697507767
Mgat3	-1.15156038680933
Mgp	-0.786826679283793
Mlip	0.634637236853127
Mikl	1.02083749788304

Genes induzidos	Fold change (log)
Mmp12	-0.684128705658235
Mmp13	0.614850172937714
Mmp1a	-0.594660867235505
Mn1	1.11669338196983
Mphosph9	-0.81774994991924
Mpped2	-0.737914998115928
Ms4a1	-0.642322123389647
Ms4a10	-0.974405222999112
Ms4a2	2.0820267095143
Ms4a7	-0.760788782630028
Mst1r	1.04261165315168
Mterfd1	0.692227032566056
Mtus2	-1.24831222023587
Muc2	0.663532739789597
Mug1	-0.916079312402069
Mug2	-0.676160509616803
Murc	-0.631118252931458
Mx2	0.830915566506727
Mybbp1a	0.659502186134187
Myom3	-1.21671818623365
Nacad	-1.0306799049784
Ncald	-1.52773728180901
Ncf2	-0.631315901068726
Ncr1	1.13461821831105
Neat1	-0.730528037133965
Necab2	0.828302724110206
Negr1	0.70246604652749
Neur12	-0.692198556911988
Neurog1	-0.713058520668917
Neurog2	-1.1007651542645
Neurog3	-0.953288749293986
Nfasc	-0.960409063453591
Ngf	0.865616707736553
Nid1	-0.654897846664333
Nlrc5	0.658685974901996
Nlrp4a	-1.05301349899502
Nmi	0.612503685707203
Nms	0.966751442165722
Nod2	-1.01127139039164
Nop2	0.689618570268667
Nop56	0.829131793289536
Noto	-1.48256526122366
Noxred1	0.997663961972649
NP064216	0.680194343368098
Nphp3	-0.683905070567503

Genes induzidos	Fold change (log)
Nphp4	-0.607127993244301
Nps	0.841806353856316
Nr0b2	-0.703806277370679
Nr5a2	-0.820959917589573
Nrap	0.80348006240119
Nrxn1	-0.993463148420596
Nxph3	0.600852317061613
Oas3	0.796276326946959
Oca2	1.10263213725012
Ocstamp	-0.704342477029396
Olah	-0.765263936358853
Olfr10	-0.656200703574864
Olfr1024	-0.942594774394856
Olfr104-ps	-0.972611726227099
Olfr1061	-0.985761862231041
Olfr1095	-0.803743695693651
Olfr11	-0.668340040500772
Olfr1107	1.15293345388558
Olfr1124	0.647313005925053
Olfr1180	0.755810054433592
Olfr1198	1.19786668873322
Olfr1259	-0.792760742669476
Olfr1260	1.12082220693987
Olfr1287	1.05336471403312
Olfr1305	-0.730197618743705
Olfr131	-0.670288774428945
Olfr135	0.731399909025027
Olfr1352	4.19203164611043
Olfr1402	0.791960204070209
Olfr1417	1.04373228282655
Olfr1431	1.58516590285431
Olfr1449	0.823595711241367
Olfr157	-1.46921521119827
Olfr172	0.923083919799237
Olfr198	-0.831817673271265
Olfr20	-1.44947050317965
Olfr205	0.982226252412927
Olfr24	0.890186858515793
Olfr25	-0.833934696768665
Olfr251	-0.801073000373173
Olfr266	0.651037063897295
Olfr284	0.839299734277048
Olfr312	-0.643188231059471
Olfr316	-0.956243270777028
Olfr384	1.95491955023203

Genes inducidos	Fold change (log)
Olfr394	-0.605549440582387
Olfr432	0.940434710343458
Olfr470	-0.59896951457152
Olfr481	-1.00826192660916
Olfr49	-1.23507348940289
Olfr495	0.978086280967448
Olfr52	0.752688891133594
Olfr538	-0.707229822303564
Olfr551	-0.598203138428671
Olfr554	0.727672365359912
Olfr577	1.49022550658041
Olfr652	0.867756276096374
Olfr661	1.65796881262489
Olfr666	1.22331874344688
Olfr699	0.965339729283854
Olfr763	-1.17983209066902
Olfr782	1.56889677315123
Olfr786	1.22733450543827
Olfr799	-0.627965434636201
Olfr815	1.04047672618991
Olfr829	-0.815093901383706
Olfr898	-1.24047633455348
Olfr90	0.848316561327277
Olfr910	-0.866451802697819
Olfr92	-1.5001956951077
Olfr935	1.91667174041588
Olfr94	0.888470804860248
Olr1	-1.0834437780095
Ooep	0.711521800272945
Ophn1	-0.620488300362941
Osgin1	0.777097260734292
Otoa	2.20673207419394
Pabpn1l	-1.01033974715548
Pax6	2.27716943549047
Pcdh10	0.845536422483471
Pcdh17	-0.763390057349762
Pcdh9	1.55868291891958
Pcolce2	0.825166997738728
Pdc	-1.02941203253816
Pde6a	-0.826649728904631
Pde9a	-0.938469688961506
Pdzd3	-0.731985787779452
Pea15b	-0.870506320053812
Peg10	0.692188321065427
Pf4	-0.808901435166764

Genes induzidos	Fold change (log)
Pgpep1l	-0.847562183143764
Phf11a	1.03419750368639
Phf11d	0.744445584972659
Phf3	0.650979032340736
Pigb	-0.625360291340066
Pik3cg	-0.594463084457908
Pim1	-0.831563320760795
Pip5k1b	-0.619589232172981
Pira7	-0.639927531776596
Piwi2	0.816659555132105
Pla2g10	-0.861699071978746
Pla2g2d	-0.617105703845123
Plat	-0.767508432698928
Plcx3	-1.08489571133651
Pld5	-0.713317763113801
Plekhg1	-0.828090152076268
Plekhs1	-0.709402606633635
Pnlip	-0.640409337903031
Pnma2	-0.878706105862857
Pola1	0.738434989270822
Pole2	0.721332671533833
Postn	-1.55944659013149
Pou5f2	-0.746032531051963
Pou6f2	-0.736559461038587
Pp2d1	0.967706777620834
Ppa1	0.70396403687368
Ppap2b	-0.872500585412088
Ppat	0.617304096474101
Ppef2	-0.730225498337113
Ppfibp2	-0.70856281122273
Ppifos	0.633163792357421
Ppil1	0.874302637368425
Ppnr	-0.890491270679144
Pramef12os	-0.816723472321636
Prl2c1	1.3737709252187
Prl2c5	1.40310599955278
Prl3d2	0.613617327373412
Prss40	1.03499777764203
Prss56	1.04937488987159
Psap1l	-0.858859689864021
Psg16	0.748923415166312
Psg20	0.826140650618802
Psg21	1.90345766600402
Psg28	0.722661852634028
Ptch2	0.787408645601429

Genes induzidos	Fold change (log)
Ptpru	-1.4260773981432
Rab27a	-0.677664693761442
Rab3il1	-0.707404441393697
Rasal1	-0.690655524937125
Rasgrp4	0.721199425259107
Rbfox3	1.08380297594068
Redrum	-1.01560991408559
Renbp	-0.728289308508616
Retnla	-0.916289178586976
Rgn	-0.766172143133099
Rhox3a	-0.688010594416669
Ric3	-0.894769725337508
Riiad1	-0.835292117414398
Rnase10	1.11520909478044
Rnase13	-0.678115215850456
Rnf32	-0.803016383773432
Rp1	1.20279765046356
Rrad	-0.735762143214687
Rrp12	0.686298862418145
Rsad2	0.643864117701845
Rsg1	-0.680298185731209
Rtn1	-0.623467262769785
Rtp1	-1.45765476340645
Rxfp1	-0.773601220592972
Saa2	-0.630248979081963
Sag	-0.602643880953742
Scarf1	-0.769706274934879
Scgb2b15	0.594889999620301
Scin	-0.624718923411092
Scn1b	-0.899544483233631
Sct1	0.648582064718286
Scube1	-0.733330008316421
Sec14l4	-1.24535297393795
Sel1l2	-0.62561465192602
Sema3b	-0.61280452018211
Senp6	-0.664349554743275
Serpina3b	-0.723168632249616
Serpina7	-0.624324018320366
Serpinb3a	-0.988668111339676
Serpind1	1.52311680800949
Sfi1	-0.662708499199722
Sftpd	-0.690302755413413
Sh2d1b1	0.996814249658679
Sh2d5	0.597546331786267
Shbg	-0.858644266104711

Genes induzidos	Fold change (log)
Shc2	-0.726624071010255
Shisa7	-0.762450393834781
Shpk	-0.668881660591714
Sipa1l2	-0.639014715961704
Skap1	-0.687602178345852
Skint2	-0.959427897390812
Skint5	-0.750818286490284
Skor1	-1.08959653683598
Slc10a5	-0.761157481041763
Slc11a1	-0.655359701932281
Slc15a3	-0.676838387446445
Slc1a6	-0.667158481221349
Slc22a30	-0.877433203714905
Slc22a7	1.01697866666803
Slc23a1	-1.26249678513766
Slc24a1	0.978618929451257
Slc24a3	-0.657152849393242
Slc25a2	-0.593729461255869
Slc25a40	-0.69145519571634
Slc25a53	-0.688999362723042
Slc26a3	-1.40607128117391
Slc29a2	1.06929719868948
Slc2a6	-0.823719579669434
Slc30a10	1.39543015986216
Slc30a3	-0.657120512993155
Slc35f3	-0.777577862083163
Slc36a2	-1.49655403377422
Slc39a5	-0.933899851749107
Slc39a8	-0.705516362642577
Slc46a2	-0.81913797093229
Slc4a7	-0.651903350478031
Slc51a	-1.13899067769644
Slc5a4a	0.621677526126729
Slc6a4	-0.626800514859204
Slc6a7	-0.62548198209479
Slc7a11	0.967612046140321
Slco5a1	-0.744399981112132
Slit2	-0.766396882921125
Smad9	2.9348910146098
Smim18	-0.605685030964684
Smpx	1.27401688099521
Smr3a	-0.965546034447478
Snhg1	0.655353251551096
Sobp	-1.10833613011151
Sorbs2	-0.70716962059039

Genes induzidos	Fold change (log)
Sp5	1.19963805996681
Spata31d1c	-0.765901911623337
Speer4c	1.02267652869456
Sphkap	-0.805420177668615
Spint3	0.874446233894347
Spp1	0.724851686404552
Spred3	-1.40437259105772
Sprr1b	0.844776917839114
Sprr2h	0.860711483725169
Sprr3	-0.635866194418451
Srm	0.741194977775741
Srms	-0.625176084475285
Srrm4os	-0.825331309001696
Sstr3	-0.730166563630741
Ssxa1	3.91109437073817
Ssxb1	-0.641727441191323
Ssxb8	-0.893847812403756
St6galnac5	-0.952335397653157
Stac2	-0.639069505503377
Stra6	-1.07196213412729
Stxbp5l	0.648090260260787
Sv2b	0.602766152332352
Svip	-0.731480226818134
Sycn	1.14560461907691
Sync	-0.71959398312015
Syt11	-0.699824886587493
Tas2r107	-0.709023347426271
Tbpl2	-0.941606556257801
Tbx3	-1.39562817134771
TC1599058	0.929103248025854
TC1600058	0.712915218053332
TC1604477	-0.724965721546319
TC1624218	-0.625967334478683
TC1636769	-0.609547418753894
TC1648127	-0.669286685173913
TC1670777	-1.13604832024944
TC1681987	-0.590076398163971
TC1686493	-0.890903315874196
TC1686612	-0.598192838197348
TC1707105	-0.797855680421163
TC1732485	-0.927989881326575
TC1778268	-0.814153022789697
Tceal5	1.3165611104321
Tceal6	-0.651449674613428
Tcn2	-0.747851230559972

Genes induzidos	Fold change (log)
Tcstv1	-1.06683866832899
Tdrd12	-1.16975415123031
Tdrd5	-0.706762781352104
Tekt5	-0.719884737749752
Tex22	0.618928611244154
Tex26	-0.738650550548559
Tfap4	0.629149442744372
Tfcp2l1	-0.733994954457527
Tgm5	-0.599312181722609
Tgoln2	2.03226198071886
Tgtp2	0.652775468267743
Them7	1.0668693423613
Tigd4	-0.713492835986749
Timd4	-0.627910434993769
Tlr11	-0.714214708204006
Tlx2	1.64723172215685
Tmco5	-0.939319166071527
Tmem151a	0.765063014270156
Tmem200c	-0.636423801468998
Tmem221	-0.602037356518306
Tmem225	-0.636952069109278
Tmem255b	-0.627734350894618
Tmem45b	-0.782780129795768
Tmem5	0.63846292292143
Tmem63c	1.30862240873828
Tmem67	-0.625074255745447
Tmem82	0.724002580072186
Tmprss4	-0.603456974079755
Tmprss6	-1.46775725333257
Trem3	-1.21488605401337
Trerf1	-0.613012810480331
Trim15	0.627134772342488
Trim30a	0.70614300880127
Trim30d	0.652893273539533
Trim71	-0.779405959299291
Trmt61a	0.670409190471737
Try4	-1.14085873815133
Tspan13	-0.71671274666199
Ttc21a	-0.761877876184569
Ttc23l	2.05101738938978
Ttc25	-0.61329951281655
Ttc30b	-0.648288680314474
Ttc9b	2.5915078551414
Ttll11	0.624106450766758
U37911	-1.27965974875437

Genes induzidos	Fold change (log)
Ubqln3	3.55730707241179
Uchl1	-0.636978114664331
Ugt1a6a	-1.39137887050933
Ugt2b35	1.71296591476213
Unc79	0.68645926739287
Usp13	0.762576024919401
Usp18	0.714515057504485
Vav3	1.27209757004523
Vax2	0.68005643650458
Vcam1	-0.928868414592166
Vegfc	0.737905823151667
Vgll2	-0.934351388345129
Vmn1r168	0.877360652422419
Vmn1r174	0.752785618653171
Vmn1r181	-0.837392165667067
Vmn1r37	-0.678907597896529
Vmn1r65	-0.786936164473572
Vmn1r87	0.611581103648292
Vmn2r115	2.52327473770454
Vmn2r121	-1.19187334633161
Vmn2r16	-0.946843002144414
Vmn2r43	-1.02586466804079
Vmn2r60	-0.850039109830531
Vmn2r67	-0.622035875375882
Vmn2r72	-0.625035789959005
Vmn2r77	-0.731247594543791
Vmn2r82	-1.09851798263204
Vmn2r91	1.45278408932694
Vmn2r98	0.813212985290162
Vsig8	1.77872584269846
Vstm4	-0.59420988814102
Vtn	0.805585355897032
W17435	-0.76265695324074
Wdr11	0.592080646328827
Wdr34	-0.597511527821915
Wfdc18	-1.10037333816479
Wnt10b	-0.729664450643491
X61497	1.01457017603883
Xpnpep2	-0.669863244830702
Ypel1	1.66055499438656
Zbp1	0.740318704557833
Zeb2os	-0.895756723157779
Zfp114	-0.998537443941453
Zfp128	1.11770417612576
Zfp324	-0.611704024574358

