

Dissertação de Mestrado

BRUNA DE PAULA FONSECA E FONSECA

**PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1
NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA
ASMÁTICA**



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2006

PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA ASMÁTICA

BRUNA DE PAULA FONSECA E FONSECA

**Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Biológicas (Biofísica), Instituto
de Biofísica Carlos Chagas
Filho da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas
(Biofísica).**

Orientador: Dr. João Paulo de Biaso Viola

**Rio de Janeiro
Agosto
2006**

FONSECA, Bruna de Paula Fonseca e

Papel do fator de transcrição NFAT1 na regulação da resposta alérgica asmática / Bruna de Paula Fonseca e Fonseca. - Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2006.

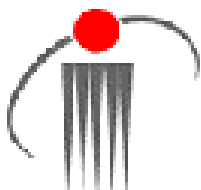
xiv, 116f.: il.; 1,5cm.

Orientador: João Paulo de Biaso Viola.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2006.

Referências Bibliográficas: f. 70-86.

1. Alergia 2. Asma 3. Resposta Imune 4. Broncoconstrição 5. NFAT. I. Viola, João Paulo de Biaso. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Papel do fator de transcrição NFAT1 na regulação da resposta alérgica asmática.



Este trabalho foi realizado na Divisão de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa (CPQ) no Instituto Nacional de Câncer (INCA), sob orientação do Dr. João Paulo de Biaso Viola. Este projeto foi financiado pelo CNPq, INCA/FAF e Furnas Centrais Elétricas S.A.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. João Viola, por ter acreditado no meu trabalho, por ter me ensinado o que realmente é ciência e por passar pra mim um pouco da paixão que você tem por ela. Obrigada pela paciência e placidez de sempre que eu um dia ainda aprendo a ter!

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, pelas grandes idéias tão importantes nas discussões sobre o trabalho, pelo apoio e estímulo durante o tempo em que estive em seu laboratório.

Aos meus pais, Kátia e Marcus, por simplesmente serem quem vocês são: meus exemplos de vida. Obrigada por ajudarem nos meus caminhos, nas minhas escolhas, pelos risos e choros juntos, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão Diego, pelo grande amigo que você é, pelo amor e carinho de sempre. Eu não poderia querer alguém melhor pra dividir meus pensamentos, minhas aflições, minha vida. Essa tese é também um pouco sua, pra variar os créditos das figuras são todos seus!!!

Às minhas irmãs Monique e Michele, por serem as melhores amigas que uma irmã pode querer! Que bom que a vida nos trouxe mais pra perto uma da outra, obrigada por estarem sempre torcendo por mim!

Aos meus avós, Affonso e Geisa, por serem mais que avós, por serem meus amigos! Obrigada pelos conselhos, pela ajuda de sempre, pelo carinho e pelo colo de Vô e Vó que eu tanto amo!

Ao André, meu gordinho, pelo amor, carinho, incentivo, paciência e por me mostrar um jeito diferente de viver a vida. Você é mesmo tudo que eu sempre quis...

Aos meus amigos de bancada que fazem o trabalho e a vida ficar no mínimo mais divertida! Bianca, que nos últimos tempos acabou virando minha

conselheira oficial, obrigada por estar sempre pronta pra me ajudar em qualquer circunstância! Margot, obrigada pela ajuda nos tempos difíceis e pela ótima companhia nas nossas noitadas!! Bruno, que se tornou um grande amigo, obrigada pelas conversas profundas sobre ciência ou sobre a vida e pela encheção de saco, claro!! Giu, figurinha rara, obrigada pelos papos e por essa alegria que você me passa a cada dia! Queridos, vocês moram no meu coração!!

A todo o pessoal do laboratório: Lílian, Nina, André, Natália, Maria Theresa e Cristiane. Obrigada pela ajuda na bancada e na vida!

À Erika, Priscilla e todo pessoal do laboratório de Inflamação, na Fiocruz. Meninas, obrigada pela grande ajuda nos experimentos finais da tese!!

À Amanda, Teresa e Michele, minhas grandes amigas. Longe ou perto, sempre arranjamos um jeito de estarmos juntas! Obrigada pela ajuda e pelos conselhos, essa tese, assim como eu, não seria a mesma sem vocês!

Às amigas de sempre, Verônica, Maria Clara e Elisa, nossa amizade é o maior presente que eu tenho! Obrigada pelo apoio, pela cumplicidade, vocês são minhas eternas amiguetes!

Aos amigos da geração de ouro da Biologia, Bruno, Patrícia, Maurício Mala, Paulinha e Layla. Obrigada por dividir as alegrias, tristezas, pela torcida pelo sucesso de cada um de nós, pelo que eu aprendi e aprendo com vocês, a Biologia me deu muitos mais que simples amigos...

À minha Dinda, Cintia, que é mesmo uma fada-madrinha! Obrigada pelo apoio, pela ajuda (mesmo quando eu reluto em aceitar) pelo amor e incentivo que você me dá, de perto ou de longe.

Aos meus tios dindos Alexandre e Gláucia, pelo carinho de sempre, por tornarem nossa família tão especial. Obrigada por estarem sempre por perto, torcendo por mim.

A minha prima Michele, que é a minha melhor amiga por telepatia. Obrigada por ser minha irmãzinha, pelos papos e conselhos mesmo a alguns quilômetros de distância, minhas saudades são eternas.

Aos meus priminhos (sempre pequenos!!!), Natasha, Lara, Pedro e Júlia pela amizade e amor que vocês me transmitem de perto ou de longe.

