

Análise do repertório dos receptores de linfócitos T expressos por células TCD8+ em camundongos FONX1CreERT2Dicerflox/flox

José F. Teixeira da Silva Santos*, Ana C. Medina Guillen, Alessandro dos Santos Farias, Carolina Francelin

Resumo

Os precursores de linfócitos T saem da medula óssea e migram para o timo, aonde completam seu desenvolvimento e tornam-se linfócitos simples positivos CD4+ ou CD8+ cujos TCRs não são capazes de reconhecer o antígeno próprio. Para isso, os linfócitos passam pelo processo de tolerância central que é mediado pelas células epiteliais tímicas medulares as quais apresentam antígenos restritos aos tecidos para o linfócito duplo positivo em desenvolvimento. O linfócito cujo receptor reconhece o antígeno próprio com alta afinidade é eliminado por apoptose. A literatura demonstra que a apresentação de antígenos próprios no timo é mediada pelo fator de transcrição Aire que coordena a expressão de microRNA. Neste trabalho, buscamos avaliar a participação dos microRNAs no processo de tolerância central através da análise do perfil dos receptores de linfócitos T em células TCD8+ de camundongos cujas células epiteliais tímicas não apresentam microRNAs. Nossos resultados demonstram que há aumento na porcentagem de células expressando determinados receptores de linfócitos T no baço de camundongos sem microRNA quando comparado aos dados de camundongos selvagens.

Palavras-chave: Tolerância central, microRNA, linfócito T

Introdução

Uma das funções dos linfócitos é reconhecer peptídeos de agentes invasores. Durante o processo de amadurecimento os linfócitos são submetidos a triagem, migrando através do epitélio tímico. O principal processo de triagem pelo qual os linfócitos em desenvolvimento passam é a seleção negativa, onde as células epiteliais tímicas medulares (mTECs) apresentam antígenos próprios aos linfócitos, e aqueles linfócitos cujo TCR apresenta grande afinidade pelo complexo antígeno próprio-MHC são induzidos à apoptose afim de evitar respostas auto-ímmunes. Os linfócitos que passam por essa triagem tornam-se maduros, e podem deixar o timo e agir na periferia contra patógenos portando variadas cadeias de TCR. A apresentação de antígenos próprios pelas mTECs é controlada pelo modulador da transcrição *Autoimmune regulator* (Aire)². Uma das moléculas essenciais para o procedimento da tolerância central é o microRNA (miRNA), que é um pequeno RNA, não-codificante cuja função é regulatória a nível pós-transcricional da expressão gênica, e sua geração é dependente da enzima Dicer, que forma o miRNA maduro³. A literatura demonstra que a expressão da proteína FOXN1 (Forkhead hox protein N1) é um regulador-chave para o desenvolvimento de TECs. Desta forma, criamos camundongos FOXN1^{CreERT2}Dicer^{flox/flox}, cujas células epiteliais tímicas tiveram Dicer depletado após a injeção de tamoxifeno. Sabendo que o processo de tolerância central é mediado pelas mTECs através da expressão de TRAs que são regulados por miRNAs; o foco desta pesquisa foi analisar o repertório das cadeias b dos TCR nos linfócitos TCD8+ em camundongos com e sem a expressão de Dicer no epitélio tímico.

Resultados e Discussão

Para nossas análises, geramos camundongos FONX1^{CreERT2}Dicer^{flox/flox}. Os camundongos receberam tamoxifeno a partir do primeiro dia de vida até o dia anterior ao sacrifício para experimento seguindo protocolo padronizado em nosso laboratório. Após a eutanásia, o timo desses animais foi retirado para obtenção do dado de índice tímico e o baço foi processado rotineiramente para

análise do repertório do TCR com 15 cadeias beta diferentes, por meio de citometria de fluxo com o painel CD3 (V500), CD4 (APC) e CD8 (PE). Os dados de citometria foram analisados no programa FlowJo e os gráficos e análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad. Os resultados foram analisados comparando os dados obtidos de camundongos cujas células epiteliais tímicas expressavam dicer (FOXN1 WT) com camundongos cujas células não apresentavam dicer (FOXN1 HT e M). A análise da citometria revelou que a houve alterações na porcentagem de linfócitos TCD4+ expressando determinados TCRs dos 15 tipos analisados em camundongo que não expressa dicer em relação ao selvagem. Uma vez que as porcentagens de alguns TCRs foi alterada nos camundongos sem dicer em relação ao selvagem, pode-se dizer que houve um descontrole da seleção desses linfócitos no timo. Sabendo que a ausência de Dicer interfere diretamente na maturação e desenvolvimento de miRNAs, estes resultados mostram que os miRNAs são importantes para a seleção do linfócito T, para que a tolerância central possa agir de forma funcional resultando na apoptose de linfócitos T autorreativos.

Conclusões

A deleção de Dicer nas TECs altera o repertório do TCR em células T CD8+ do baço, indicando a participação dos miRNAs no processo de seleção negativa. Nossos estudos estão em andamento para melhor entendimento sobre a quebra da tolerância central na ausência de miRNA.

Agradecimentos

FAPESP #2015/10107-2

1 Kyewski, B. & Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 571–606 (2006). 2 Chen, C. Z., Schaffert, S., Fragoso, R., & Loh, C. (2013). Regulation of immune responses and tolerance: The micro RNA perspective. *Immunological reviews*, 253(1), 112-128. 3 Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Kung, A. L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., ... & Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*, 19(4), 489-501.