Genes inducidos	Fold change (log)
Zfp366	-1.00007820638497
Zfp422	-0.727070653709552
Zfp423	0.751072632274401
Zfp536	-0.793201558946672
Zfp647	-1.41559095542745
Zfp819	-1.05342563814345
Zfp874a	-0.687677895760308
Zfp92	-1.09133157569169
Zfp937	0.591514786285527
Zfy1	2.00481405413368
Zic1	-0.702555945441743
Zic5	-0.694547289790861
0610025J13Rik	0.954789891233063
0610039H22Rik	-0.801042386701488
1110006E14Rik	-0.725628648169758
1300014J16Rik	-0.662261931814186
1500009L16Rik	-0.694803559399849
1600010M07Rik	-0.613154303929124
1700001D01Rik	-0.68982604535301
1700001K23Rik	-0.630977713364521
1700003D09Rik	1.24223874773836
1700012B07Rik	-0.804576534229388
1700016A09Rik	-0.855450445513409
1700016F12Rik	-1.14292735516361
1700021F02Rik	-1.50124528909891
1700024G13Rik	-0.664932197284647
1700029J07Rik	-0.616926908316764
1700030N03Rik	-0.748834012485781
1700031A10Rik	-0.780066771382408
1700040F17Rik	1.4266893194904
1700047E10Rik	-0.833882475786313
1700048M11Rik	-0.863723520313293
1700062C10Rik	-0.603500851478841
1700080O16Rik	-1.39667663279439
1700084M14Rik	-1.19993436184229
1700092K14Rik	-0.75817847286106
1700092M07Rik	0.598398970164164
1700101E01Rik	0.890622223984468
1700121C10Rik	-0.59161904473254
1700122H20Rik	0.616992959895027
1810020O05Rik	0.781386130641457
2010003K11Rik	1.04615590733839
2010107G12Rik	-0.730235598968187
2010204K13Rik	1.04633253540987
2300003K06Rik	4.54296677010716

Genes induzidos	Fold change (log)
2310005E17Rik	-0.785479893493561
2310079F09Rik	-0.898281151807113
2410125D13Rik	-0.705695887194487
2810019C22Rik	-0.607188172446718
2810021J22Rik	-0.628857129071298
2810455B08Rik	-0.874616552436688
2900057C01Rik	-0.626800875273321
2900076A13Rik	-0.769241513727649
Genes induzidos	Fold change (log)
2900092D14Rik	0.973783380267085
3110007F17Rik	-0.611851786173824
3110040M04Rik	-0.71533526694313
3300002I08Rik	-0.604561907832778
3300002P13Rik	0.723607287721439
4731419I09Rik	-0.971058291305134
4731420N21	-0.639144621497319
4732423E21Rik	-0.594425489042033
4831440D22Rik	-0.627672292695456
4833417C18Rik	1.67486196792612
4921507G05Rik	0.760151430649736
4921528I07Rik	-0.828531408425953
4921531P14Rik	0.933678561925197
4930402K13Rik	1.60417619656655
4930404O17Rik	2.25431749377745
4930412F09Rik	-1.23919421987196
4930413G21Rik	-0.745534524136075
4930429F11Rik	-1.1243352374089
4930429F24Rik	-0.846753171084055
4930431P19Rik	-0.59095565210841
4930432F04Rik	-0.71947093565208
4930459C07Rik	-0.794331161636331
4930473M17Rik	-1.21767577603298
4930483J18Rik	-1.32299345359422
4930488N15Rik	-0.590889115463328
4930505A04Rik	-0.977852334665375
4930509J09Rik	-0.891078297240654
4930519A11Rik	0.767608279384675
4930524C18Rik	-0.692547700752709
4930525M21Rik	0.724305923711405
4930528H21Rik	-0.765671836405922
4930544D05Rik	0.634678683258787
4930557K07Rik	-0.740335406912202
4930563F08Rik	-1.0901274067186
4930566D17Rik	0.644595983551273
4930568G15Rik	-0.702445963314569

Genes induzidos	Fold change (log)
4931403M11Rik	0.812383488287293
4931406H21Rik	-0.820451602418388
4931414P19Rik	1.08650800667788
4931440F15Rik	-0.80386238649885
4932414J04Rik	-0.7455329459976
4932430I15Rik	-0.737751142389333
4933406J10Rik	2.18434200726492
4933407C09Rik	-1.03084730477829
4933409F18Rik	-1.17534823073835
Genes induzidos	Fold change (log)
4933411B09Rik	-0.592544417793067
4933411E08Rik	-1.20630481224026
4933415J04Rik	-0.616907008214731
4933416O17Rik	1.06126437458472
4933417C20Rik	-0.684903340523723
4933422A05Rik	-0.595600094659064
4933428G20Rik	0.747349034185892
4933429O19Rik	-1.24438572600617
4933436H12Rik	0.712045896713597
4933438K21Rik	-1.78374180783642
5031425F14Rik	1.09785580276059
5033406O09Rik	0.871548260862009
5330406M23Rik	-0.86710692058157
5330431K02Rik	-0.60269529280491
5430402E10Rik	-0.998243290780964
5430402P08Rik	-0.728565926782279
5430416N02Rik	-0.784648728978659
5430416O09Rik	-0.769505279983294
5430420F09Rik	-0.658122189932273
5430427O19Rik	-1.10342177285724
5730457N03Rik	-1.09272411711987
5830420C07Rik	-0.846905652843197
5830427D02Rik	-0.678428158871549
6030451C04Rik	-0.790540322499888
6030452D12Rik	-0.740974519194372
6230400D17Rik	1.52197363317264
6330407A03Rik	-0.96783242200561
6330412A17Rik	-0.833032575278063
6430519N07Rik	-1.10816977794506
6430590A10Rik	-1.01549124009408
6430628N08Rik	-0.61304119105306
6430706H07Rik	-0.758107874827621
6530409C15Rik	-0.712813448580068
6720422M22Rik	-0.793022104334757
6720427H10Rik	-0.7610811162511

Genes induzidos	Fold change (log)
6820445E23Rik	-0.593227722406425
7530428D23Rik	-0.726942715864173
8030453O22Rik	-1.04856471924896
8430426J06Rik	-0.594161937019678
8430437O03Rik	-0.606867333062787
9030619P08Rik	0.696398040202117
9130002K18Rik	-0.681208221478468
9130017K11Rik	-0.667658383738676
9130019P16Rik	1.90395780120996
9130020K20Rik	-0.677863810755294
9230112D13Rik	1.09651807833218
9230117E06Rik	-0.602058934198046
9330156P08Rik	-0.603105745515094
9330188P03Rik	-1.03833992149259
9430011C21Rik	-0.606343199040913
9430041J12Rik	-0.786846743901287
9430091E24Rik	-0.628576344646125
9530003O04Rik	-0.724927059924303
9530046B11Rik	-0.710729682607675
9530047P18Rik	-0.797333519574725
9530053J19Rik	-0.729671772026023
9530057J20Rik	-0.639808399747975
9830107B12Rik	1.41877008112372
9930024M15Rik	-0.665809865010457

APÊNDICE B - Genes reprimidos em mTEC 3.10 após o silenciamento do gene Aire que estão associados a expressão em outros tecidos que não o timo ($p > 0,05$).

Termo enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Plasma	0.0601	Kng1, Mug1, Flt4, Cfh, Hp, Ceacam2
Pituitary gland	0.0644	Tmem67, Gm10209, Gm5447, Sobp, Pde9a, Pcdh17, Rab27a
Bone	0.1313	Fam65b, Pik3cg, Gm1549, Ncf2, Gm10372, Neurog1, Bicc1, Atp1a2, Trem3, Map2k6, Aatk
Cerebellum	0.1548	Gm5475, Megf9, Adora2b, Pou6f2, Rtp1, Tceal6, Dsty, C230012o17rik, Dennd2a, 6530409c15rik, Gm9959, Ric3, Zic1, St6galnac5, Fam65b, Nphp3, Cdh7, Far2, Stac2, Gm9869, Bc018242, Sorbs2, Slc1a6, Gpr26, Dclk2, Clasp2, Slco5a1, C230096k16rik, Map2k6, Gabra2, Gabra6, Syt11, Pld5, Gria4, Pcdh17, Man1c1, Mctp1, Tmem67, Mphosph9, Ganc, Cadps2, Ophn1, Chn2, Zfp536
Ovary	0.1834	Vcam1, E330021d16rik, Hist1h1d, Zfp324, Hist2h2be, Gm10436, Kpna7, Gm2042, Nlrp4a, Fbxw26, Gm16367, Bcl2l10, Mctp1
Cochlea	0.1856	Kcnj16, Sobp, Emilin2
Embryonic body between diaphragm region and neck	0.2355	Tbx3, Cyp26b1, Pigb, Arsj, Clasp2, Zic1, 9430041j12rik
In vitro fertilized eggs	0.2813	E330021d16rik, Plekhg1, Sorbs2, Scin, Gm10436, Kpna7, Gm2042, Ppfibp2, Nlrp4a
Oviduct	0.3172	Pik3cg, Hspa12a, Olah, F8a, E230008o15rik, Xpnpep2
Cecum	0.3932	Kcnj16, Calcb, Gm6402, Ms4a7, Gm9926, Hrh2, Fer1l4, Lgals12
Eye	0.4346	Fras1, Mef2c, Vmn2r43, Aebp1, Dsty, Col2a1, Psap1, Ric3, Gpcpd1, Rtn1, Senp6, Pde6a, Sphkap, Efhd1, Nphp4, Stac2, Bc018242, Crisp1d2, A430033k04rik, Stra6, Sema3b, Clasp2, Map2k6, Tbx3, Ncald, Pim1, 2010107g12rik, Nrnx1, Sfi1, Sag, Grb10, Vmn2r121, Ppef2, Pdc, Ophn1, Zfp536, Slc15a3

Termino enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Olfactory brain	0.4664	Vmn2r43, 6430628n08rik, Kcnj16, Gm10561, Atp2b3, 3110007f17rik, Gm10910
Retina	0.4808	Zfp324, Uchl1, Pip5k1b, Dstyk, Ric3, Sag, Sphkap, Pde6a, Dhrr3, Hspa12a, Ppof2, Cd59a, Ms4a1, Pdc, Kcnh8, Slc25a40
Brain	0.5301	A2m, Pnma2, Olfr157, Enam, Tceal6, Dstyk, Gpcpd1, Zic1, Olfr551, Slc2a6, Bc018242, Cfh, F8a, Spred3, Eras, Nlrp4a, Cib3, Rab27a, Wnt10b, Atg9a, Zfp324, Scube1, C530008m17rik, Gm11735, Sipal12, Pim1, Exd1, Trerf1, Lpcat4, Adamts7, Mgat3, Grb10, Sstr3, Cd59a, Pira7, Ay074887, Bb287469, Fras1, Gal3st2, Gm5475, Plcx43, Gm5115, Scn1b, Isoc2b, Rtp1, Enpp4, Olfr763, Ric3, Ccng2, Olfr49, Pde6a, Fam65b, Nphp3, Nphp4, Gpr26, Ssxb1, Clasp2, Slc30a3, Lhx8, Gpr156, Gabra2, Syt11, Gabra6, 4931406h21rik, Neurog2, Pcdh17, Emilin3, Cyp7b1, Ggt5, Hspa12a, Cadps2, Kcnj8, Tas2r107, Ms4a10, Gm16367, Tcstv1, Srms, Kcnj16, Pou6f2, Uchl1, 1500009l16rik, Sobp, Rtn1, Serpina3b, Lgr5, Skap1, Insrr, St6galnac5, Far2, Kiss1, Slc23a1, Olfr198, Stac2, Olfr20, Slc24a3, Ttc30b, Zfp647, Slc1a6, Ugt1a6a, Olfr25, Zfp366, Hist1h1d, Acta1, Icam4, Gm5447, Nrxa1, Slit2, Fam196b, 5430416o09rik, Fmn2, Rhox3a, Limch1, Fhod3, Grip2, Pde9a, Gnb4, Vmn2r60, Alpl, Vmn1r181, Megf9, Olfr131, Hsd3b4, Shpk, Col2a1, Scarf1, Gm166, 3300002i08rik, Sphkap, Cdh7, Zfp114, Plekhg1, Sorbs2, Hrh2, Cyp26b1, Slc4a7, Dclk2, Gpr101, Fut2, Gm14548, Ppap2b, Rnase13, Aatk, 2810021j22rik, Flrt1, Cym, Lyz1, Dtx1, Cebpdl, Flt4, Nfasc, Pea15b, Tspan13, Ear7, Elavl3, Gria4, Atp1a2, Dpysl2, Man1c1, Cnnm1, Xpnpep2, Gm6402, Mphosph9, Vmn2r121, Slc6a7, Clec3a, Chn2, Fbxw26, Zfp536, Slc15a3, Htr2c, Htr2a
Mullerian duct includes surrounding region	0.5421	Gm6402, 6820445e23rik, Tbx3
Mammary tumor. MMTV-LTR/INT3 model. 5 month old mouse. Taken by biopsy.	0.5581	Pik3cg, Atg9a, Dbp, Limch1, Acss2, Man1c1
Pituitary	0.6068	Cpa4, Cdh7, Pld5, Uchl1, Sfi1, Zfp536

Termo enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Dendritic cell	0.6107	5430427o19rik, Ncf2, Af251705, Mmp12, Bc068281
Corpora quadrigemina	0.6412	Tmem67, Kcnj16, Efhd1, Fmn2, Cyp7b1, Dbp, Arsj, F8a, Ophn1, Slc35f3, Il33, Slc25a40, Gm166
Egg	0.6509	Bb287469, Gm8300, Noto, Fam184a, Olah, Pabpn1l, Pigb, Gm10436, Gm2042, Gm16367, Bcl2l10
Embryonic stem cell	0.6626	Bbs2, Slc24a3, Tdrd12, Slc25a40, Bc068281, Rab27a
Adipose tissue	0.6661	Cadps2, Cebpd, Lgals12
B-cell	0.6874	Hist1h1d, Cd80, Mmp12
Vein	0.7124	Fam65b, Sorbs2, Chl1
Head	0.7409	Mef2c, 5430427o19rik, Slc36a2, Gm5115, Galnt5, Gm12703, Ankrd2, Col2a1, Dennd2a, Acss2, Gpcpd1, Lgr5, Rtn1, 3300002i08rik, Insrr, Far2, Plekhg1, Tigd4, Map2k6, Pik3cg, 2810021j22rik, Cpa4, Ncald, Exd1, Tcn2, 5430416o09rik, Grb10, Cd55, Vgll2, Kcnh8, 3110007f17rik, 5430402e10rik, Gm10782, Htr2c, Chl1, Slc46a2
Spleen	0.7417	Gm10603, Ccl3, Ncf2, Icam4, Ppnr, Enpp4, Ankrd2, Lgals12, Try4, Pf4, Tcn2, Efhd1, Ggt5, Cd55, Cd80, Pira7, Hrh2, Clic5, Dpep3, Clec4b1, Irf4, Gm14548, Atp6v0a4
Brain cortex	0.7572	Pnma2, Sipal1l2, Atp1a2, Dpysl2, Acss2, Rtn1, Far2, Fmn2, Hspa12a, Stac2, Sorbs2, Clasp2, Slc30a3
Mast cell	0.7773	Acta1, Scin, Af251705, Skap1
Pancreas	0.7987	Retnla, Pnlip, Lrrc8e, Gm6402, Gkn2, Icam4, Crispld2, Pou6f2, Dstyk, Clec4b1, Slc39a5, Trerf1, Insrr
Hypothalamus	0.8062	St6galnac5, Sphkap, Far2, Plcxd3, Hspa12a, Gabra2, Cadps2, Kcnh6, Gpr101
Embryonic head	0.8067	Hapln1, Renbp, Sync
Testicle	0.8110	Art5, Olfr20, Ssxb1, Gm648
Eyeball	0.8272	Fras1, Neurog2, Acss2, Cryba1, Slit2, Sag