RESUMO

PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA ASMÁTICA

Bruna de Paula Fonseca e Fonseca

Orientador: João Paulo de Biaso Viola

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Apesar da hiper-reatividade brônquica ser uma característica marcante da asma, os mecanismos moleculares que a determinam ainda não estão completamente estabelecidos. Os principais receptores envolvidos no processo de broncoconstrição são os receptores muscarínicos. Esses receptores são ativados por acetilcolina e geram um influxo de Ca^{2+} intracelular que ativa os fatores de transcrição da família NFAT. Animais deficientes para NFAT1 (NFAT1^{-/-}) diferenciam-se preferencialmente para um fenótipo Th2 e apresentam uma resposta alérgica pleural exacerbada quando comparados aos animais NFAT1^{+/+}. Para estudar o papel do NFAT1 na patologia da asma alérgica e sua influência na hiper-reatividade brônquica, submetemos camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} a um modelo experimental de asma. Nestas condições, os camundongos NFAT1^{-/-} apresentaram resposta inflamatória eosinofílica exacerbada, altos níveis de IgE sérica, níveis aumentados de eotaxina, intenso infiltrado inflamatório e maior deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar quando comparados com os animais NFAT1^{+/+}. Apesar disso, a provocação alergênica nos camundongos NFAT1^{-/-}, ao contrário do observado nos camundongos selvagens, não produziu hiper-reatividade, já que os camundongos NFAT1^{-/-} foram claramente refratários ao broncoespasmo induzido pelo aerosol de metacolina. Experimentos com camundongos “naive” demonstraram que essa inibição ocorre de maneira intrínseca e independente do processo de sensibilização. Além disso, essa inibição é específica para a via colinérgica, já que camundongos NFAT1^{-/-} expostos a serotonina apresentaram taxas de hiper-reatividade claramente maiores comparadas às dos camundongos NFAT1^{+/+}. Esses resultados, em conjunto, mostram que o NFAT1 é extremamente importante na regulação da resposta alérgica asmática e essencial para a broncoconstrição induzida especificamente pela via colinérgica.

Palavras-chave: 1. Alergia 2. Asma 3. Resposta Imune 4. Broncoconstrição 5. NFAT

Rio de Janeiro

Agosto, 2006

ABSTRACT

ROLE OF NFAT1 TRANSCRIPTION FACTOR IN THE REGULATION OF ASTHMATIC ALLERGIC RESPONSES.

Bruna de Paula Fonseca e Fonseca

Orientador: João Paulo de Biaso Viola

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Despite being a marked feature of asthma, the molecular mechanisms that determine bronchial hyperreactivity are not completely established. The main receptors involved in the bronchoconstriction process are the muscarinic receptors. These receptors are activated by acetylcholine and generate a calcium influx that activates the NFAT family of transcription factors. NFAT1-deficient mice (NFAT1^{-/-}) preferentially differentiate towards a Th2 phenotype and present an increased pleural allergic response when compared with NFAT1^{+/+} mice. In order to study the role of NFAT1 in the pathology of allergic asthma and its influence in bronchial hyperreactivity, we took advantage of an experimental model of asthma. Under these conditions, NFAT1^{-/-} mice presented an exacerbated inflammatory eosinophilic response, high levels of serum IgE, high levels of eotaxin, intense inflammatory infiltrate and increased deposition of collagen fibers in the lung tissue when compared to NFAT1^{+/+} mice. Despite all that, allergenic provocation in NFAT1^{-/-} mice, in opposition to that observed in wild-type mice, did not produce hyperreactivity, once NFAT1^{-/-} mice were clearly refractory to the bronchospasm induced by methacholine aerosol. Experiments with naïve mice demonstrated that this inhibition occurs in an intrinsic way that is independent of the sensitization process. Besides, this inhibition seems to be specific for the cholinergic pathway, once NFAT1^{-/-} mice exposed to serotonin presented markedly increased hyperreactivity rates when compared to NFAT1^{+/+} mice. These results altogether show that NFAT1 is extremely important to the regulation of the asthmatic response and essential to the bronchoconstriction specifically induced by the cholinergic pathway.

Key-words: 1. Allergy 2. Asthma 3. Immune Response 4. Bronchoconstriction 5. NFAT

Rio de Janeiro

August, 2006

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Alergia.....	1
1.2 Asma.....	3
1.2.1 Bases genéticas e ambientais da asma.....	3
1.2.2 Bases imunológicas da asma.....	5
1.2.3 Fase imediata e fase tardia da resposta alérgica asmática.....	8
1.3 Fisiopatologia da asma.....	10
1.4 Mediadores da resposta asmática.....	13
1.4.1 Citocinas.....	13
1.4.2 Quimiocinas.....	15
1.4.3 Acetilcolina.....	16
1.4.3.1 Sinalização pelos mAChRs.....	18
1.4.3.2 Receptores muscarínicos no pulmão.....	19
1.4.3.3 Acetilcolina na asma.....	21
1.4.4 Serotonina.....	21
1.4.4.1 Serotonina na asma.....	22
1.5 Família NFAT.....	23
1.5.1 Fenótipo dos camundongos deficientes para NFAT.....	26
1.5.2 NFAT1 na resposta alérgica/asmática.....	27
1.6 Objetivos.....	29
1.6.1 Geral.....	29
1.6.2 Específicos.....	29

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Animais utilizados.....	30
2.2 Pleurisia.....	30
2.3 Cultura de células.....	30
2.4 Modelo experimental de asma.....	31
2.5 Lavado Broncoalveolar (BAL).....	31
2.6 Contagem diferencial de células.....	31
2.7 Análise de imunoglobulinas.....	32
2.8 Estimulação <i>in vitro</i>	32
2.9 Análise de citocinas e quimiocinas.....	32
2.10 Histopatologia.....	33
2.11 Análise da (hiper-) reatividade brônquica.....	33
2.12 RT-PCR.....	33
2.13 Análise estatística.....	34
2.14 Soluções e reagentes utilizados.....	35
2.14.1 PBS 1X.....	35
2.14.2 Ovalbumina.....	35
2.14.3 Solução de Turk.....	35
2.14.4 DMEM suplementado.....	35
2.14.5 Hidróxido de alumínio.....	36
2.14.6 Tampão de homogeneização.....	36
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	69

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. ANEXOS	87
7.1 Anexo I.....	87
TEIXEIRA, L.K., <u>FONSECA, B.P.F.</u> , VIEIRA DE ABREU, A., BARBOZA, B.A., ROBBS, B.K., BOZZA, P.T., VIOLA, J.P.B. IFN- γ production by CD8 T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. <i>J Immunol.</i> 175:5931-5939. 2005.	
7.2 Anexo II.....	97
TEIXEIRA L.K., <u>FONSECA, B.P.F.</u> , BARBOZA B.A., VIOLA, J.P.B. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 100: 137-144. 2005.	
7.3 Anexo III.....	106
VIOLA J.P.B., CARVALHO L.D.S., <u>FONSECA, B.P.F.</u> , TEIXEIRA L.K. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. <i>Braz J Med Biol Research</i> 38: 335-344. 2005.	

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

ADAM - Domínio de Disintegrina A e Metaloproteinase (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain)

APC - Células Apresentadoras de Antígeno (Antigen Presenting Cells)

BCG - Bacilo de Calmette-Guérin

BCR - Receptor de Células B (B Cell Receptor)

C5 - Fator 5 do sistema Complemento (Complement factor 5)

CD - Complexo de Diferenciação (Cluster of Differentiation)

CFA - Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant)

CRAC - Canais Ativados por Liberação de Cálcio (Calcium Release Activated Channels)

CsA - Ciclosporina A

DAG - *sn*-1,2-diacilglicerol

DPP - Dipeptidil Peptidase (Dipeptidyl Peptidase)

EPO - Peroxidase de Eosinófilos (Eosinophil Peroxidase)

FcR - Receptor de Fc

GM-CSF - Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor)

IFN - Interferon

IgE - Imunoglobulina E

IL - Interleucina

IL-4R - Receptor de IL-4

InsP₃ - inositol 1,4,5-trisfosfato

LT - Leucotrieno

mAChR - Receptor Muscarínico de Acetilcolina

MAP - Proteína Ativada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein)

MAPK - Quinase da Proteína Ativada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MBP - Proteína Básica Principal (Major Basic Protein)

MCP - Proteína Quimioatrativa de Macrófagos (Macrophage Chemoattractant Protein)

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

MIP - Proteína Inflamatória de Macrófagos (Macrophage Inflammatory Protein)

MUC - Mucina

nAChR - Receptor Nicotínico de Acetilcolina

NFAT - Fator Nuclear de Células T Ativadas (Nuclear Factor of Activated T cells)

NK - Natural Killer

OVA - Ovalbumina

PAF - Fator Ativador de Plaquetas (Platelet-Activating Factor)

PKA - Proteína Quinase A

PKC - Proteína Quinase C

PLC - Fosfolipase C

PtdIns(4,5)P₂ - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

RANTES - proteína Regulada durante a Ativação, Normalmente Expressa e Secretada por células T (Regulated on Activation, Normal T cell-Expressed, and Secreted protein).

RE - Retículo Endoplasmático

TCR - Receptor de Células T (T Cell Receptor)

TIM1 - Homólogo de Timeless, *Drosophila*

Th - Células T helper

TGF - Fator de Crescimento Tumoral (Tumor Growth Factor)

TNF - Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

VLA - Proteína de ativação tardia (Very Late Activation Protein)

VCAM - Molécula de Adesão de Células Vasculares (Vascular Cell Adhesion Molecule)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia

A palavra “alergia” foi originalmente utilizada por Von Pirquet (1906) para descrever “a habilidade de animais e humanos de desenvolverem respostas alteradas à substâncias estranhas após repetidas exposições”. Von Pirquet era pediatra e acreditava que essa reação alterada se manifestava através de mudanças do sistema imune do próprio paciente, potencializadas por influências externas tais como: alimentação, o ar respirado ou contato direto com a pele. Nascia aí o termo “alergeno” (substância responsável pela reação alterada). Alguns anos mais tarde, Prausnitz e Küstner (1921) demonstraram que a reatividade cutânea poderia ser passivamente transmitida para a pele de indivíduos saudáveis, através de injeções subcutâneas do soro de indivíduos alérgicos. A natureza do fator responsável por essa sensibilização passiva era desconhecida e esse fator foi posteriormente chamado “reagina” por Coca e Cooke (revisto em Johansson, 2002). Em 1967, a “reagina” foi identificada como uma imunoglobulina (Ig) por Ishizaka e colaboradores (1967a). Uma nova classe de imunoglobulinas foi então reconhecida, a IgE (Bennich *et al.*, 1968). A descoberta e isolamento da estrutura antigênica da IgE, introduziu uma nova dimensão à metodologia de estudo da alergia (Ishizaka *et al.*, 1967b). A partir deste momento passou a ser possível procurar por respostas imunes específicas – anticorpos do tipo IgE específicos para determinados alérgenos. Além disso, uma série de estudos confirmou o envolvimento de células do sistema imune no desenvolvimento de reações alérgicas, como os mastócitos e os eosinófilos (revisto em Johansson, 2002), colocando o sistema imune como peça-chave nas respostas alérgicas.

Enquanto a alergia era uma desordem rara na época de sua descoberta, atualmente quase metade da população dos países ditos “ocidentalizados” apresenta sensibilização a um ou mais alérgenos ambientais. Em países como a Inglaterra ou Austrália, isso se reflete em uma em cada quatro crianças menores de 14 anos sofrendo de asma e uma em cada cinco sofrendo de eczema (Beasley, 1998). Essa condição vem aumentando cada vez mais nos últimos 40 anos. Só nos Estados Unidos, de 1980 a 1994 a prevalência de asma aumentou 75% (Castro *et al.*, 2005).

Atualmente a alergia é considerada uma disfunção imunológica, que pode causar em indivíduos pré-dispostos (ou atópicos), uma resposta inflamatória local ou efeitos sistêmicos severos. As doenças alérgicas ou atópicas são fenômenos complexos, que induzem diversas manifestações patofisiológicas como aumento de permeabilidade vascular, vasodilatação, hiper-reatividade brônquica e inflamação local. O processo de sensibilização geralmente resulta do contato primário com o alérgeno, gerando uma resposta imune específica caracterizada pelo predomínio de citocinas produzidas por um subtipo de linfócitos CD4⁺ denominado T helper (Th)2 (Interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13) e produção de anticorpos do tipo IgE. Após reexposição, o alérgeno interage com a IgE, agora fixada na superfície de células-alvo, e dispara a liberação de uma série de mediadores responsáveis pelo desenvolvimento do quadro alérgico (revisto em Wills-Karp, 1999) (**Figura 1**).