Termo enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Colon	0.8361	Gal3st2, Fam174b, Tmem45b, Pla2g10, Fa2h, Igfbp6, Lgals12, Mgp, Sfi1, Mecom, C1qc, Xpnpep2, Insrr, Vcam1, Slc26a3, Dhrr3, Ugt1a6a, Fut2, Ceacam2, Kcnq1, Dmbt1
Mammary tumor metastatized to lung. MMTV-LTR/Wnt1 model. Expression driven by an MMTV-LTR enhancer.	0.8524	Stac2, Saa2, Acacb
Spinal cord	0.8584	Zfp422, Hhip1, Fam65b, Vcam1, Gm1043, Megf9, A330070k13rik, C530008m17rik, Syt11, Gria4
Aorta	0.8602	Fam65b, Sorbs2, Chl1
Medulla oblongata	0.8641	Fam65b, Stac2, 6330407a03rik, Cd59a, Lrrc4b, Grip2, Gria4, Hhip, Atp1a2, Trerf1
Activated spleen	0.8873	Cyp7b1, Nod2, Il2ra, Tbx3, Clec4e, Cebpd, Kcnj8, Ms4a1, Itgad, Irf4, Pla2g2d, Xpnpep2
Salivary gland	0.8935	Retnla, Slc36a2, Ttc25, Cadps2, Ncald, Slc24a3, Tspan13, Sfi1, Nr0b2, Smr3a
Olfactory epithelium	0.8939	Fam174b, Grb10, Hist2h2be, Col2a1, Atp6v0a4, Rtn1, Kcnq1
Skeletal muscle	0.8999	Islr, Cmya5, Ankrd2
Epididymis	0.8999	Ttc25, Bc048679, Defb34
Placenta	0.9040	Alpl, Kng1, A2m, Aldh3b2, Tspan13, Acacb, Nphp3, Kiss1, Gkn2, Renbp, Cd59a, Gnb4, Ceacam14
Visual cortex	0.9072	Syt11, Tspan13, Svip, Gnb4
Stomach	0.9158	Gkn2, Renbp, C530008m17rik, Ugt1a6a, Gsdma2, Try4, Ccng2
Tongue	0.9214	Mef2c, Bbs2, Murc, Acer1, Cmya5, A430033k04rik, Psapl1, Sfi1, Tgm5, Gpcpd1, Cmb1
Cortex	0.9328	Atg9a, Zfp114, Galnt16

Termino enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Aorta and vein	0.9378	H2-M9, Ms4a1, Kcnh8
Testis	0.9256	4930505a04rik, Ttc25, 4932414j04rik, Gm10860, 1700080o16rik, Efhd1, Art5, 4921528i07rik, Pou5f2, Olfr20, Dpep3, Cfh, F8a, Slc25a2, Gm2042, Cldnd2, Ttc21a, Fam154a, Rnf32, Olfr25, Shbg, Tmco5, 1700012b07rik, C530008m17rik, Fa2h, Sipal12, Rab3il1, Sel1l2, Aldh3b2, 4931440f15rik, Abcc12, Exd1, Lpin1, 1700024g13rik, 4930432f04rik, Ophn1, 6030452d12rik, Vmn2r60, Ccdc7, 1700001k23rik, Shpk, 4932430i15rik, Fam65b, Sphkap, Vcam1, Nphp4, Zfp819, Ssxb1, Cyp26b1, Gm10436, Slc39a8, Hsf2bp, 1700016a09rik, Gm9777, 2810021j22rik, Flrt1, Klk1b7-Ps, Pla2g10, Tbx3, Tmem225, 4931406h21rik, Gria4, 4930431p19rik, Dppa4, Cnnm1, 4930483j18rik, Mphosph9, Cd55, H2afy3, Fam184a, Zic5, Chn2, Itgad, Iqcf3
Mammary tumor. WAP-TGF alpha model. 7 months old	0.9702	Rasal1, Syt11, Ugt1a6a, Acot1, Rrad, C2
Small intestine	0.9702	Lyz1, Ms4a10, Neurog3, Slc39a5, Ceacam2
Heart	0.9704	Lyz1, Loc100036540, Arsj, Pip5k1b, Postn, Atp1a2, Acacb, Xpnpep2, Nphp3, Murc, Ggt5, Mphosph9, Fabp3, Kcnq1, Slc25a40
Amnion	0.9723	Grb10, Pip5k1b, C2, Gm648
Urinary bladder	0.9732	Ncf2, Hist2h2be, Fer1l4, Ppfibp2
Kidney	0.9773	Fras1, Kcnj16, Frk, Cyp24a1, Scn1b, Isoc2b, Hsd3b4, Arhgap18, C1qc, Cmb1, Insrr, Vcam1, Slc23a1, Nphp4, Ttc30b, Ugt1a6a, Slc39a5, Ceacam2, Mtus2, Zfp422, Ms4a7, Flrt1, Tmem45b, Car12, Mgp, Ptpu, Slc10a5, Tcn2, Akr1b7, Gm6402, Renbp, Dhrr3, Hist2h2be, Cd59a, Scin, Cyp2d26, Atp6v0a4, Pdzd3, Habp2
Limb	0.9798	H1fx, Emilin2, Senp6
Spinal ganglion	0.9826	Hspa12a, Zfp324, Pou6f2, Syt11, Zic1
Fetal brain	0.9839	Nphp4, Pnma2, Ganc, Nacad
Inner ear	0.9876	Car12, Pim1, Pla2g2d

Termino enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Mammary tumor metastatized to lung. Tumor arose spontaneously	0.9853	Lrrc8e, Ms4a7, Clasp2, Atp1a2, C1qc
Lung	0.9808	Megf9, Lyz1, Tbx3, Acox1, Cyp2f2, Cebpd, Ankrd2, D430018e03rik, Hp, Nid1, Ptpru, Mecom, Mctp1, Xpnpep2, Vcam1, Gm10687, Hist2h2be, Ugt1a6a, Sftpd, Kcnq1, Srms, Htr2a
Mammary tumor. C3	0.9911	Cxcl1, Mphosph9, Car12, Skint2, Mgp, Gm7696
Embryonic tail	0.9960	Hhipl1, Sfi1, Atp1a2, Senp6
Hippocampus	0.9968	Pik3cg, Ncald, C530008m17rik, Uchl1, Atp1a2, Dpysl2, Dennd2a, Zfp92, Hspa12a, Krt15, Fabp3, Stra6, Irf4, Ceacam2
Thymus	0.9979	Pip5k1b, C230012o17rik, Postn, Bicc1, Acss2, Ccng2, Skap1, Senp6, Pde6a, Fam65b, Lingo4, Plekhg1, Pigb, Slc39a8, Ms4a1, Au017193, Slc4a7, Gpr20, Slco5a1, Slc25a40, Map2k6, Pik3cg, Ms4a7, Tmem221, Il2ra, Hist1h1d, Dtx1, Scube1, C530008m17rik, Nid1, A630052c17rik, Lpin1, Bc068281, Cd80, Limch1, Clic5, Irf4, Pla2g2d, Srms, Slc46a2
Liver	0.9992	Pnlip, Mug1, Igfbp6, Arhgap18, Acot1, Acss2, C1qc, Senp6, Slc23a1, Serpina7, Ugt1a6a, Ttc30b, Cfh, Rgn, Ceacam2, Kng1, Hist1h1d, Ncald, Try4, Nr0b2, Tcn2, Lpin1, Dhhdh, Grb10, Mgat3, Hist2h2be, Krt15, Cyp2d26, Cxcl1, Hsd3b3, Cyp2f2, Apoc1, Sec14l4, Ccng2, Vcam1, Fam65b, Nphp3, Csad, Sorbs2, Slc4a7, Clasp2, Lhx8, H2-M9, Tbx3, Flt4, Ppfibp2, Nid1, Slc10a5, Tmprss6, Gm6402, Cyp7b1, Dbp, Fabp3, Nr5a2, Srms, Habp2, Ai182371
Macrophage	0.9997	Gpr84, Ncf2, Slc4a7, C1qc, Mmp12
Embryo	0.9996	Cxcl1, Plcx3, Aebp1, Tdrd5, Sync, Gpcpd1, Vcam1, Sphkap, Zfp92, Nphp3, Cdh7, Kiss1, Sema3b, Mcoln2, Mdfr, Cpa4, Hapln1, Wnt10b, Acox1, Noto, Tbx3, Nrnx1, Ptpru, Cercam, Lpcat4, Adamts7, Pabpn1l, Mpped2, Neurl2

Termo enriquecido (tecido)	Valor de P	Genes Envolvidos
Bone marrow	0.9997	Zfp422, Ms4a7, Ccl3, G530011o06rik, Zfp324, Adora2b, Cebpd, Hp, Slc11a1, Slc2a6, Dhrr3, Clec4e, Ugt1a6a, Slc4a7, Gnb4, Mcoln2, Aatk
Embryo	0.9996	Cxcl1, Plcx3, Aebp1, Tdrd5, Sync, Gpcpd1, Vcam1, Sphkap, Zfp92, Nphp3, Cdh7, Kiss1, Sema3b, Mcoln2, Mdfi, Cpa4, Hapln1, Wnt10b, Acox1, Noto, Tbx3, Nrnx1, Ptpru, Cercam, Lpcat4, Adamts7, Pabpn1, Mpped2, Neurl2
Mammary gland	0.9999	Frk, Scn1b, Isoc2b, Apoc1, Postn, Il33, Bicc1, Gpcpd1, Efhd1, Slc2a6, Cyp26b1, Slc39a8, F8a, Ppap2b, Zfp422, Plat, Mdfi, Ms4a7, Ncf2, Lgals12, Timd4, Mmp12, Bbs2, Dhrr3, Kcnj8, Krt15, Fabp3, Gnb4
Whole body	0.9999	9130017k11rik, Cyp7b1, Gm6402, Tbx3, C530008m17rik, Clic5, Celf5, Mecom, Srms, Map2k6, B130055m24rik
Mammary tumor	0.9999	Frk, Gpr84, Olah, Enpp4, Islr, Stac2, Clec4e, Hoxa5, Slc24a3, Sorbs2, Slc39a8, Af251705, Mcoln2, Plat, Hyal3, Acta1, Duoxa1, Rab3il1, Ppfibp2, Atp1a2, Sfi1, Tmprss4, Gm6402, Cd55, Cadps2, Fabp3
Plasma	0.0601	Tmem67, Gm10209, Gm5447, Sobp, Pde9a, Pcdh17, Rab27a
Pituitary gland	0.0644	Fam65b, Pik3cg, Gm1549, Ncf2, Gm10372, Neurog1, Bicc1, Atp1a2, Trem3, Map2k6, Aatk

Anexos

ANEXO A - Certificação da comissão de ética em experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 011/2015-1, sobre o projeto intitulado "*A função do gene AIRE e de micro RNAs no controle da adesão de células tímicas epiteliais medulares com timócitos*", sob a responsabilidade d **Professor Doutor Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de agosto de 2015.

We certify that the protocol n° 011/2015-1, entitled "*The function of the AIRE gene and micro RNAs in the control of adhesion between medullary thymic epithelial cells with thymocytes*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/31/2015.

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

ANEXO B: Publicações resultantes de colaborações

Immunobiology 218 (2013) 96–104

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.de/imbio

Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire)

Ernna H. Oliveira^a, Claudia Macedo^a, Paula B. Donate^a, Renata S. Almeida^a, Nicole Pezzi^a, Catherine Nguyen^b, Marcos A. Rossi^c, Elza T. Sakamoto-Hojo^d, Eduardo A. Donadi^e, Geraldo A. Passos^{a,f,*}

^a Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b National Institute of Health and Medical Research (INSERM, U1090), 13100 Marseille, France

^c Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Department of Medical Clinics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^f Disciplines of Genetics and Molecular Biology (DMEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2011

Received in revised form 2 February 2012

Accepted 7 February 2012

Keywords:

Autoimmune regulator (Aire) gene

Autoimmunity

siRNA

In vivo electroporation

Knockdown

Medullary thymic epithelial cells (mTECs)

ABSTRACT

In the thymus of non-obese diabetic (NOD) mice, the expression of the autoimmune regulator (Aire) gene varies with age, and its down-regulation in young mice precedes the later emergence of type 1 diabetes mellitus (T1D). In addition, the insulin (*Ins2*) peripheral tissue antigen (PTA) gene, which is Aire-dependent, is also deregulated in these mice. Based in these findings, we hypothesized that the imbalance in PTA gene expression in the thymus can be associated with slight variations in Aire transcript levels. To test this, we used siRNA to knockdown Aire by *in vivo* electro-transfection of the thymus of BALB/c mice. The efficiency of the electro-transfection was monitored by assessing the presence of irrelevant Cy3-labeled siRNA in the thymic stroma. Importantly, Aire-siRNA reached medullary thymic epithelial cells (mTECs) down-regulating Aire. As expected, the *in vivo* Aire knockdown was partial and transient; the maximum 59% inhibition occurred in 48 h. The Aire knockdown was sufficient to down-regulate PTA genes; however, surprisingly, several others, including *Ins2*, were up-regulated. The modulation of these genes after *in vivo* Aire knockdown was comparable to that observed in NOD mice before the emergence of T1D. The *in vitro* transfections of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA resulted in samples featuring partial (69%) and complete (100%) Aire knockdown. In these Aire siRNA-transfected 3.10 mTECs, the expression of PTA genes, including *Ins2*, was down-regulated. This suggests that the expression profile of PTA genes in mTECs is affected by fine changes in the transcription level of Aire.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The regulation of negative selection during the induction of self-tolerance in the thymus is dependent on genes expressed by medullary thymic epithelial cells (mTECs). In these cells, the transcription factor autoimmune regulator (Aire) regulates the expression of a large set of downstream genes; of these Aire-dependent genes, 45% encode peripheral tissue antigens (PTAs). These PTAs represent autoantigens expressed by diverse tissues and organs; therefore, this process, which is partially controlled

by the Aire gene, has been termed “promiscuous gene expression” (PGE) (Derbinski et al. 2001, 2005; Kyewski and Derbinski 2004; Magalhães et al. 2006; Cheng et al. 2007; Mathis and Benoist 2007, 2009; Macedo et al. 2009; Kyewski and Peterson 2010; Abramson et al. 2010; Anderson and Su 2011).

Exposure of differentiating thymocytes to a large variety of PTAs ensures the negative selection of highly self-reactive nascent T cell clones and prevents aggressive autoimmune reactions and consequently, the emergence of autoimmune diseases (Villaseñor et al. 2008; Irla et al. 2008a,b; Fierabracci 2011; Taniguchi and Anderson 2011; Anderson and Su 2011; Metzger and Anderson 2011). Dendritic cells (DCs) also participate in the negative selection process through Aire-mediated acquisition of PTA peptides from mTECs (Klein and Kyewski 2000; Derbinski et al. 2001; Kyewski and Derbinski 2004; Kyewski and Klein 2006; Takahama 2006; Holländer 2007; Irla et al. 2008a,b; Villaseñor et al. 2008).

* Corresponding author at: Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602 0222.

E-mail addresses: passos@rge.fmrp.usp.br, geraldopassos@pq.cnpq.br (G.A. Passos).

Loss-of-function mutations in the human AIRE gene cause a recessive autoimmune syndrome termed autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), which is characterized by chronic mucocutaneous candidiasis, hypoparathyroidism and adrenal insufficiency (Villaseñor et al. 2005; Rizzi et al. 2006; Gavanescu et al. 2007; Mathis and Benoist 2009; Akirav et al. 2011; Fierabracci 2011).