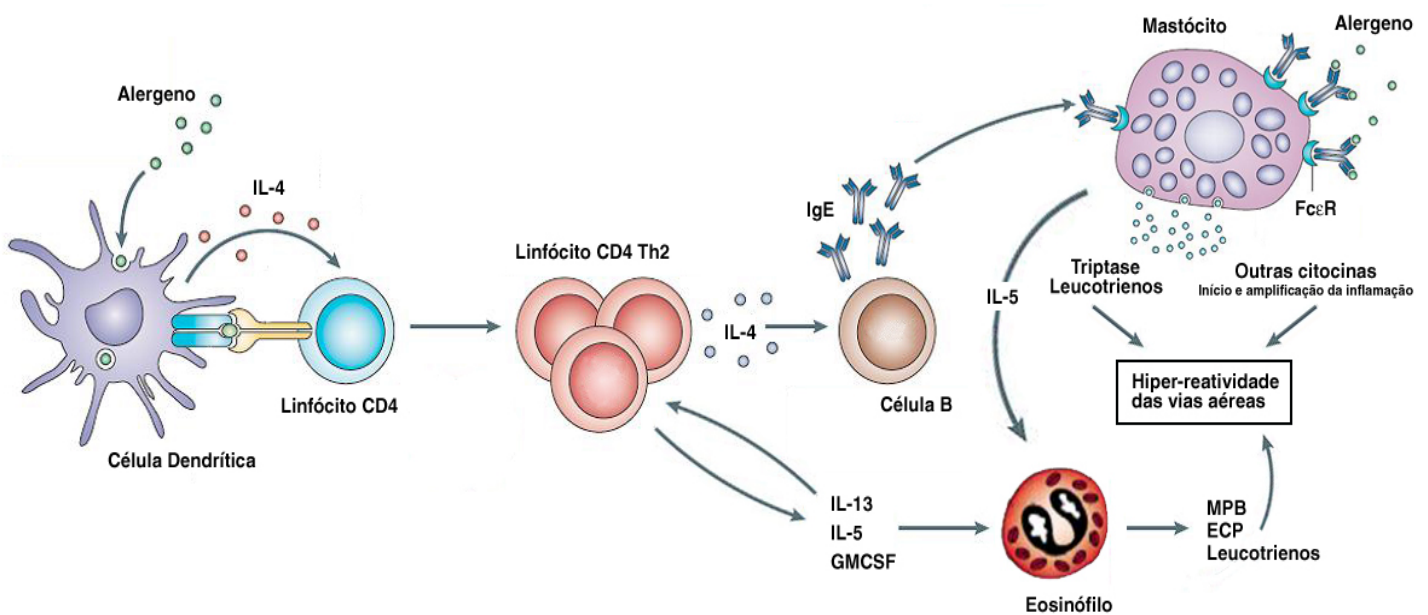


Figura 1: Eventos iniciadores da resposta alérgica. Os alérgenos são endocitados pelas células dendríticas e apresentados aos linfócitos T CD4⁺. As citocinas produzidas nesse microambiente induzem a diferenciação dos linfócitos CD4⁺ para um fenótipo Th2, gerando uma expansão dessa subpopulação. As células Th2 induzem então a mudança de classe de imunoglobulina para IgE pelos linfócitos B. Essa IgE alérgeno-específica se liga a receptores na superfície de mastócitos, e uma subsequente reexposição ao alérgeno leva à degranulação e liberação de moléculas pro-inflamatórias por essas células. Essas moléculas recrutam outras células inflamatórias, como os eosinófilos, os quais quando ativados também liberam mediadores inflamatórios. O conjunto desses mediadores presentes no microambiente pulmonar irá então culminar no fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas. Adaptado de Cookson, 2004.

1.2 Asma

A asma é uma manifestação alérgica caracterizada principalmente pela inflamação crônica da mucosa brônquica, níveis aumentados de IgE sérica e por uma hiper-reatividade das vias aéreas, culminando num fenômeno de obstrução intermitente destas vias (revisto em Corrigan & Kay, 1992). Estruturalmente, as vias aéreas de um indivíduo asmático são caracterizadas pela presença de inflamação crônica com infiltração intensa da mucosa brônquica por mastócitos, linfócitos e eosinófilos, juntamente com descamação do epitélio, hiperplasia das células caliciformes resultando na produção de grandes quantidades de muco e espessamento da submucosa pela deposição de colágeno (Cohn *et al.*, 1997; revisto em Wills-Karp, 1999).

Por muito tempo, a asma foi considerada uma doença totalmente reversível. Como consequência, a abordagem terapêutica para essa doença era focalizada no controle dos sintomas, através do alívio do broncoespasmo e redução da inflamação das vias aéreas. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que indivíduos asmáticos apresentam uma alta taxa de deterioração das funções respiratórias (Lange *et al.*, 1998). Hoje, a asma é considerada uma doença para a qual raramente existe cura, só controle.

1.2.1 Bases genéticas e ambientais da asma

A asma é uma doença multifatorial, uma vez que suas causas incluem tanto fatores ambientais quanto fatores genéticos. Essa predisposição genética para o desenvolvimento de uma resposta aumentada a aeroalergenos comuns tem sido alvo de diversos estudos. Até o momento 18 genes de susceptibilidade à asma foram identificados, revelando a complexidade e heterogeneidade dessa doença (Hoffjan & Obber, 2002). A região cromossômica mais estudada é o “cluster” de citocinas localizado no cromossomo 5q (genes da IL-4, 13, 9 e 15). Apesar de numerosos estudos, nem todos conseguiram comprovar e reproduzir a efetiva herdabilidade dos loci-candidatos identificados nessa região (revisto em Wills-Karp & Ewart, 2004). Nos últimos quatro anos, alguns grupos se dedicaram à identificação de novos genes de susceptibilidade à asma. Esses estudos resultaram na descoberta de 2 genes

associados à asma em humanos: *ADAM33*, uma metaloproteinase envolvida no remodelamento dos tecidos das vias aéreas; e *DPP10*, uma dipeptidase que especula-se ser moduladora da atividade de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ao clivar a porção N-terminal dessas proteínas (revisto em Wills-Karp & Ewart, 2004). Em camundongos, outros 2 genes foram considerados cruciais para a patogênese da asma: *Tim1*, uma proteína transmembrana expressa em linfócitos CD4⁺; e C5, o fator 5 do sistema complemento (revisto em Wills-Karp & Ewart, 2004).

Apesar dos fatores genéticos contribuírem para a susceptibilidade de um indivíduo à asma, em muitos casos para se manifestarem, eles precisam interagir com estímulos ambientais. Além disso, os fatores genéticos explicam parcialmente as grandes diferenças de incidência da asma entre países, mas não a crescente tendência de aumento da doença nas últimas décadas, especialmente nos países “ocidentalizados”. Os aspectos da vida “ocidental” responsáveis por esse aumento ainda não foram claramente definidos: poluição do ar, exposição doméstica a alérgenos derivados de ácaros, animais domésticos ou fungos, etc. No final dos anos 80, uma hipótese tornou-se bastante popular no intuito de explicar a alta prevalência de doenças atópicas em países desenvolvidos. Essa hipótese, chamada de hipótese da higiene, correlaciona doenças atópicas à falta de infecções na infância. A hipótese da higiene é derivada da observação da relação inversa entre a ocorrência de febre do feno e o tamanho familiar feita por David Strachan, em 1989. A febre do feno é um tipo de rinite alérgica sazonal que ocorre numa determinada época do ano, na primavera, quando ocorre a polinização. Os grãos de pólen estão intimamente relacionados aos sintomas dessa doença, enquanto o feno representa apenas uma pequena porcentagem responsável pela causa da doença. Essas substâncias entram em contato com a membrana mucosa dos olhos e nariz de indivíduos alérgicos, causando inflamação. Strachan pesquisou os arquivos médicos de 17.000 crianças inglesas e verificou que quanto maior o número de irmãos mais velhos que essas crianças tinham, menor era a susceptibilidade delas à febre do feno. Strachan sugeriu que os irmãos mais velhos estariam trazendo mais infecções virais para seus irmãos menores, tornando o sistema imune dessas crianças mais tolerante ao pólen (Strachan, 1989). A hipótese da higiene argumenta então que infecções desenvolvidas durante os primeiros anos da infância

inibem a tendência de desenvolvimento de doenças alérgicas (Strachan, 1989). Como consequência, crianças com estilo de vida “ocidentalizado”, protegidas das infecções que afetam as crianças nascidas em países em desenvolvimento, sofrem de um risco aumentado de desenvolverem doenças alérgicas. Isso aconteceria porque muitas das infecções comuns induzem uma forte resposta imune do hospedeiro caracterizada pela produção de IFN- γ , uma resposta típica mediada por linfócitos CD4⁺ do subtipo Th1. As respostas Th1 tendem a antagonizar o desenvolvimento de respostas Th2, mediadoras da resposta alérgica. Prescott e colaboradores (1998a) demonstraram que o sistema imune de crianças recém-nascidas possui um forte componente Th2 e que, posteriormente, esse viés Th2 diminui gradualmente durante os dois primeiros anos de vida em indivíduos não-alérgicos (Prescott *et al.*, 1998b). Em crianças alérgicas ocorre o contrário, há um aumento na intensidade das respostas do tipo Th2 ao longo do tempo (Prescott *et al.*, 1998b). Por essa razão especula-se que o sistema imune em desenvolvimento necessite de um estímulo Th1 do meio ambiente para evitar o desenvolvimento das doenças alérgicas (Wills-Karp *et al.*, 2001). Muitas infecções bacterianas e virais podem fornecer esse estímulo. De fato, a infecção com BCG (*Mycobacterium bovis*) atenua a asma experimental induzida em camundongos (Erb *et al.*, 1999). Esses dados sugerem que o fator etiológico chave nas doenças alérgicas pode não ser somente a aquisição inicial de uma resposta imune baseada no fenótipo Th2, mas também a eficiência dos mecanismos de equilíbrio da resposta imune (Prescott *et al.*, 1998a).

1.2.2 Bases imunológicas da asma

O processo inflamatório asmático se inicia como resultado de uma resposta imune exacerbada a alérgenos comumente inalados. Os principais iniciadores dessa resposta são os linfócitos T CD4⁺, essenciais na fase de sensibilização do indivíduo.

Os linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) apresentam em sua superfície o receptor de células T (TCR), que os torna células altamente específicas. Através do TCR, os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos de antígenos protéicos apresentados em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Estas

moléculas do MHC de classe II estão presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A apresentação do alérgeno para os linfócitos T CD4⁺ ocorre exatamente através da interação MHC-TCR. As APCs têm a capacidade de endocitar o alérgeno que penetrou no organismo pelo trato respiratório ou pele por exemplo, e degradá-lo em pequenos peptídeos no compartimento lisossomal. Posteriormente, esses peptídeos se ligam a moléculas de MHC de classe II, vindas do retículo endoplasmático (RE). Ao ser direcionado para a superfície da APC, o complexo MHC de classe II-peptídeo liga-se ao TCR da célula CD4⁺, fazendo com que ela seja ativada.

Os linfócitos T CD4⁺, após ativação, têm a capacidade de se diferenciar principalmente em duas classes de células Th com habilidades funcionais distintas, os linfócitos CD4⁺ do tipo Th1 e Th2 (Mosmann *et al.*, 1989). Essas duas classes de linfócitos CD4⁺ diferenciados produzem citocinas específicas e mutuamente exclusivas, influenciando a ativação e diferenciação de outros tipos celulares (Mosmann *et al.*, 1986; revisto em Abbas *et al.* 1996). Células do tipo Th1 caracterizam-se pela produção de IFN- γ , IL-2, e TNF β , enquanto células do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (revisto em Seder & Paul, 1994; Coffman *et al.*, 1988). As citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 funcionam de maneira autócrina, promovendo o desenvolvimento de seu próprio fenótipo, a IL-4 estimulando o fenótipo Th2 e o IFN- γ promovendo o fenótipo Th1. Além desse papel regulador positivo, as citocinas Th1 e Th2 também regulam negativamente o fenótipo oposto.

As células CD4⁺ diferenciadas para Th1 e Th2 exibem fatores de transcrição específicos e mutuamente exclusivos de seu fenótipo. O fator de transcrição GATA-3 é expresso durante o processo de diferenciação de células CD4⁺ para um fenótipo Th2 e tem a capacidade de transativar o promotor do gene de IL-4 *in vitro* (Zheng & Flavell, 1997; Ranganath *et al.*, 1998). O fator de transcrição GATA-3, além de extremamente importante na consolidação do fenótipo Th2, também controla a expressão de diversas citocinas típicas do fenótipo Th2, as quais são essenciais para a indução de inflamação alérgica *in vivo*. Outros fatores de transcrição também são importantes para o desenvolvimento do fenótipo Th2, como NFAT, AP-1 e a subunidade p50 do NF- κ B. Especificamente, células CD4⁺ de camundongos deficientes para p50 não induzem a

expressão de GATA-3 em condições Th2 de diferenciação (Das *et al.*, 2001). Células Th deficientes para NFAT2 produzem níveis diminuídos de citocinas do tipo Th2, enquanto células CD4⁺ deficientes para NFAT1 têm produção aumentada de citocinas do tipo Th2, sugerindo que esses fatores são especialmente importantes no desenvolvimento do fenótipo Th2 (Hodge *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Em oposição, o fator de transcrição T-bet é especificamente expresso em células CD4⁺ diferenciadas para Th1, mostrando-se um potente ativador do gene de IFN- γ (Szabo *et al.*, 2000). Apesar disso, os mecanismos moleculares de regulação da diferenciação Th1/Th2 por fatores de transcrição ainda não estão completamente elucidados.