Aire-knockout (KO) and Aire-deficient mouse models have demonstrated the functional role of Aire, as these mice develop a relatively mild autoimmune syndrome featuring T cell hyperactivity, production of organ-specific autoantibodies and lymphocytic infiltrates and other anomalies (Anderson et al. 2002; Ramsey et al. 2002a,b; Kuroda et al. 2005; Pereira et al. 2005; Hubert et al. 2009). Moreover, studies using heterozygous Aire KO mice have demonstrated the dependence of PTA gene expression on Aire gene dosage (Liston et al. 2004; Kont et al. 2008).

The expression of Aire and the manifestation of autoimmune diseases in mice are also affected by genetic background; Aire-deficient NOD mice develop severe exocrine pancreatitis, which is not observed in Aire-deficient C57BL/6 or BALB/c mice. Epigenetic or stochastic mechanisms may be implicated in this variability (Jiang et al. 2005; Tykocinski et al. 2008).

Experiments using an artificial vector-based model system demonstrated that thymic Aire expression during the perinatal period is important to prevent autoimmunity in NOD mice (Guerau-de-Arellano et al. 2009).

Recently, our group showed that in the thymic stroma of autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice, the expression of the Aire gene varies with age and with emergence of type 1 diabetes mellitus (T1D). The down-regulation of this gene in young animals precedes the later emergence of T1D in adults. Furthermore, key PTA genes including insulin (Ins2) and glutamic acid decarboxylase (Gad1), which are involved in the negative selection of autoreactive thymocytes that recognize pancreatic antigens in the thymus, were also down-regulated in these mice (Fornari et al. 2010).

A mechanism explaining the role of AIRE protein in association with a set of other proteins in controlling gene expression in the thymus was recently proposed by Abramson et al. (2010). These authors showed that proteins involved with pre-mRNA processing, transcription, nuclear transport and chromatin binding/structure associate with AIRE protein during the nuclear control of PTA gene transcription.

Despite these findings, the relationship between transient variations in Aire gene transcription and transcription levels of PTAs remains poorly understood. The previously reported data led us to the hypothesis that not only mutations or KO model system, that totally suppress the function of Aire, but also variations in the expression of this gene can disturb genes that code PTAs in the thymus.

Because Aire-deficient and Aire-KO mice do not express Aire in the thymus at any point during their lifespan, these models cannot adequately represent the consequences of slight or transient changes in the expression of this gene.

Therefore, to assess our hypothesis, we used *in vivo* intra-thymic electro-transfection of small interfering RNA (siRNA) to induce transient changes in the transcription levels of the Aire gene in non-autoimmune BALB/c mice and evaluated the consequences of these transient changes in Aire expression on PTA genes in the thymus.

Materials and methods

Mice

Five- to six-week-old female BALB/c mice weighing 18–22 g were used for experiments. Animals were housed in the Central

Animal Facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil in temperature-controlled rooms (22 °C) with 12-h dark/light cycles and received water and food *ad libitum*. Experimental procedures followed ethical guidelines under strict guidance and approval from the University of São Paulo Ethics Committee for Animal Experimental Research (Protocol # 117/2008).

Medullary thymic epithelial cell line (mTEC)

The medullary 3.10TEC line (3.10 mTEC) was kindly provided by Dr. W. Savino (Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil). This TEC line was established from C57BL/6 mice, and the medullary phenotype was determined by immunostaining with Th-3 and Th-4 antibodies, which recognize cortical and medullary phenotypes, respectively (Hirokawa et al. 1986; Mizuuchi et al. 1992).

These cells were further evaluated using a panel of anti-cytokeratin monoclonal antibodies, which confirmed the original distinct medullary phenotype (Werneck et al. 2000). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Aire small interfering RNA (Aire siRNA) sequence

We used the TriFecta (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) anti-Aire RNAi sequence (GGAUUCUCUUUAGGACUACAAUCTAGAUUGUAGUCCUUAAGAGAAUCCUC) to silence Aire mRNA *in vivo* by thymic electro-transfection of BALB/c mice, as described below, or *in vitro* by liposome-mediated transfection of 3.10 mTEC cells as previously described (Macedo et al. 2009). Irrelevant Cy3(*)-labeled siRNA (T*CCUUCUCUCUUUCUCCCUUGUG*AT*CAACAAGGAGAGAAAGAGAGGAAGG*A) was used to monitor the efficiency of *in vivo* thymic electro-transfection by confocal microscopy (Fig. 1). Unlabeled irrelevant siRNA was used to monitor the side effects of RNA uptake.

Silencing Aire gene transcript

In vitro liposome-mediated transfection of 3.10 mTEC cells

Cells were transfected using a protocol previously standardized in our laboratory (Macedo et al. 2009). Briefly, confluent 3.10 mTEC cultures were transfected with 10 nM of Aire siRNA using Hiperfect reagent (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. After transfection, the cells were cultured for 24 h in RPMI as described above. Total RNA was then extracted using the mirVana kit® (Ambion, Austin, TX, USA) and used as a template for cDNA synthesis and confirmation of gene knockdown by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR).

In vivo electro-transfection of the thymus

Thymus electro-transfection (also referred to as electroporation) was performed based on a previously published protocol (Irla et al. 2008a,b); however, in this study, we used siRNA. Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). A crocodile clip corresponding to the cathode was used to establish skin contact on the paw opposite to the injection site. A 0.33-mm diameter injection needle was introduced between the first and the second rib, where the thymus is located, at a 45° angle from the longitudinal axis. We observed that inserting the needle 5 mm was necessary and sufficient to reach the thymus without affecting proximal vital organs such as the heart and lungs.

After insertion of the needle, 5 µl of sterile phosphate-buffered saline (PBS) or 5 µl of sterile PBS containing 5 µg of Aire siRNA or irrelevant siRNA was slowly injected into each thymic lobe (5 µg siRNA per lobe, total 10 µg siRNA per thymus), and an electrical current of five 20-ms pulses of 300 V was immediately applied using a

Fig. 1. Histological examination of BALB/c thymus by fluorescent confocal microscopy after *in vivo* thymus electro-transfection. (A) Thymus electroporated with PBS buffer (control) or B) electro-transfected with irrelevant siRNA-Cy3 (red). siRNA-Cy3 was localized to both the cytoplasm and the nucleus of the stromal cells. The nucleus was stained with DAPI (blue). Magnification 63 $\times$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

standard square wave electroporator (Model ECM 830, BTX[®] Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

Animals were sacrificed by CO₂ inhalation 24, 48 and 72 h after electro-transfection, and thymuses were immediately removed by surgery and processed for whole thymic stroma preparation and mTEC isolation. All experiments were carried out in triplicate.

To monitor the efficiency of electro-transfection, 5 μ g of naked siRNA-Cy3 diluted in 5 μ l PBS or only PBS (control) was injected into each thymic lobe, and mice were electro-transfected. Thymuses were harvested 1 hour after electro-transfection and processed for histological analysis by confocal microscopy.

Fluorescent confocal microscopy

Following siRNA-Cy3 or PBS electro-transfection, thymuses were dissected and incubated for 15 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining solution, and samples were embedded in Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek, USA, Inc.) and cut into 5- μ m sections with a histo-cryomicrotome. Fluorescent images were acquired using a Leica TCS SP5 confocal microscope with a 556–570-nm bandpass filter set to view Cy3 and a 420-nm long-pass filter set to view DAPI. All images were obtained using the same exposure time and magnification.

Histological examination

Control or PBS electro-transfected thymuses were dissected, and samples were embedded in Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek, USA, Inc.) and cut into 5- μ m sections with a histo-cryomicrotome. Staining with hematoxylin–eosin (H&E) were performed according to conventional protocol. All histological images were acquired using a common light photo-microscope with the same exposure time and magnification.

Thymic stroma and mTEC isolation

Following intervals of 24, 48 and 72 h after electro-transfection, thymuses were dissected, and the thymic stroma was separated from the whole thymus, as previously described (Gray et al. 2002). In brief, thymi were dissected and trimmed of fat and connective tissue. Tissue fragments were then gently agitated in 50 ml of RPMI 1640 medium at 4 $^{\circ}$ C with a magnetic stirrer for 30 min to remove the majority of thymocytes. The resulting thymic fragments

were then transferred to 10 ml of fresh RPMI 1640 medium, and the remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. The medium was changed 2–3 times after agitation, and fragments were recovered by settling each time. The thymic fragments were then incubated in 5 ml of 0.125% (w/v) collagenase type II and 0.1% DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 medium at 37 $^{\circ}$ C for 15 min and gently agitated every 5 min with a 1-ml pipettor. After 3–4 digestions, whole stromal cells were pooled and centrifuged at 450 $\times$ g for 5 min and finally resuspended in 200 μ l PBS. These cells were then used for total RNA preparation.

For isolation of mTECs, we used a modified version of the protocol described by Kont et al. (2008). Briefly, whole stromal cells were obtained as described above, resuspended at a density of $1 \times 10^8/98 \mu$ l RPMI 1640, incubated with 2 μ l rat anti-mouse IgG2a BP-1 antibody (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) for 15 min and mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads (MACs Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) to remove CD45⁺ cortical thymic epithelial cells (cTECs). The cell fraction containing mTECs was obtained by positive selection using rat anti-mouse Epcam BP-1 (CD326, EGP40). After incubation with this antibody, cells were mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads and separated in columns with a magnetic field (MACs Miltenyi Biotec).

The cells were stained with a phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD80 antibody and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-MHC class II antibody and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The purity of CD80⁺ mTECs was $\geq 68\%$, and $\geq 27\%$ of these mTECs were CD80⁺ MHC class II⁺. These cells were then used for total RNA preparation.

Total RNA preparation and quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using the mirVana kit[®] (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were confirmed to be free of proteins and phenol by UV spectrophotometry.

RNA degradation was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and an Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only RNA samples that were free of proteins and phenol and that had an RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9.0 were selected for cDNA synthesis using SuperScript reverse transcriptase enzyme according to the

manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

The transcriptional levels of Aire and the autoantigen genes (Ins2 and Gad1) were assayed by qRT-PCR. The Primer3 web tool (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60 °C.

The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&itool=toolbar>). The forward and reverse sequences (presented in the 5' to 3' orientation) were as follows: Aire (GenBank acc NM.009646.1), GCAACTCTGGCCTCAAAGAG and GGTCTGAATTCCGTTTCCAA and Ins2 (GenBank acc NM.008387.3), ACCTTCAGACCTTGGCACTG and GCTGGGTAGTGGTGGTCTA.

Expression of the genes was quantified using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), and gene expression levels were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH (GenBank acc NM.008084.2, GGGTGTGAACACGAGAAAT and CCTTCCCAATGCCAAGTT), which is commonly used as a reference.

Microarray hybridizations and data analysis

Changes in gene expression were also evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome) microarray-based gene expression platform according to the manufacturer's instructions. For hybridizations of messenger RNA to whole mouse genome 4× 44K 60-mer oligonucleotide arrays (G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 500 ng total RNA was labeled with the one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies). Samples of complementary RNA (cRNA) were hybridized for 18 h at 42 °C in a rotator oven and washed. The array slides were scanned using a DNA microarray scanner (Agilent Technologies), and the hybridization signals were extracted using the Agilent Feature Extraction software (version 10.5). Gene expression profiles from independent preparations of control and Aire siRNA electro-transfected mTECs were analyzed by comparing the microarray hybridizations of the respective samples.

A complete file including all of the genes present in the microarrays used in this study, as well as the experimental conditions, is available online in the MIAME public database (<http://www.ebi.ac.uk/miameexpress>). ArrayExpress accession numbers: E-MEXP 3343 (*in vivo* Aire siRNA knockdown) and E-MEXP 3213 (*in vitro* Aire siRNA knockdown).

The quantitative microarray data were normalized to the 75th percentile and were analyzed using the Agilent GeneSpring GX bioinformatics platform (www.agilent.com/chem/genespring) according to the default instructions. Hierarchical clustering of

samples was allowed based on ANOVA statistical analysis ($p < 0.01$) of genes with fold change ≥ 1.6 and an uncentered Pearson correlation metric (Eisen et al. 1998). The similarities and dissimilarities in gene expression are presented as dendrograms, in which the pattern and length of the branches reflect the relatedness of the samples or genes, and heat maps.

Identification of peripheral tissue antigen genes

Microarray data analysis was used to assess gene expression based on combined information from the BioGPS (www.biogps.org) and SOURCE (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/sourceSearch>) public databases. These databases provide gene annotation enrichment analysis and functional analysis of microarray data and include sequences of cDNA clones from different organ/tissues, enabling us to group genes based on tissue representation.

Results

Monitoring *in vivo* thymic electro-transfection-mediated delivery of siRNA-Cy3

Fluorescent confocal microscopy images revealed no red fluorescence in thymuses electro-transfected with PBS (Fig. 1a). In contrast, electro-transfection effectively delivered the siRNA-Cy3 sequence to the thymic stroma. We also noted that 1 hour after the electro-transfection procedure siRNA-Cy3 was localized to both the cytoplasm and the nucleus of thymic stromal cells (Fig. 1b). Examination of H&E histological staining confirmed that the electro-transfection procedure did not affect the main thymic structure, as both the cortical and medullary compartments were preserved (Fig. 2).

In vivo thymic gene knockdown is Aire-specific and extends to mTECs

After demonstrating by fluorescence histology that *in vivo* electro-transfection is an effective method to induce uptake of siRNA by the thymus, qRT-PCR was used to measure Aire mRNA levels at different times.

Analysis of RNA (cDNA) from the whole thymic stroma demonstrated that Aire gene knockdown was effective (Fig. 3). Furthermore, we observed that the effect of siRNA-mediated knockdown of Aire was transient; the inhibition of Aire expression peaked at 59 h 48 h after electro-transfection, and normal transcription levels were restored within 72 h.

To show that the thymic siRNA electro-transfection procedure itself did not affect Aire expression, a group of mice was

Fig. 2. Histological examination of BALB/c thymus by hematoxylin–eosin staining. (A) Control thymus or (B) thymus electroporated with PBS buffer. Note that the cortical and medullary thymic compartments are preserved after electroporation procedure. Magnification 40× (c = cortex, m = medulla).

Fig. 3. Time-course of *in vivo* thymic Aire knockdown. Aire transcriptional expression in thymic stroma was assayed by qRT-PCR at time points 24, 48 and 72 h after Aire siRNA electro-transfection. The decrease in Aire expression peaked at 48 h (59% Aire knockdown). Within 72 h after electro-transfection, the levels of the Aire transcript were normal (Student's *t* test, $p < 0.05$).

electro-transfected with unlabeled irrelevant siRNA. Fig. 4 shows that 48 h after electro-transfection with irrelevant siRNA, the levels of Aire mRNA were comparable to those in control mice that were electro-transfected with only PBS, as evaluated by qRT-PCR.

To evaluate whether the knockdown process affected the thymic medulla, mTECs were isolated from thymic stroma 48 h after electro-transfection. Fig. 5 shows that Aire was down-regulated approximately 63% in mTECs upon electro-transfection of Aire siRNA.

Total RNA extracted from Aire knockdown mTECs was used for further qRT-PCR and microarray analyses.