A inflamação alérgica está fortemente associada aos linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2, uma vez que um padrão de citocinas do tipo Th2 foi associado à patogênese dessa doença (Renauld, 2001). De fato, números elevados de células Th2 foram identificados em fluidos de lavados broncoalveolares (BAL) e biópsias de vias aéreas de pacientes asmáticos. Além disso, nas vias aéreas de indivíduos asmáticos foram identificados níveis aumentados de expressão do mRNA para GATA-3 quando comparados com seus respectivos controles, que foram correlacionados com expressão aumentada de IL-5 (Nakamura *et al.*, 1999a). Quando uma proteína GATA-3 mutante, que atua como dominante negativo, é expressa especificamente em linfócitos T ocorre uma redução dos níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, típicas do fenótipo Th2, além de diminuição da produção de muco, síntese de IgE e eosinofilia nesses animais transgênicos (Zhang *et al.*, 1999). Similarmente, a administração intranasal de DNA anti-senso para GATA-3 reduz a inflamação das vias aéreas, hiper-reatividade e produção de muco num modelo experimental de asma em camundongos (Finotto *et al.*, 2001). Camundongos deficientes para T-bet apresentam diminuição da produção de IFN- γ e desenvolvem hiper-reatividade das vias aéreas espontaneamente (Finotto *et al.*, 2002). De forma similar, a expressão de T-bet em células CD4⁺ está diminuída no pulmão de indivíduos asmáticos, quando comparados com indivíduos saudáveis (Finotto *et al.*, 2002).

As principais citocinas produzidas pelas células Th2: IL-4, IL-5 e IL-13, são extremamente importantes no recrutamento e ativação de células efetoras relacionadas às respostas alérgicas, como eosinófilos e mastócitos. A IL-13 é responsável pela

hipersecreção de muco das glândulas da submucosa e/ou células caliciformes. A IL-4 e IL-5 aumentam a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, promovendo sua infiltração nos sítios inflamatórios ao regular moléculas de adesão na superfície dos eosinófilos (VLA-4) e do próprio endotélio (VCAM-1). A IL-4 também é essencial para a diferenciação de linfócitos CD4⁺ para um fenótipo Th2 e para a diferenciação de mastócitos, além de ser caracterizada como um indutor da mudança de classe de imunoglobulinas para IgE em linfócitos B (revisto em Gould *et al.*, 2003).

Essa IgE secretada por linfócitos B ativados é direcionada para a corrente sanguínea e liga-se a receptores de Fc específicos (FcεR) na superfície de mastócitos teciduais ou basófilos sangüíneos. A partir desse momento, essas células estão preparadas para serem ativadas por antígenos/alergenos, tornando o indivíduo sensibilizado para aquele determinado antígeno específico.

1.2.3 Fase imediata e fase tardia da resposta alérgica asmática

A resposta alérgica asmática pode ser dividida em duas fases distintas: uma imediata, caracterizada pela degranulação de mastócitos, aumento da permeabilidade vascular e edema; e uma tardia, que começa a se desenvolver 5-6h após contato com o alérgeno, sendo caracterizada por infiltrado de células inflamatórias, principalmente linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (**Figura 2**).

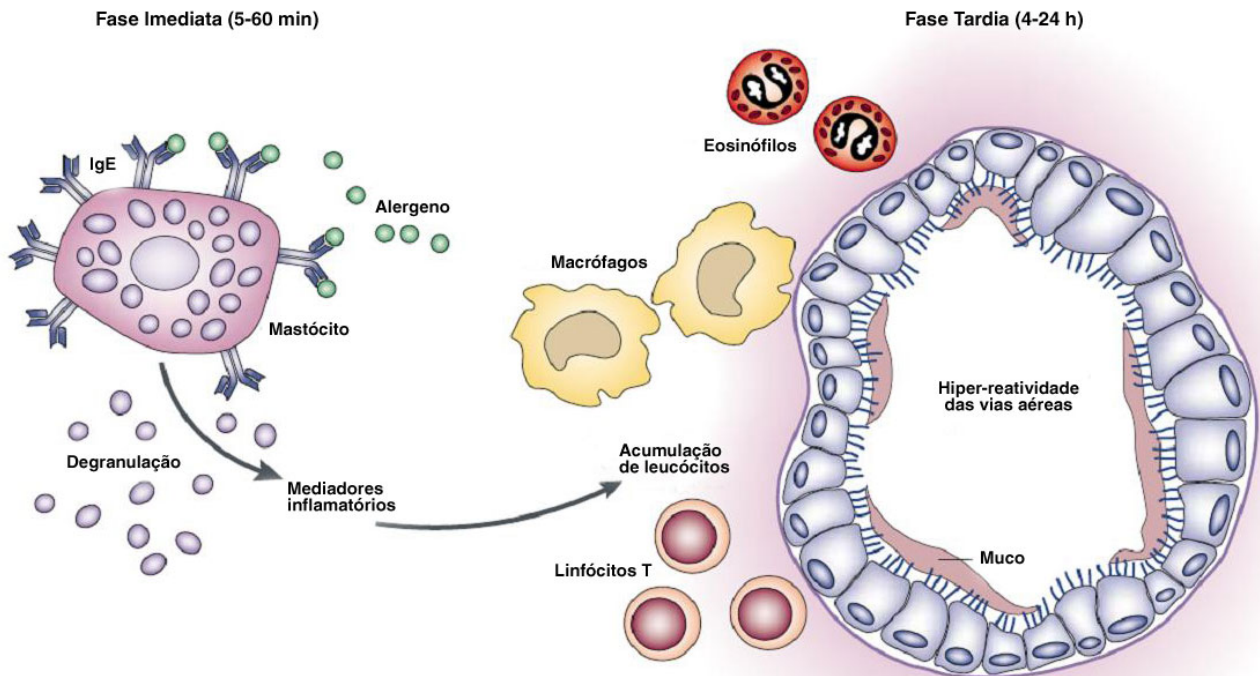


Figura 2: Fases da resposta asmática. A asma pode ser dividida em duas fases distintas. A fase imediata ocorre rapidamente após a exposição ao alérgeno, induzindo degranulação de mastócitos, causando liberação de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, mudanças nas funções das vias aéreas. Os mediadores liberados durante a fase imediata causam progressão para a fase tardia da resposta imune contra esse determinado alérgeno. A fase tardia é geralmente mais severa e caracterizada pelo acúmulo de células mononucleares (monócitos e linfócitos), bem como de eosinófilos. Os tipos celulares que se acumulam durante a fase tardia estão associados com disfunção e dano prolongado das vias aéreas. Adaptado de Lukacs, 2001.

A fase imediata inicia-se após a sensibilização, quando ocorre uma reexposição ao alérgeno. Ele interage com duas moléculas de IgE adjacentes, levando à formação de um “cross-linking” de receptores, culminando na ativação/degranulação dos mastócitos (revisado em Gould *et al.*, 2003). Uma vez ativadas essas células liberam mediadores lipídicos e vasoativos (como histamina, prostaglandinas e leucotrienos),

proteases, fatores quimiotáticos (como eotaxina, MCP-1 e RANTES) e citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , TGF- β), que irão contribuir para o recrutamento de outros tipos celulares e desenvolvimento da inflamação alérgica aguda (revisto em Wills-Karp, 1999).

Durante a fase tardia ocorre então a migração de diversos tipos celulares para o sítio inflamatório, atraídos pelo microambiente de citocinas e quimiocinas já estabelecido. Um dos tipos celulares extremamente importante nessa fase da resposta alérgica é o eosinófilo. Após a migração para o sítio inflamatório e durante a reação alérgica, os eosinófilos estão sujeitos à ativação, que resulta na degranulação e produção de mediadores por estas células. Após ativação, essas células secretam mediadores inflamatórios, como leucotrieno C₄ (LTC₄) e fator ativador de plaquetas (PAF), induzindo broncoconstrição, e proteínas com alto nível de toxicidade para o epitélio, como MBP (Major Basic Protein) e EPO (Eosinophil Peroxidase), gerando descamação da camada epitelial das vias aéreas (revisto em Corrigan & Kay, 1992). Os eosinófilos também são capazes de apresentar antígenos e secretar citocinas do tipo Th₂, podendo funcionar como amplificadores ou perpetuadores do processo inflamatório em seus sítios de infiltração (Shi *et al.*, 2000). De fato, animais deficientes para eosinófilos são completamente protegidos contra hiper-reatividade das vias aéreas e demonstram proteção parcial contra metaplasia das células caliciformes (Lee *et al.*, 2004). Além disso, os eosinófilos secretam citocinas envolvidas em seu próprio processo de ativação, incluindo IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF, podendo participar de uma alça de retroalimentação positiva (Kita *et al.*, 1991).

1.3 Fisiopatologia da asma

Na asma, a parede das vias aéreas é infiltrada por células mononucleares, em sua maioria linfócitos CD4⁺, e eosinófilos. Mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos estão variavelmente aumentados nas vias aéreas de indivíduos asmáticos comparados com seus respectivos controles. No lúmen das vias aéreas, o muco está junto a macrófagos ativados, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais danificadas. Em

alguns casos, especialmente os mais severos, neutrófilos também estão presentes (revisto em Cohn *et al.*, 2004).

Mudanças estruturais da parede das vias aéreas, conjuntamente chamadas de remodelamento das vias aéreas, podem ser resultantes tanto da interação de mediadores inflamatórios com as células epiteliais quanto da injúria tecidual (**Figura 3**). Fatores locais, incluindo as células estruturais das vias aéreas e matriz, respondem à inflamação de maneira coordenada, a fim de reparar o dano causado pela inflamação local, num esforço para manter as vias aéreas intactas (revisto em Cohn *et al.*, 2004). O espessamento das vias aéreas varia de 10 a 300 % do normal, o que leva a uma redução do diâmetro luminal das vias aéreas (Elias *et al.*, 1999). Além das células inflamatórias, a maioria dos elementos das vias aéreas contribui para o aumento desse espessamento. As células epiteliais, no intuito de reparar a injúria ao epitélio, começam a proliferar e com a exposição aos mediadores inflamatórios do microambiente, passam de um fenótipo absorptivo, para um fenótipo secretório. Há então um aumento da produção e secreção de muco por essas células em conjunto com uma hipertrofia das células caliciformes, produtoras de muco. A camada subepitelial, que varia de 4 a 5 microns em indivíduos normais, vai de 7 a 23 microns em indivíduos asmáticos como resultado da deposição de colágeno (tipos I, III e IV), fibronectina e tenascina logo abaixo da membrana basal (Roche *et al.*, 1989). A massa da musculatura lisa aumenta e pode ocupar até três vezes a área normal, predominantemente por causa da hiperplasia dessas células. Também ocorre dilatação vascular e angiogênese, aumento de permeabilidade vascular e edema da parede das vias aéreas (revisto em Cohn *et al.*, 2004).