Fig. 4. Aire expression levels as determined by qRT-PCR in thymic stroma electro-transfected with PBS (control) or with irrelevant siRNA. The electro-transfection procedure itself did not affect Aire transcriptional expression (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 5. Aire transcriptional expression levels were analyzed by qRT-PCR in mTECs isolated from thymic stroma 48 h after electro-transfection with Aire siRNA. Aire expression was decreased by 63% in Aire siRNA-electro-transfected samples when compared to control samples (electroporated with PBS buffer) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

In vitro Aire gene knockdown in an mTEC cell line

Using the 3.10 mTEC cell line, we demonstrated that *in vitro* siRNA-mediated Aire gene knockdown was very efficient. We were able in obtaining a sample of cells in which Aire expression was reduced 69% (Fig. 6) and a sample with Aire expression reduced 100% (Fig. 7), 48 h after transfection. Total RNA extracted from Aire siRNA-transfected 3.10 mTEC cells was used for further qRT-PCR and microarray analyses.

Effect of Aire knockdown on PTA gene expression

To evaluate the effect of Aire knockdown on PTA genes, we used RNA samples (cDNAs) extracted from mTECs from the thymuses of control and Aire siRNA-electro-transfected mice. In addition, we used RNA samples extracted from control and Aire siRNA-transfected 3.10 mTEC cells.

Of the 44,000 oligonucleotides present in the microarray used in this study, we focused on a set of 10 Aire-dependent PTA genes (Table 1) (Anderson et al. 2002) that were modulated in both the *in vivo* and *in vitro* model systems.

Fig. 6. Partial silencing of Aire upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 7. Complete silencing of Aire upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA, compared to control samples (transfected with PBS buffer) as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Dendrograms and heat-maps from microarray hybridizations indicate that upon *in vivo* thymic electro-transfection with Aire siRNA, which resulted in partial (63%) silencing of the Aire gene in mTECs, PTA genes, such as insulin (Ins2), were up-regulated (1.6 fold-change). Conversely, upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA, which completely (100%) silenced the Aire gene, the PTA genes were down-regulated (1.6 fold-change) (Fig. 8a and b, respectively).

To confirm the effect of *in vitro* Aire knockdown on gene expression of 3.10 mTEC cells, we analyzed the expression of the Ins2 gene, which is considered an Aire-dependent PTA, by qRT-PCR. Fig. 9

Table 1

Peripheral tissue antigen (PTA) gene representation and their regulation in mTEC cells after *in vivo* or *in vitro* Aire knockdown. Data were collected from microarray hybridizations (gene modulation with fold-change ≥ 1.6).

PTA gene (symbol)	Tissue representation	Aire gene knockdown	
		<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Collagen, type II, alpha 1 (Col2a1)	Osteoblasts and bone	Up	Down
Cytochrome P450 1a2 (Cyp1a2)	Lung and liver	Up	Down
Insulin-like growth factor II (Igf2)	Placenta, umbilical-cord, mammary gland, salivary-gland, osteoblasts, brain	Up	Down
Insulin I (Ins1)	Pancreas	Up	Down
Insulin II (Ins2)	Pancreas	Up	Down
Major urinary protein 1 (Mup1)	Mammary gland, lung, placenta, uterus, ovary, bladder, epidermis, stomach, adipose tissue, adrenal gland, skeletal muscle, heart, liver, brain, lymph nodes, DP and SP thymocytes	Up	Down
Major urinary protein 3 (Mup3)	Mammary gland, adipose tissue, lung, adrenal gland, liver	Up	Down
Major urinary protein 4 (Mup4)	Salivary gland and lacrimal gland	Up	Down
Salivary protein 1 (Spt1)	Salivary gland	Up	Down
Neutrophilic granule protein (Ngp)	DP thymocytes, mast cells, granulocytes, osteoblasts, lymph nodes, bone marrow, bone	Down	Down

Fig. 8. Hierarchical clustering of mTECs isolated from (A) *in vivo* Aire siRNA-electro-transfected thymuses and (B) *in vitro* Aire siRNA-electro-transfected 3.10 mTEC cells. The peripheral tissue antigen (PTA) genes were up-regulated when Aire was partially (63%) silenced by *in vivo* thymic electro-transfection. Conversely, when Aire was fully (100%) silenced in 3.10 mTEC cells, the PTA genes were down-regulated. The significant and differentially expressed genes were selected using Student's *t* test specifically adapted for microarray data following construction of dendrograms and heat-maps, which were obtained using the Cluster TreeView program within the GeneSpring GX (Agilent) platform. Red: upregulation, green: downregulation, and black: unmodulated (Pearson correlation metrics, 75 percentile). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

shows that Ins2 was down-regulated when Aire was partially (69%) as well as fully knocked down (100% silenced) (Fig. 10).

Fig. 11 confirms that the expression of the Ins2 gene was up-regulated in mTECs isolated from mice following thymic electro-transfection with Aire siRNA, which resulted in a 63% silencing of Aire.

Discussion

In this study, we assessed the hypothesis that the deregulation of PTA genes in the thymus, which may cause the loss of self-tolerance,

Fig. 9. Modulation of insulin (*Ins2*) transcriptional expression in 3.10 mTEC cells transfected *in vitro* with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR. The *Ins2* gene was down-regulated in mTECs displaying a partial knockdown of Aire (69% silencing) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 10. Modulation of insulin (*Ins2*) transcriptional expression in 3.10 mTEC cells transfected *in vitro* with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR. The *Ins2* gene was down-regulated in mTECs displaying a complete knockdown of Aire (100% silencing) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 11. Up-regulation of insulin (*Ins2*) transcriptional expression in mTECs displaying a partial knockdown of Aire (63% silencing) after *in vivo* thymic electro-transfection of Aire siRNA, compared to control sample (electroporated with PBS buffer), as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

might be caused not only by a complete deficiency in the expression of the Aire gene, but also by slight variations in its transcription levels.

The role played by the Aire gene in the positive control of PTA genes was previously demonstrated using Aire-knockout (KO) and Aire-deficient mice (Anderson et al. 2002; Derbinski et al. 2005). Moreover, studies using heterozygous Aire KO mice have demonstrated the dependence of PTA gene expression on Aire gene dosage (Kont et al. 2008).

Recently, we used unmanipulated NOD mice, which spontaneously develop autoimmune T1D, to demonstrate that the transcriptional expression of Aire in the thymus varies with age and that its down-regulation in young animals precedes the late onset of T1D. Young NOD mice that display down-regulation of Aire show increased levels of transcriptional expression of insulin (*Ins2*) in the thymus (Fornari et al. 2010). As expression of the *Ins2* gene has been shown to be Aire-dependent, this finding was somewhat surprising.

This finding encouraged us to develop a model system in which the transcriptional levels of Aire in the thymus could be subtly manipulated *in vivo*.

In a knockout mouse, a segment of the genomic DNA is disrupted, and expression of the affected gene is completely abolished; thus, in our point of view, KO mice are not a suitable model system for these studies. Furthermore, because naked siRNAs do not integrate into the genome and consequently do not disrupt DNA sequences that may be important for the function of the transcriptional machinery as a whole, we decided to use siRNA-mediated gene knockdown, which preserves the gene in the genome but causes transient degradation of the chosen mRNA.

We hypothesized that the thymus could be efficiently transfected with Aire siRNA, resulting in Aire gene knockdown. As an outcome, we hypothesized that the expression of Aire-dependent PTA genes could be affected.

To test these hypotheses, we assayed the expression of 10 Aire-dependent PTA transcripts in samples from mTECs subjected to either *in vivo* or *in vitro* Aire gene knockdown.

Fluorescent imaging of histological samples (Fig. 1) validated the possibility of *in vivo* thymic electro-transfection. Importantly, siRNA-Cy3 reached both the cytoplasm and the nucleus of thymic stromal cells, which have been shown to carry out the positive and negative selection of autoreactive thymocytes (Klein and Kyewski 2000; Magalhães et al. 2006; Klein et al. 2009). Notably, the cortical and medullary thymic compartments were preserved after 48 h of electro-transfection procedure, as shown by histological H&E staining (Fig. 2).

qRT-PCR analysis of thymic stroma revealed that 48 h after electro-transfection of Aire siRNA, Aire mRNA levels were significantly reduced (Fig. 3).

The Aire siRNA electro-transfection process was specific in this effect, as control mice that were electro-transfected with only PBS or irrelevant siRNA did not demonstrate a significant reduction in Aire mRNA levels (Fig. 4). Moreover, qRT-PCR analysis demonstrated that *in vivo* Aire knockdown affected mTECs (Fig. 5).

We previously demonstrated the efficiency of *in vitro* Aire knockdown in 3.10 mTEC cells (Macedo et al. 2009). In this study, we analyzed RNA (cDNA) samples from 3.10 mTEC cells and demonstrated the possibility of partial (69%) (Fig. 6) and 100% silencing of Aire (Fig. 7).

In contrast to the constitutively Aire deficient mouse model (Aire^{-/-}), in which the organization and composition of the thymic medulla is altered (Gillard et al. 2007), H&E staining of tissue sections demonstrated that the *in vivo* Aire knockdown model system we developed in this study did not cause changes in the thymic structure. The 48-h period of transient Aire knockdown was not sufficient to affect the structure of the thymic stroma and medulla.

The inability of this transient loss of Aire expression to alter thymic structure was likely due to our finding that 72 h after electrotransfection, Aire mRNA levels were fully restored.

Together, these findings demonstrate the establishment of transient *in vivo* down-regulation of Aire mRNA levels as an appropriate model system for our study.

The Aire gene positively controls the expression of a large set of PTA genes that characterize differentiated cells in mTECs (Ramsey et al. 2002a,b; Pitkänen and Peterson 2003; Derbinski et al. 2005).

Based in these data, we evaluated the effect of Aire knockdown on 10 Aire-dependent PTA genes (Fig. 8 and Table 1).

Our results revealed that the transcriptional levels of these genes were increased after *in vivo* Aire knockdown but decreased after *in vitro* Aire knockdown. The only PTA gene that was down-regulated after both *in vivo* and *in vitro* Aire knockdown was neutrophilic granule protein (Ngp), suggesting that its expression is strictly Aire-dependent (Table 1).

Interestingly, we were able to reproduce the imbalance in the expression of PTA genes that occurs in the thymus of NOD mice during the development of T1D in BALB/c mice. The young prediabetic NOD mice display transcriptional down-regulation of Aire in the thymus, and as a consequence, the mRNA levels of PTA genes were increased in these mice (Fornari et al. 2010).

At first glance, these findings seem contradictory, as Aire is considered a positive regulator of PTA genes. Thus, we hypothesized that the transcriptional profile of PTAs is dependent on the expression level of Aire.

Importantly, the results obtained with 3.10 mTEC cells (Figs. 9 and 10) demonstrate that the Aire-dependent PTA *Ins2* is down-regulated after partial (69%) and fully (100%) silencing of Aire, corroborating findings of studies using Aire KO mice (Anderson et al. 2002).

Despite performing several assays, it has been impossible thus far to achieve 100% Aire knockdown by *in vivo* electrotransfection of the thymus. Nevertheless, our finding that the *Ins2* gene is up-regulated when Aire is partially knocked down *in vivo* (Fig. 11) suggests that this kind of regulation occurs in both *in vitro* and *in vivo*.

These results show that levels of Aire mRNA differentially modulate PTA genes both *in vitro* and *in vivo*. As mTEC cells of the *in vivo* experiments were obtained from BALB/c mice and of the *in vitro* experiments we used the 3.10 cell line (C57BL/6 background) this effect seems to be affected by genetic background.

Therefore, these results demonstrate that the levels of PTA transcripts are affected by subtle changes in Aire mRNA levels, confirming our hypothesis.

The precise mechanism underlying this phenomenon was not investigated in this study, but considering recent evidence showing that Aire plays a role in a cascade involving other genes, such as *Gucy2d* (Macedo et al. 2009), and that AIRE protein interacts with other proteins, including TOP2a and DNA-PK (Abramson et al. 2010; for review see Danso-Abeam et al. 2011) it is possible that in the presence of decreased levels of Aire, these partners may compensate for the partial loss of Aire in controlling gene expression.

When Aire is partially or completely down-regulated *in vitro* (Figs. 6 and 7, respectively) or completely absent *in vivo*, as observed in Aire-KO mice (Anderson et al. 2002), are PTA genes down-regulated.

In conclusion, we provide the first demonstration of *in vivo* thymic delivery of siRNA by electrotransfection (electroporation), resulting in a functional knockdown of Aire gene expression.

Using this model system, we demonstrate that Aire knockdown in the thymus of non-autoimmune BALB/c mice mimics the PTA expression profile observed during onset of autoimmune T1D in NOD mice and that slight variations in the expression of the Aire transcript influence the expression levels of PTA genes.

These results provide a new perspective for further studies of the function of genes involved in immune tolerance manipulating the intact thymus.

Acknowledgments

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil. We thank Dr. Livia M.R. Moda and Dr. Roy E. Larson (Dept. of Cell Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP) and Dr. Maria Jose A. Rocha and MSc Fabio Alves Aguilã (Dept. of Morphology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP) for the facilities on confocal microscopy analysis, Ms Monica A. Abreu (Dept. of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP) for the H&E histological analysis of the electrotransfected thymuses.

References

- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D., 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140 (1), 123–135.
- Akbar, E.M., Ruddle, N.H., Herold, K.C., 2011. The role of Aire in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (1), 25–33.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by aire protein. *Science* 298, 1395–1401.
- Anderson, M.S., Su, M.A., 2011. Aire and T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2), 198–206.
- Cheng, M.H., Shum, A.K., Anderson, M.S., 2007. What's new in the Aire? *Trends Immunol.* 28 (7), 321–327.
- Danso-Abeam, D., Humblet-Baron, S., Dooley, J., Liston, A., 2011. Models of Aire-dependent gene regulation for thymic negative selection. *Front. Immunol.* 2, 1–8.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Derbinski, J., Gähler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhausen, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33–45.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14863–14868.
- Fierabracci, A., 2011. Recent insights into the role and molecular mechanisms of the autoimmune regulator (AIRE) gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 10 (3), 137–143.
- Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M.C., Magalhães, D.A., Passos, G.A., 2010. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell. Biochem.* 342, 21–28.
- Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C., Mathis, D., 2007. 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.
- Gillard, G.O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L., Farr, A.G., 2007. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J. Immunol.* 178 (5), 3007–3015.
- Gray, D.H., Chidgey, A.P., Boyd, R.L., 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260 (1–2), 15–28.
- Guerau-de-Arellano, M., Martinic, M., Benoist, C., Mathis, D., 2009. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206 (6), 1245–1252.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Morizumi, E., Handa, S., 1986. Analysis of the thymic microenvironment by monoclonal antibodies with special reference to thymic nurse cells. *Thymus* 8 (6), 349–360.
- Holländer, G.A., 2007. Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat. Immunol.* 8 (3), 234–236.
- Hubert, F.X., Kinkel, S.A., Crewther, P.E., Cannon, P.Z., Webster, K.E., Link, M., Uibo, R., O'Bryan, M.K., Meager, A., Forehan, S.P., Smyth, G.K., Mittaz, L., Antonarakis, S.E., Peterson, P., Heath, W.R., Scott, H.S., 2009. Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *J. Immunol.* 182 (6), 3902–3918.
- Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Holländer, G.A., Reith, W., 2008a. Autoantigen-specific interactions with CD47 Thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* 29 (3), 451–463.
- Irla, M., Saade, M., Kissenpfennig, A., Poulin, L.F., Leserman, L., Marche, P.N., Jouvion-Marche, E., Berger, F., Nguyen, C., 2008b. ZAP-70 restoration in mice by *in vivo* thymic electroporation. *PLoS One* 3 (4), e2059.
- Jiang, W., Anderson, M.S., Bronson, R., Mathis, D., Benoist, C., 2005. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J. Exp. Med.* 202 (6), 805–815.

- Klein, L., Kyewski, B., 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2), 179–186.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.
- Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H.S., Peterson, P., 2008. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* 45 (1), 25–33.
- 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., 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unexpressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* 174 (4), 1862–1870.
- Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 688–698.
- Kyewski, B., Klein, L., 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571–606.
- Kyewski, B., Peterson, P., 2010. Aire, master of many trades. *Cell* 140 (1), 24–26.
- Liston, A., Gray, D.H.D., Lesage, S., Fletcher, A.L., Wilson, J., Webster, K.E., Scott, H.S., Boyd, R.L., Peltonen, L., Goodnow, C.C., 2004. Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200, 1015–1026.
- Macedo, C., Evangelista, A.F., Magalhães, D.A., Fornari, T.A., Linhares, L.L., Junta, C.M., Silva, G.L., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Savino, W., Passos, G.A., 2009. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Immunol.* 16, 3240–3244.
- Magalhães, D.A., Silveira, E.L., Junta, C.M., Sandrin-Garcia, P., Fachin, A.L., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., 2006. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* 13, 81–99.
- Mathis, D., Benoist, C., 2007. A decade of Aire. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (8), 645–650.
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 287–312.
- Metzger, T.C., Anderson, M.S., 2011. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol. Rev.* 241 (1), 89–103.
- Mizuuchi, T., Kasai, M., Kokuho, T., Kakiuchi, S.T., Hirokawa, K., 1992. Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J. Exp. Med.* 175, 1601–1605.
- Pereira, L.E., Bostik, P., Ansari, A.A., 2005. The development of mouse APECED models provides new insight into the role of Aire in immune regulation. *Clin. Dev. Immunol.* 12 (3), 211–216.
- Pitkänen, J., Peterson, P., 2003. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun.* 4 (1), 12–21.
- Ramsey, C., Bukrinsky, A., Peltonen, L., 2002a. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum. Mol. Genet.* 11 (26), 3299–3308.
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kämppe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., Peltonen, L., 2002b. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum. Mol. Genet.* 11 (4), 397–409.
- Rizzi, M., Ferrera, F., Filaci, G., Indiveri, F., 2006. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5 (2), 145–147.
- Takahama, Y., 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2), 127–135.
- Taniguchi, R.T., Anderson, M.S., 2011. The role of Aire in clonal selection. *Immunol. Cell Biol.* 89 (1), 40–44.
- Tykocinski, L.O., Sinemus, A., Kyewski, B., 2008. The thymus medulla slowly yields its secrets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 43, 105–122.
- Villasehor, J., Benoist, C., Mathis, D., 2005. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204, 156–164.
- Villasehor, J., Besse, W., Benoist, C., Mathis, D., 2008. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15854–15859.
- Werneck, C.C., Cruz, M.S., Silva, L.C., Villa-Verde, D.M.S., Savino, W., Mourão, P.A.S., 2000. Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium. *J. Cell. Physiol.* 185, 68–79.

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

Aire-dependent peripheral tissue antigen mRNAs in mTEC cells feature networking refractoriness to microRNA interaction

Claudia Macedo^a, Ernna H. Oliveira^a, Renata S. Almeida^a, Paula B. Donate^a,
Thaís A. Fornari^a, Nicole Pezzi^a, Elza T. Sakamoto-Hojo^b, Eduardo A. Donadi^c,
Geraldo A. Passos^{a,d,*}

^a Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Disciplines of Genetics and Molecular Biology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2014

Received in revised form 11 August 2014

Accepted 13 August 2014

Available online 27 August 2014

Keywords:

Thymus

Aire gene

Peripheral tissue antigen

Post-transcriptional control

Self-tolerance

microRNAs

ABSTRACT

The downregulation of PTA genes in mTECs is associated with the loss of self-tolerance, and the role of miRNAs in this process is not fully understood. Therefore, we studied the expression of mRNAs and miRNAs in mTECs from autoimmune NOD mice during the period when loss of self-tolerance occurs in parallel with non-autoimmune BALB/c mice. Although the expression of the transcriptional regulator Aire was unchanged, we observed downregulation of a set of PTA mRNAs. A set of miRNAs was also differentially expressed in these mice. The reconstruction of miRNA–mRNA interaction networks identified the controller miRNAs and predicted the PTA mRNA targets. Interestingly, the known Aire-dependent PTAs exhibited pronounced refractoriness in the networking interaction with miRNAs. This study reveals the existence of a new mechanism in mTECs, and this mechanism may have importance in the control of self-tolerance.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Abbreviations: AID, autoimmune disease; Amelx, amelogenin X chromosome; Amyl1, amylase 1, salivary; ANOVA, analysis of variance; Aire, autoimmune regulator; Alb, albumin; CD, cluster of differentiation; cDNA, complementary DNA; CIA, collagen-induced arthritis; Col1a2, collagen type 1 alpha 2; Cryaa, crystallin alpha A; cTECs, cortical thymic epithelial cells; Cy3, cyanine 3; Cyp11a2, cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2; DNAase 1, deoxyribonuclease 1; Gad2, glutamic acid decarboxylase 2; Ghr, growth hormone receptor; Gabrb2, gamma-aminobutyric acid A – GABA – receptor, subunit beta 2; Hbb-y, hemoglobin Y, beta like embryonic chain; hsa, Homo sapiens; Ins1, insulin I; Ins2, insulin II; Igf2, insulin-like growth factor 2; K, thousand; KO, knockout; Lalba, lactalbumin, alpha; MHC, major histocompatibility complex; mRNA, messenger RNA; miRNA, microRNA; mer, Merrifield; mmu, *Mus musculus*; Mir, microRNA; Mog, myelin oligodendrocyte glycoprotein; Muc6, mucin 6, gastric; Muc11, mucin-like 1; Mup1, major urinary protein 1; Mup4, major urinary protein 4; mTEC, medullary thymic epithelial cell; ng, nanogram; NB, newborn; NCBI, National Center for Biotechnology Information; NOD, non-obese diabetic; PGE, promiscuous gene expression; Oxt, oxytocin; PTA, peripheral tissue antigen; Plp1, proteolipid protein (myelin) 1; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RIN, RNA integrity number; RNA Pol II, RNA polymerase II; Sag, retinal S antigen; SPF, specific pathogen-free; Spt1, salivary protein 1; Sst, somatostatin; S100b, S100 protein, beta polypeptide, neural; T1D, type 1 diabetes mellitus; 5WE, five-week old.

* Corresponding author at: Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900 Bandeirantes Avenue, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602 0222.

E-mail address: passos@usp.br (G.A. Passos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.08.015>
0171-2985/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The discovery that PTAs are ectopically expressed in the thymic medulla by mTECs that contribute to the elimination of nascent autoreactive thymocytes throughout negative selection has improved our understanding of the molecular and genetic mechanisms controlling central tolerance (Kyewski et al. 2002).

mTECs express virtually all PTAs, and this guarantees the representation of autoantigens from all tissues and organs. Due to the great diversity of autoantigens, this phenomenon was termed PGE, which is the key to central tolerance. Thus, mTECs are essentially self-antigen-presenting cells (Klein and Kyewski 2000; Derbinski et al. 2001; Mathis and Benoist 2004; Magalhães et al. 2006).

Developing thymocytes are presented with the major histocompatibility complex (MHC)-containing peptides coded by the PTA genes of mTECs. Dendritic cells also participate in the negative selection process after acquiring PTA peptides from mTECs (Klein and Kyewski 2000; Derbinski et al. 2001; Kyewski and Derbinski 2004; Gotter et al. 2004; Kyewski and Klein 2006; Takahama 2006; Hollander 2007; Irla et al. 2008; Villaseñor et al. 2008; Danso-Abeam et al., 2011; Klein et al. 2014).

The observation that mutations in the Aire gene are associated with severe, multi-organ, tissue-specific autoimmunity in both humans and mice and the use of KO mouse model systems identified the role this gene plays in controlling central tolerance (Björnses et al. 2000; Derbinski et al. 2005; Kont et al. 2008; Nagamine et al. 1997; Ramsey et al. 2002; Su and Anderson 2004; Su et al. 2008).

In addition to mutations, unbalanced levels of Aire expression in the thymic stroma is also associated with the aggressive autoimmunity observed in mouse models including NZB for systemic autoimmunity (Fletcher et al. 2009), NOD for T1D (Fornari et al. 2010) and DBA-1/J for collagen-induced arthritis (Donate et al. 2011). Lima et al. (2011) and Skogberg et al. (2014) have found that patients presenting with 21 trisomy (Down syndrome) feature thymic dysfunction and/or tolerance disturbances including altered expression of PTAs in the thymus due to the additional Aire gene in the genome, which is located at chromosome 21q22.3.

The AIRE protein coded for by this gene acts as a nuclear transcription controller that positively regulates the expression of many but not all PTAs considered being Aire dependent (Anderson et al. 2002; Anderson and Bluestone 2005).

Aire, PTA and MHC genes act in a pathway to control PGE (Danso-Abeam et al. 2011; Donate et al. 2011; Macedo et al. 2009), and additional proteins can operate in concert with AIRE to control PTA gene expression (Abramson et al. 2010). Recent evidence has shown that AIRE protein releases stalled RNA Pol II from blockage at the promoter region of its target genes (Giraud et al. 2012). This finding could explain the marked lack of specificity of AIRE and, consequently, the promiscuous gene expression.

The loss of self-tolerance may be due to the absence or deregulation of Aire and the consequent downregulation of Aire-dependent PTA genes in the thymus (Fletcher et al. 2009, 2011; Fornari et al. 2010; Donate et al. 2011).

Gene regulation is not only controlled by nuclear transcription factors but is also mediated by miRNAs, which are primarily active in the cytoplasm and mainly play a role as negative controllers of gene expression. Thus, miRNAs prevent mRNA translation into proteins and/or mediate its degradation. These small 19–24 nucleotide-long non-coding RNA molecules exhibit important biological activity by influencing the normal and pathological development of organs and systems including the immune system in general and the thymus, specifically (Lodish et al. 2008; Dai and Ahmed 2011; Khan et al. 2014).

We hypothesized that the loss of self-tolerance due to the downregulation of PTAs in the thymus could be due to miRNA activity.

Based on our previous studies (Fornari et al. 2010; Donate et al. 2011), we established an approach for determining the association between gene expression changes in the thymic stroma and aggressive autoimmunity using an experimental model system that reproduces an autoimmune disease. We have employed NOD mice, which develop autoimmune T1D during the aging process (Atkinson and Leiter 1999). Given the recent findings that Aire-dependent and Aire-independent PTA genes are downregulated in the thymus of NOD mice during the emergence of T1D (Fornari et al. 2010), this approach seemed ideal for measuring the interaction between miRNAs and PTA mRNAs and examining whether these interactions were associated to the development of autoimmunity.

Recent evidence showing the expression and the role of miRNAs in the thymic epithelium (Papadopoulou et al. 2011; Zuklys et al. 2012; Ucar et al. 2013; Khan et al. 2014) and that Aire regulates expression of miRNAs in mTECs (Macedo et al. 2013) led us to ask if miRNAs are involved in post-transcriptional control of PTAs in mTECs. If there was post-transcriptional control of PTAs, then this mechanism could be associated with loss of immune tolerance. In addition, we formulated a second hypothesis that these regulatory molecules might represent important factors that negatively control PTA mRNAs and central tolerance.

The microarray analysis that we utilized enabled us to explore the transcriptome (mRNAs) and the mirnome (miRNAs). A bioinformatics algorithm was then used to reconstruct miRNA–mRNA interaction networks.

We analyzed the expression of these RNA species in mTECs isolated from the thymus of newborn and five-week-old pre-diabetic NOD mice because this is the period when the loss of self-tolerance occurs in the mice. However, to evaluate the extent of this phenomenon, we also analyzed the RNA species isolated from mTECs of non-autoimmune BALB/c mice during the same periods of development.

Aire expression was unchanged during this period in both mouse strains. However, the levels of Aire-dependent and Aire-independent PTA mRNAs including those that are involved with autoimmune T1D in NOD mice were downregulated. We also observed the expression of a set of modulated miRNAs during this time period, which suggests the possibility that they might interact with target PTA mRNAs.

Due to the essential contribution of PTAs to negative selection and central self-tolerance, we compared the expression and post-transcriptional interactions with miRNAs in mTECs from autoimmune non-obese diabetic (NOD) in parallel with non-autoimmune BALB/c mice.

Materials and methods

Mice, medullary thymic epithelial cell separation and total RNA preparation

Three-day-old NB and 5WE female pre-diabetic NOD mice were used for the experiments. The animals were born and housed in SPF conditions at the Isogenic Mice Facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil in a temperature-controlled room (22 °C) with 12-h dark/light cycles. The animals received sterile water and food *ad libitum*. This study used only the clinically healthy animals with blood glucose levels ≤ 250 mg/dL, and these animals were considered pre-diabetic. The experimental procedures performed followed ethical guidelines under strict guidance and approval from the University of São Paulo Ethics Committee for Animal Experimental Research (Permit # 117/2008).

The thymic stroma was separated from the whole thymus of the two groups of mice (NB and 5WE) with minor modifications from a protocol previously described by Gray et al. (2002). In brief, thymus were dissected and trimmed of fat and connective tissue. The tissue fragments were gently agitated in 50 ml of RPMI 1640 medium at 4 °C with a magnetic stirrer for 30 min to remove the majority of thymocytes. The resulting thymic fragments were subsequently transferred to 10 ml of fresh RPMI 1640 medium, and the remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. The medium was changed 2–3 times after agitation, and fragments were recovered by settling for each sample. The thymic fragments were incubated in 5 ml of 0.125% (w/v) collagenase type II and 0.1% DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 medium at 37 °C for 15 min. The fragments were gently agitated every 5 min with a 1-ml pipettor. After 3-digestions, whole stromal cells were pooled and centrifuged at 450 $\times$ g for 5 min. These cells are known as thymic stromal cells and were used for isolation of mTECs.

To isolate mTECs, we used a modified version of the protocol described by Kont et al. (2008). Briefly, whole stromal cells were obtained as described above and then resuspended at a density of $1 \times 10^6/98 \mu\text{L}$ RPMI 1640 and incubated with 2 μL of rat anti-mouse IgG2a BP-1 antibody (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) for 15 min. The cells were mixed with magnetic micro-beads coated with anti-rat IgG (MACs Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) to remove CD45⁺ cTECs. The cell fraction containing mTECs was

obtained by positive selection using rat anti-mouse Epcam BP-1 (CD326, EGP40). After incubation with this antibody, the cells were mixed with anti-rat IgG magnetic micro-beads and separated on columns in a magnetic field (MACs Miltenyi Biotec).

The cells were stained with a phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD80 antibody and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-MHC class II antibody and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The purity of CD80⁺ mTECs was $\geq 68\%$, and $\geq 27\%$ of these mTECs were CD80⁺ MHC class II⁺. These cells were subsequently used for total RNA preparation.

Total RNA was extracted from mTECs using a mirVana kit® (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA preparations were confirmed to be free of proteins and phenol by UV spectrophotometry.

The quality of the RNA samples was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only RNA samples featuring peaks of 28S, 18S and 4-5S RNAs and with RIN ≥ 9.0 were selected for use.

Microarray hybridizations and data analysis

Changes in gene expression were evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome) microarray-based gene expression platform according to the manufacturer's instructions. To hybridize mRNA to the entire mouse genome, a set of 4 × 44 K 60-mer oligonucleotide arrays (G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used with 500 ng of total RNA labeled with a one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies).

Due to human-mouse miRNA sequence conservation, we used the whole human miRNA set of 8 × 15 K oligonucleotide arrays (G4470 C, Human miRNA V3 Microarray kit, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) for hybridization of miRNAs. Briefly, 100 ng of total RNA was labeled with the miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit (Agilent Technologies). In this case, the names of mature miRNAs were adapted to those of mice. For example, the human hsa-miR-155 corresponds to murine mmu-miR-155 (Griffiths-Jones 2006, 2010). In this study, we considered only the set of the 717 known *Mus musculus* miRNAs released in the MicroRNA.org (www.microRNA.org) database at the time the experiments were performed.

Samples of complementary mRNA (cRNA) or Cy3-labeled mRNA were hybridized for 18 h at 42 °C in a rotator oven and were then washed. The array slides were scanned using a DNA microarray scanner (Agilent Technologies), and the hybridization signals were extracted using the Agilent Feature Extraction software (version 10.5). The gene expression profiles for mRNAs and miRNAs from independent preparations of NB and 5WE mTECs were analyzed by comparing the microarray hybridizations of the respective samples.

A complete file that includes all of the miRNAs and mRNAs present in the microarrays used in this study with the experimental conditions is available online in the EMBL-EBI ArrayExpress public database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the following accession numbers: E-MEXP 3357 (for NOD miRNA data) and E-MEXP 3358 (for NOD mRNA data), E-MTAB-2329 (for BALB/c miRNA data) and E-MTAB-2335 (for BALB/c mRNA data).

The quantitative microarray data were normalized to the 75th percentile and were analyzed using the Agilent GeneSpring GX bioinformatics platform (www.agilent.com/chem/genespring) according to the default instructions. The hierarchical clustering of samples was allowed based on mRNAs and miRNAs with fold changes ≥ 2.0 and uncentered Pearson correlation metrics (Eisen et al. 1998). The similarities and dissimilarities in the expression of mRNAs and miRNAs are presented as dendrograms in which the

pattern and length of the branches reflect the relatedness of the samples or mRNAs/miRNAs and as heat-maps.

Reconstruction of miRNA-mRNA interaction network

The actual mRNA- and miRNA-normalized microarray data were subsequently re-analyzed to reconstruct an interaction network using the GenMir++ algorithm, which allows for the prediction of mRNA targets (Huang et al. 2007).

GenMir++ uses miRNA and mRNA microarray expression data from the same cell sample to identify miRNA-mRNA target pairs that are best supported by the expression data. For each mRNA, its candidate miRNA regulators were scored according to how the miRNA expression profile contributed to explaining the downregulation of the mRNA expression based on all other miRNA candidate regulators. GenMir++ calculates the scores by attempting to reproduce an mRNA's profile by a weighted combination of the genome-wide average normalized expression profile and the negatively weighted profiles of a subset of the miRNA regulators. The miRNAs that appear most often in subsets with reproductions that are good fits to the mRNA profile are assigned the highest scores.

Luciferase reporter gene assay for validation of miRNA-mRNA interactions

The oligonucleotide pairs containing a portion of the Ghr or Gabrb2 3'UTR predicted binding site for miRNAs were synthesized by Sigma-Aldrich, (Sigma, St. Louis, MO, USA). The oligonucleotides were annealed and cloned into the pmirGLO Vector (Promega Corporation, USA) between the XhoI/XbaI restriction sites. The result was a miRNA target region in the correct 5'–3' orientation located immediately 3' downstream of the luciferase gene. For selected targets, we introduced point mutations into the 7-nucleotide seed-binding sequence. These constructs, named "pmir-Ghr" or "pmir-Gabrb2" for the wild-type sequences and "pmir-Ghr(m)" or "pmir-Gabrb2(m)" for the mutant mismatch sequences were selected by colony-polymerase chain reaction (PCR) using the following pair of primers: forward 5'AGGTTACAACCGCAAGAAG3' and reverse 5'CAGCCAACCTCAGTCTCTT 3', which flank the vector polycloning site.

For the luciferase reporter assay, 0.2 µg of each pmir construct was transfected together with 1.6 pmol of miR-155 or scrambled (control) miRNA (Thermo Scientific Dharmacon, Waltham, MA, USA) into HEK-293 cells (6×10^4 cells/well) in a 96-well plate. The transfections were performed using Attractene Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The transfected cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The cells were lysed 24 h after transfections in passive lysis buffer (Promega). The firefly and renilla luciferase activities were measured in a Molecular Devices FlexStation 3 luminometer with the Dual-Luciferase reporter system (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Oligonucleotide primer design and qRT-PCR

The transcriptional expression of the Aire gene was confirmed by qRT-PCR using the cDNA sequence retrieved from the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), accession number NM_009646.1. The Primer 3 web tool (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3.www.cgi>) was used to select a pair of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60 °C (forward 5'GCAACTCTGGCTCAAGAG3' and reverse 5'GGTCTGAATTCGTTTCAAG3'). The cDNA samples were prepared using Superscript II reverse transcriptase enzyme (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) as recommended. The expression

Fig. 1. Quantitative real-time PCR was used to compare the expression levels of the Aire gene in mTEC cells isolated from five-week-old mice. The expression levels were normalized to Hprt expression. $N = 3$, means $\pm$ standard error of the mean. One-way ANOVA $p < 0.05$.

of Aire was quantified using a Step-One real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) and normalized to the expression of the Hprt gene (NM_013556.2).

Results

Transcriptional expression of the Aire gene

The microarray analysis comparing mTEC cells from NB and 5WE NOD or BALB/c mice showed that the change in expression of the Aire gene between these groups was statistically insignificant and had less than a 2.0 fold-change. We have used a cutoff value of ≥ 2.0 fold-change, and these data are not displayed in the microarray hierarchical clustering. To assess the expression of the Aire gene, we performed qRT-PCR. The results revealed that transcriptional levels were unchanged between the two samples of mTECs that were isolated from 5WE mice and between mouse strains. These results confirmed the microarray data and show that although the procedures used for mTEC separation could *a priori* alter gene expression, it did not occur in this experimental model (Fig. 1).

mRNAs differentially expressed in mTECs of newborn and five-week-old NOD mice

Although the transcriptional expression pattern in mTECs remained unchanged between NB and 5WE NOD mice for the majority of the 44,000 sequences tested with a control/test ratio ≈ 1.0 (Pearson correlation) and a fold-change of < 2.0 , 8166 were found to be differentially modulated in NOD and there were 7584 in BALB/c. The hierarchical clustering of the data identified clusters of downregulated (repressed) and upregulated (induced) genes. The changes in the transcriptional profile could be observed by comparing mTECs from NB and 5WE mice.

The color heat-map depicted in Fig. 2 shows only a fraction of the whole set of modulated genes. This figure focuses on Aire-dependent PTA mRNAs (highlighted) that were modulated in samples from NB and 5WE BALB/c (17 Aire-dependent mRNAs) and of NOD (19 Aire-dependent mRNAs) mice.

A comparison of the transcriptomes of mTEC cells isolated from NB and 5WE mice (Fig. 2) shows that not just the known Aire-dependent PTA mRNAs were upregulated in NB and downregulated in 5WE NOD mice (whose tissue representation are indicated

in parenthesis). The following genes were also differentially regulated: Alb (liver, lungs, placenta), Col1a2 (bone, osteoblasts, epidermis, umbilical cord), Cyp1a2 (liver), Gad2 (pancreas, brain), Ins1 (pancreas), Ins2 (pancreas), Igf2 (placenta, liver), Mog (brain), Muc6 (digestive system), Mucl1 (salivary gland, lacrimal gland, testis), Mup1 (liver, adrenal gland, mammary gland), Mup4 (lacrimal gland), Plp1 (brain), S100b (brain), Sag (eyes, retina) and Spt1 (salivary gland, lacrimal gland) or Amelx (tooth enamel), Igf2 (placenta, liver), Hbb-y (umbilical cord, placenta), Cryaa (eye lens, eyecup), Ins2 (pancreas), Lalba (mammary gland), Amy1 (lacrimal gland, salivary gland), Sst (brain, stomach, pancreas), Oxt (hypothalamus, pituitary gland), Muc6 (digestive system), Mucl1 (salivary gland, lacrimal gland, testis) and Mup4 (lacrimal gland). There was also a panel of additional mRNAs that were differentially modulated, and these genes may correspond to additional PTAs. The additional mRNAs that appeared in the heat-maps correspond to further PTAs that exhibited similar modulation. However, this set of potential PTAs was not studied further.

The tissue and organ representation of PTAs coded by these mRNAs were identified through BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>) and/or SOURCE (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) databases.

miRNAs differentially expressed in mTECs of newborn and five-week-old mice

A majority of the 717 miRNAs tested in BALB/c or NOD mice presented a control/test ratio ≈ 1.0 (Pearson correlation) and were considered unchanged. Fig. 3 shows the set of miRNAs that were significantly modulated in mTECs from NB to 5WE mice. There were 56 miRNAs differentially expressed in NOD and 35 in BALB/c mice.

Gene networking for miRNA–mRNA target prediction

We used the data set encompassing the 8166 differentially expressed mRNAs for NOD and 7584 mRNAs for BALB/c. The mRNA data and the miRNAs data that were differentially expressed between NB and 5WE mice were re-analyzed using the GenMir++ algorithm to construct miRNA–mRNA interaction networks. From the sets of miRNAs, there were 24 that established a total of 3820 interactions with 481 mRNAs (NOD strain) and only 5 established a total of 393 interactions with 221 mRNAs (BALB/c strain). These results show that miRNAs interacted with several mRNA targets. Figs. 4 and 5 illustrate such interaction networks and show the participation of the 24 miRNAs (NOD strain) and the 5 miRNAs (BALB/c strain) with a subset of their mRNA targets. MiR-155 and two targets (Ghr and Gabrb2) are highlighted in the network of the NOD strain and were validated through luciferase reporter assays. The only exception found was miR-760, which established interactions with five exclusive mRNAs in the NOD strain network (Fig. 4). None of the mRNAs that code Aire-dependent PTAs (Anderson et al. 2002), although present in the input microarray dataset, was included in the resulting network of the NOD strain. Additionally, only two (Igf2 and Lalba) were included in the network of the BALB/c strain (Fig. 5).

The luciferase reporter assay confirmed the predicted occurrence of miRNA–mRNA interactions using the GenMir++ algorithm for Ghr and Gabrb2 mRNA targets. We confirmed that miR-155 interacts with both mRNAs by hybridization with their respective 3'UTR sequences containing the predicted binding sites for these miRNAs. The introduction of point mutations into the 3'UTR targeted sequences significantly abolished miRNA hybridization (Fig. 6).

Fig. 2. Hierarchical clustering and color heat-map of mTEC cells isolated from newborn (NB) and five-week-old (5WE) BALB/c (A) or NOD (B) mice based on microarray profiling. This figure shows that expression of both Aire-dependent (*) and Aire-independent PTA mRNAs was changed in NB to 5WE mice.

Discussion

The expression of peripheral tissue antigen (PTA) genes by medullary thymic epithelial (mTEC) cells is a phenomenon termed promiscuous gene expression. This promotes the presentation of self-peptide antigens and guarantees negative selection of autoreactive thymocytes before these cells reach the periphery. Consequently, this phenomenon contributes to self-tolerance and prevents autoimmune diseases (Klein and Kyewski 2000; Derbinski

et al. 2001; Mathis and Benoist 2004; Magalhães et al. 2006; Su and Anderson 2004).

The Aire gene plays a role as a transcriptional controller for a large set of PTAs. A deficiency in Aire expression is strongly associated with reduced expression of PTAs (Kont et al. 2008; Fornari et al. 2010; Donate et al. 2011; Giraud et al. 2012).

It is now clear that the expression of PTAs in the thymus, which represents virtually all tissues and organs, is important for maintaining immune homeostasis (Klein et al. 2014). A failure in this

Fig. 3. Hierarchical clustering and color heat-map of miRNAs of mTEC cells isolated from newborn (NB) and five-week-old (5WE) BALB/c (A) or NOD (B) mice based on microarray profiling. This figure shows that expression of miRNAs was changed in NB to 5WE mice.

process can lead to a loss of self-tolerance and cause aggressive autoreactivity, which is clinically manifested as autoimmune diseases. T1D is a form of autoimmune disease in which clones of autoreactive T cells, mainly CD4⁺ and CD8⁺ T cells, escape from thymic negative selection and cause insulinitis by destroying the insulin-producing pancreatic beta cells. T1D is a genetically determined autoimmune disease that is strongly influenced by MHC. It is manifested in humans beginning in childhood or adolescence and is observed in NOD mice within eight months of age (Atkinson and Leiter 1999; Taniguchi and Anderson 2011; Metzger and Anderson 2011; Castano and Eisenbarth 1990; Serreze and Leiter 1994).

Several abnormalities were described in the thymic stroma of NOD mice including thymic stromal medulla disorganization (Fletcher et al. 2011; Thayer et al. 2010) and impaired migration of thymocytes preceding the onset of T1D (Driver et al. 2011).

Abnormalities were also observed in the gene expression levels of the thymic stroma. Both reduced Aire and reduced PTA expression were found preceding the onset of T1D in NOD mice (Fornari et al. 2010) or CIA in DBA-1/J mice (Donate et al. 2011). As previously reviewed (Fletcher et al. 2011), the reduction of Aire expression is also associated with systemic and organ-specific autoimmunity in addition to mildly abnormal structural defects (Fletcher et al. 2009; Fornari et al. 2010; Atlan-Gepner et al. 1999; Mendes-da-Cruz et al. 2008). There is interdependence between the transcriptional expression of Aire and PTAs (Oliveira et al. 2013).

In this study, we examined the other molecular abnormalities in the thymus that might be associated with the loss of self-tolerance. In addition to the deregulation of Aire that we have previously demonstrated (Fornari et al. 2010; Donate et al. 2011), we

examined what contributed to the downregulation of PTA genes in the thymic stroma.

To address this question, we employed the NOD mouse as a model system because these animals spontaneously develop autoimmune diabetes in an age-dependent manner. We then used microarrays to screen the transcriptome (mRNAs) and miRnome (miRNAs) of mTECs isolated from these mice.

We previously observed that Aire gene expression in the thymic stroma only varies between pre- and diabetic NOD mice (Fornari et al. 2010). Thus, comparing only pre-diabetic NB and 5WE NOD mice in which the expression of Aire was unchanged allowed us to exclude the possible influence of transcriptional variations of Aire.

Self-tolerance is lost in these animals and autoreactive CD8⁺ T cells infiltrate their pancreatic islets during the period between birth and 4–5 weeks of age. However, most pancreatic beta cells are still preserved at this phase and animals remain clinically healthy in a pre-diabetic condition (Castano and Eisenbarth 1990).

Aire gene expression does not change during this phase life, and the downregulation of Aire-dependent PTAs was unexplained. However, this finding motivated us to hypothesize that miRNAs might be controlling gene expression in an autoimmune mouse strain because these molecules play an important role as general post-transcriptional negative controllers (Lodish et al. 2008; Dai and Ahmed 2011; Baumjohann and Ansel 2013). Previous observations have indicated the involvement of miRNAs in the organization of architecture and cellularity of the thymus (Zuklys et al. 2012; Ucar et al. 2013; Khan et al. 2014). However, which miRNAs and targets affect the organs of autoimmune and non-autoimmune mice are unknown. It is conceivable that the manipulations performed in

Fig. 6. Luciferase reporter gene assay. pMIR-Ghr and pMIR-Ghr(m) 3'UTR luciferase plasmids were co-transfected with control or miR-155 mimic (A), and pMIR-Gabrb2 and pMIR-Gabrb2(m) with control or miR-155 mimic (B) into HEK-293 cells. Luciferase activity was evaluated at 24 h post-transfections. These data are presented as means with standard error of mean (SEM). The differences were evaluated by a one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. $N = 3$; means $\pm$ standard error of the mean $p < 0.001$ were considered statistically significant when the wild-type pMIR was compared to the mutant mismatch sequence (m) in the presence of the respective miRNA mimic.

the thymus for mTEC separation could alter the mRNA and miRNA expression profiles. However, to work with a preparation enriched to a maximum of mTEC cells it was necessary to use this procedure that is the most accessible at the time.

Therefore, we analyzed a set of 717 murine miRNAs (www.microrna.org). We found a set of miRNAs was differentially modulated between NB and 5WE mice.

Although there are useful databases that show the predicted mRNA targets of miRNAs such as miRBase (www.mirbase.org), TargetScan (www.targetscan.org), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), MicroCosm (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets) and microRNA.org (www.microrna.org) among others, we realize that each particular biological system studied should exhibit specific interactions between miRNAs and mRNAs. These interactions depend on the normal, pathological or physiological condition and/or the phase of the cell cycle.

The occurrence of specific miRNA–mRNA interactions of different biological systems should be investigated.

For this reason, we used the GenMir++ algorithm (Huang et al. 2007), which was specifically developed to predict possible miRNA–mRNA interactions from actual microarray expression data using a network. This finding allowed us to observe which miRNAs control PTAs in mTECs and how they affect the expression levels of these mRNAs.

Furthermore, our analyses were based on the profile of differentially expressed genes rather than modular transcriptional analyses. This approach was intentional because it was necessary to pinpoint the genes encoding PTAs and select the genes that are Aire dependent.

Importantly, the ectopic expression of PTA genes in mTEC cells makes sense when we consider these cells play a role as antigen-presenting cells and the encoded proteins are fragmented into

antigenic peptides to be presented via class II MHC to developing thymocytes within the thymus.

The reconstructed post-transcriptional interaction networks show that in mTECs of NB to 5WE NOD or BALB/c mice, there are only a few miRNAs that have established interactions with hundreds of mRNA targets. This finding indicates that one given miRNA established several PTA mRNA target interactions. Thus, due to imprecise base-pair annealing between the seed sequence of miRNAs and the 3' UTR of target mRNAs in mammalian cells (He and Hannon 2004; Xiao and Rajewsky 2009; Virts and Thoman 2010; Palmero et al. 2011; Bartel 2009; Elton et al. 2011), the number of mRNAs that are targets of miRNAs in these cells is increased.

This finding confirmed our starting hypothesis, which was broader in its conception. The PTA mRNAs are controlled by miRNAs in mTECs. This result could strengthen our hypothesis because the downregulation of these targets might contribute to loss of self-tolerance in NOD mice.

Of the many miRNA–mRNA interactions observed in NOD mice, we highlighted miR-300 because it interacted with the largest number of targets (300 mRNAs). Additionally, we found that miR-760 was an exception because it interacted with a reduced number of targets (5 mRNAs) that were exclusive and did not interact with any other miRNA. The participation of miR-155 is interesting and somewhat expected because it has been previously identified as a multifunctional controller miRNA (Faraoni et al. 2009).

We were interested in the results because the Aire-dependent PTAs so far described (Anderson et al. 2002) were not included in the interaction network of NOD and only two were found in BALB/c mice. There are 30 known Aire-dependent PTAs, and all were represented in the microarray used in this study. We found that there were 17 modulated in BALB/c and 19 in NOD. However, none of the genes expressed in NOD mice interacted with miRNAs. The data are more interesting when we consider our recent observation that subtle variations in the expression of Aire in mice can also lead to dysregulation of PTAs.

The reconstructed post-transcriptional networks based on actual microarray data revealed the occurrence of miRNA–PTA mRNA interactions. These findings might represent a negative control of self-tolerance because they involve a large set of PTAs.

The results obtained with the NOD strain changed our hypothesis because none of the PTAs included in the network were Aire dependent. Only two Aire-dependent PTA mRNAs (Igf2 and Lalba) were included in the network of BALB/c mice. While our hypothesis was not entirely true, our results allowed a new view that may be even more interesting. These genes demonstrate that refractoriness of Aire-dependent PTAs to miRNA interaction is not restricted to aggressive autoimmunity and is more comprehensive.

We presume this process must be important to ensure the translation of autoantigen mRNAs into proteins in mTECs.

Thus, we developed a subsequent hypothesis that can guide further research on the precise cause for these missing mRNAs. The seed sequence of miRNAs anneals with the complementary 3'UTR of mRNA targets and changes may occur in this portion of Aire-dependent mRNAs and hinder miRNA interactions. This hypothesis is supported by the previous observations that the 3'UTR portion of mRNAs of proliferating immune system cells can be shortened and can control the interaction with miRNAs (Sandberg et al. 2008).

As the expression of PTA mRNAs (and consequently the respective proteins) in mTECs ensures negative selection of autoreactive thymocytes, the mechanisms that impede the regulatory action of miRNAs may be acting in these cells. This is an important question regarding the molecular control of self-tolerance in the thymus that remains to be answered.

Authorship

CM: conceived the study, performed the microarray experiments, data analysis and network reconstructions; EHO: performed mTEC cell separations, microarray experiments and data analysis; RSA, TAF and NP: performed mTEC cell separations; PBD: performed cloning of 3'UTRs and luciferase reporter assays; ETS: conceived the microarray experiments; EAD: conceived the study and microarray experiments, GAP: conceived the study and microarray experiments, conceived the analytical tools, keep up the data analysis, conceived the network reconstructions and wrote the manuscript.

Conflict of interest

Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Dr. Yara Lucisano Valin and Dr. Ana Elisa Azzolini from the University of São Paulo (USP) at Campus of Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil helped us during the use of the luminometer apparatus. Mr. Derek Gilchrist from the University of Glasgow (UK) gave us advice during the process for cloning of 3'UTRs. This study was funded by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Projects Nos. 08/56594-8 and 13/17481-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília) (Grant No. 306315/2013-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília) (Grant No. CAPES-PROEX/2012), Núcleo de Apoio a Pesquisa em Doenças Inflamatórias (NAP-DIN, USP, Ribeirão Preto) (Grant No. NAP-USP/2011), FAPESP-CEPID Doenças Inflamatórias (Project No. 13/08216-2).

References

- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D., 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140, 123–135.
- Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Derich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by aire protein. *Science* 298, 1395–1401.
- Anderson, M.S., Bluestone, J.A., 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 447–485.
- Atkinson, M.A., Leiter, E.H., 1999. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat. Med.* 5, 601–604.
- Atlan-Gepner, C., Naspetti, M., Valéro, R., Barad, M., Lepault, F., Viallet, B., Naquet, P., 1999. Disorganization of thymic medulla precedes evolution towards diabetes in female NOD mice. *Autoimmunity* 31, 249–260.
- Bartel, D.C., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Baumjohann, D., Ansel, K.M., 2013. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 666–678.
- Björns, P., Halonen, M., Palvimäki, J.J., Kolmer, M., Aaltonen, J., Ellonen, P., Perheentupa, J., Ullmanen, I., Peltonen, L., 2000. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy protein. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 378–392.
- Castano, L., Eisenbarth, G.S., 1990. Type-1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human mouse, and rat. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 647–679.
- Dai, R., Ahmed, S.A., 2011. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl. Res.* 157, 163–179.
- Danso-Abe, D., Humblet-Baron, S., Dooley, J., Liston, A., 2011. Models of Aire-dependent gene regulation for thymic negative selection. *Front. Immunol.* 2, 1–8.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Derbinski, J., Gähler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhan, M., Peltonem, L., Walter, J., Kyewski, B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33–45.
- Donate, P.B., Fornari, T.A., Junta, C.M., Magalhães, D.A., Macedo, C., Cunha, T.M., Nguyen, C., Cunha, F.Q., Passos, G.A., 2011. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. *Immunobiology* 216, 591–603.
- Driver, J.P., Serreze, D.V., Chen, Y.G., 2011. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin. Immunopathol.* 33, 67–87.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14863–14868.
- Elton, T.S., Martin, M.M., Sansom, S.E., Belevych, A.E., Györke, S., Terentyev, D., 2011. miRNAs got rhythm. *Life Sci.* 88, 373–383.
- Faraoni, I., Antonetti, F.R., Cardone, J., Bonmassar, E., 2009. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 497–505.
- Fletcher, A.L., Seach, N., Reiseger, J.J., Lowen, T.E., Hammett, M.V., Scott, H.S., Boyd, R.L., 2009. Reduced thymic Aire expression and abnormal NF- κ B2 signaling in a model of systemic autoimmunity. *J. Immunol.* 182, 2690–2699.
- Fletcher, A.L., Calder, A., Hince, M.N., Boyd, R.L., Chidgey, A.P., 2011. The contribution of thymic stromal abnormalities to autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 31, 171–187.
- Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M., Magalhães, D.A., Passos, G.A., 2010. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell. Biochem.* 342, 21–28.
- Giraud, M., Yoshida, H., Abramson, J., Rahl, P.B., Young, R.A., Mathis, D., Benoist, C., 2012. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 535–540.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenhan, M., Kyewski, B., 2004. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* 199, 155–166.
- Gray, D.H., Chidgey, A.P., Boyd, R.L., 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260, 15–28.
- Griffiths-Jones, S., 2006. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol.* 342, 129–138.
- Griffiths-Jones, S., 2010. miRBase: microRNA sequences and annotation. In: *Current Protocols in Bioinformatics*, pp. 1–10 (Chapter 12, Unit 12.9).
- He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.
- Hollander, G.A., 2007. Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat. Immunol.* 8, 234–236.
- Huang, J.C., Morris, Q.D., Frey, B.J., 2007. Bayesian inference of microRNA targets from sequence and expression data. *J. Comput. Biol.* 14, 550–563.
- Irla, M., Hughes, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Hollander, G.A., Reith, W., 2008. Autoantigen-specific interactions with CD4⁺ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* 29, 451–463.
- Khan, I.S., Taniguchi, R.T., Fasano, K.J., Anderson, M.S., 2014. Canonical microRNAs in the thymic epithelial cells promote central tolerance. *Eur. J. Immunol.* 44, 1313–1319.
- Klein, L., Kyewski, B., 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 179–186.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., Hoquist, K.A., 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377–391.
- Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H.S., Peterson, P., 2008. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* 45, 25–33.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., Klein, L., 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol.* 23, 364–371.
- Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 688–698.
- Kyewski, B., Klein, L., 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571–606.
- Lima, F.A., Moreira-Filho, C.A., Ramos, P.L., Brentani, H., Lima, L.A., Arrais, M., Benito-de-Souza, L.C., Bento-de-Souza, L., Duarte, M.J., Coutinho, A., Carneiro-Sampaio, M., 2011. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J. Immunol.* 187, 3422–3430.
- Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., Chen, C.Z., 2008. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 120–130.
- Macedo, C., Evangelista, A.F., Magalhães, D.A., Fornari, T.A., Linhares, L.L., Junta, C.M., Silva, G.L., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Savino, W., Passos, G.A., 2009. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Immunol.* 46, 3240–3244.
- Macedo, C., Evangelista, A.F., Marques, M.M., Octacílio-Silva, S., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., 2013. Autoimmune regulator (Aire) controls the expression of microRNAs in medullary thymic epithelial cells. *Immunobiology* 218, 554–560.
- Magalhães, D.A., Silveira, E.L., Junta, C.M., Sandrin-Garcia, P., Fachin, A.L., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., 2006. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* 13, 81–99.
- Mathis, D., Benoist, C., 2004. Back to central tolerance. *Immunity* 20, 509–516.
- Mendes-da-Cruz, D.A., Smaniotto, S., Keller, A.C., Dardenne, M., Savino, W., 2008. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J. Immunol.* 180, 4639–4647.
- Metzger, T.C., Anderson, M.S., 2011. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol. Rev.* 241, 89–103.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito,

- F., Shimizu, N., 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 17, 393–398.
- Oliveira, E.H., Macedo, C., Donate, P.B., Almeida, R.S., Pezzi, N., Nguyen, C., Rossi, M.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Passos, G.A., 2013. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). *Immunobiology* 218, 96–104.
- Palmero, E.I., de Campos, S.G., Campos, M., de Souza, N.C., Guerreiro, I.D., Carvalho, A.L., Marques, M.M., 2011. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet. Mol. Biol.* 34, 363–370.
- Papadopoulos, A.S., Dooley, J., Linterman, M.A., Pierson, W., Ucar, O., Kyewski, B., Zuklys, S., Hollander, G.A., Matthys, P., Gray, D.H., De Strooper, B., Liston, A., 2011. The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor. *Nat. Immunol.* 13, 181–187.
- Ramsey, C., Winquist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., Peltonen, L., 2002. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum. Mol. Genet.* 11, 397–409.
- Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., Burge, C.B., 2008. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3'UTRs and fewer microRNA target sites. *Science* 320, 1643–1647.
- Serreze, D.V., Leiter, E.H., 1994. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 900–906.
- Skogberg, G., Lundberg, V., Lindgren, S., Gudmundsdottir, J., Sandstrom, K., Kampe, O., Anneren, G., Gustafsson, J., Sunnegardh, J., van der Post, S., Telemo, E., Berglund, M., Eklund, O., 2014. Altered expression of autoimmune regulator in infant Down syndrome thymus, a possible contributor to an autoimmune phenotype. *J. Immunol.* 193, 2187–2195.
- Su, M.A., Anderson, M.S., 2004. Aire: an update. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 746–752.
- Su, M.A., Giang, K., Zumer, K., Jiang, H., Oven, I., Rinn, J.L., Devoss, J.J., Johannes, K.P., Lu, W., Gardner, J., Chang, A., Bubulya, P., Chang, H.Y., Peterlin, B.M., Anderson, M.S., 2008. Mechanisms of an autoimmunity syndrome in mice caused by a dominant mutation in Aire. *J. Clin. Invest.* 118, 1712–1726.
- Taniguchi, R.T., Anderson, M.S., 2011. The role of Aire in clonal selection. *Immunol. Cell Biol.* 89, 40–44.
- Thayer, T.C., Wilson, S.B., Mathews, C.E., 2010. Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 39, 541–561.
- Takahama, T., 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 127–135.
- Ucar, O., Tykocinski, L.O., Dooley, J., Liston, A., Kyewski, B., 2013. An evolutionarily conserved mutual interdependence between Aire and microRNAs in promiscuous gene expression. *Eur. J. Immunol.* 43, 1769–1778.
- Villaseñor, J., Besse, W., Benoist, C., Mathis, D., 2008. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15854–15859.
- Virts, E.L., Thoman, M.L., 2010. Age-associated changes in miRNA expression profiles in thymopoiesis. *Mech. Ageing. Dev.* 131, 743–748.
- Xiao, C., Rajewsky, K., 2009. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136, 26–36.
- Zuklys, S., Mayer, C.E., Zhanybekova, S., Stefanski, H.E., Nusspaumer, G., Gill, J., Barthlott, T., Chappaz, S., Nitta, T., Dooley, J., Nogales-Cadenas, R., Takahama, Y., Finke, D., Liston, A., Blazar, B.R., Pascual-Montano, A., Holländer, G.A., 2012. MicroRNAs control the maintenance of thymic epithelia and their competence for T lineage commitment and thymocyte selection. *J. Immunol.* 189, 3894–3904.