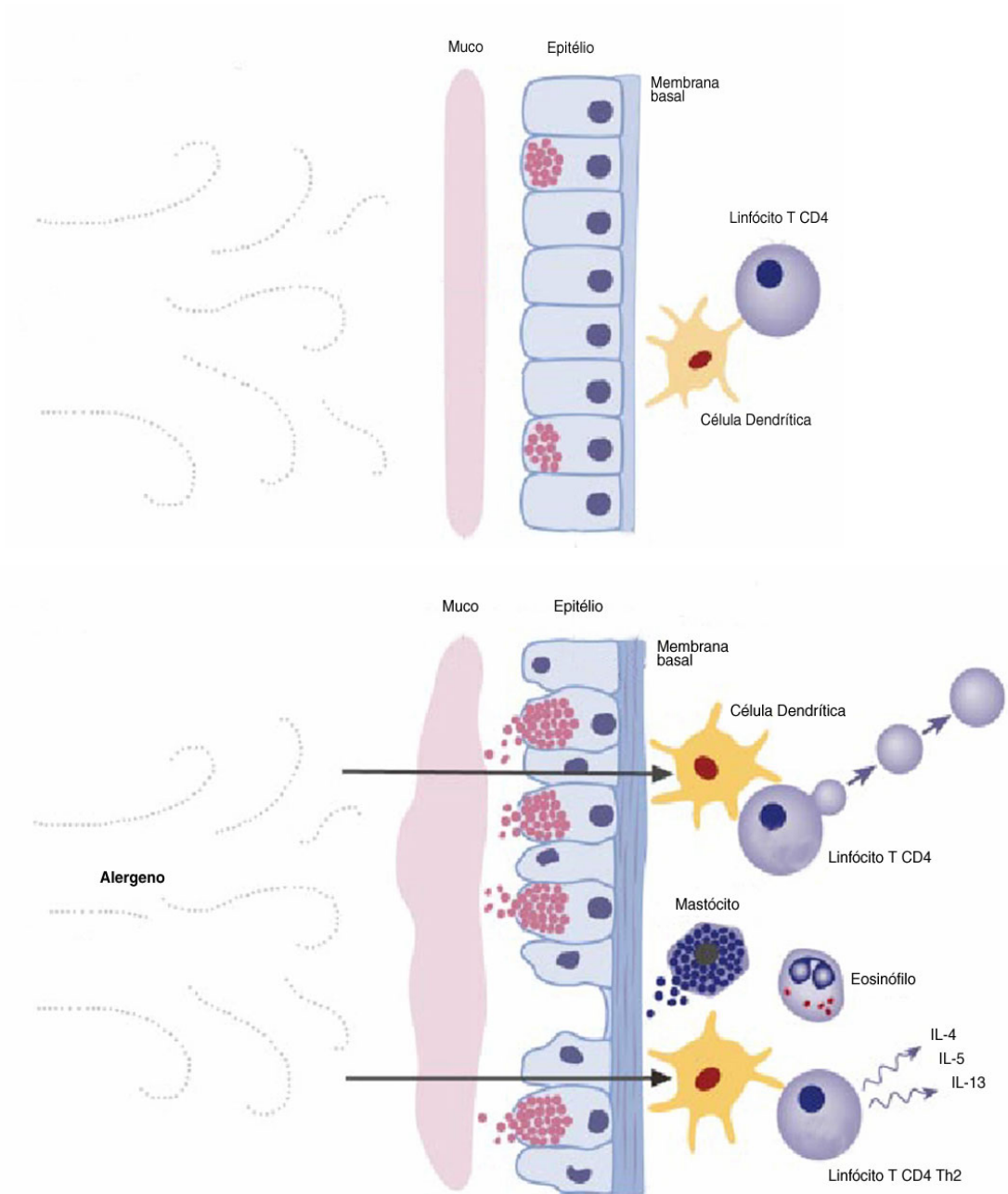


Figura 3: Vias aéreas antes e após exposição ao alergeno. Na ausência do alergeno as vias aéreas têm estruturação tecidual e funções normais (painel superior). Quando o alergeno é inalado, o sistema imune do indivíduo asmático gera uma resposta inflamatória contra ele (painel inferior). Durante esse processo há estimulação da diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ Th2, ativação e recrutamento de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios. Todos esses fatores contribuem para o aumento da produção e camada de muco no lúmen do brônquio, espessamento da membrana basal do epitélio e dano epitelial, gerando um quadro de inflamação persistente e remodelamento das vias aéreas que resulta na hiper-reatividade das vias aéreas. Adaptado de Cohn *et al.*, 2004.

O remodelamento das vias aéreas e a inflamação resultam na hiper-reatividade e obstrução das vias aéreas, causando dispnéia. A hiper-reatividade brônquica é definida como uma broncoconstrição aumentada em resposta a um estímulo não específico (revisto em Cohn *et al.*, 2004). A magnitude da hiper-reatividade está correlacionada com o grau de inflamação das vias aéreas (Jeffery *et al.*, 1989). Outros fatores como o diâmetro reduzido das vias aéreas, aumento na contratilidade da musculatura lisa, o grau de dano no epitélio, desregulação das funções neuronais, aumento da permeabilidade vascular, e muitos mediadores inflamatórios também foram associados à hiper-reatividade (revisto em Cohn *et al.*, 2004). Quando as vias aéreas tornam-se estreitadas por essas mudanças estruturais, com muco e células inflamatórias no espaço luminal, é fácil imaginar como qualquer estímulo que aumente a contração da musculatura lisa resulta em obstrução das vias aéreas.

A inflamação e as mudanças estruturais descritas anteriormente foram observadas em biópsias de crianças anos antes dos sintomas da asma se manifestarem, sugerindo a hipótese de que a obstrução sintomática das vias aéreas ocorra apenas quando um grau crítico de remodelamento ocorre (Pohunek *et al.*, 2005). Ao longo do tempo, a função pulmonar dos indivíduos asmáticos cai mais rapidamente se comparada à de indivíduos normais, indicando progressão da doença (Lange *et al.*, 1998).

1.4 Mediadores da resposta asmática

1.4.1 Citocinas

As citocinas são glicoproteínas solúveis multifuncionais, que atuam local ou sistemicamente na regulação de funções celulares através de sua interação com receptores específicos, presentes na membrana citoplasmática da maioria das células. Apesar da cadeia de eventos que leva ao desenvolvimento da patologia asmática ser bastante complexa, as citocinas típicas de uma resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) se destacam como importantes participantes tanto no desenvolvimento quanto no estabelecimento da asma. Os mecanismos exatos pelos quais estas citocinas regulam a inflamação pulmonar e a conseqüente hiper-reatividade das vias aéreas ainda não

estão completamente elucidados, mas sabe-se que elas atuam em diferentes tipos celulares envolvidos no desenvolvimento da resposta asmática.

Além do papel fundamental da IL-4 na diferenciação de células CD4⁺ “naive” em células Th2, essa citocina também influencia diversos outros processos. Como dito anteriormente, a IL-4 induz a mudança de classe de imunoglobulina para IgE em linfócitos B; é um fator de crescimento para mastócitos, juntamente com a IL-3 e induz a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1) que levam à migração preferencial de eosinófilos aos tecidos (revisto em Wills-Karp, 1999). Animais geneticamente deficientes para o gene da IL-4 não são capazes de gerar hiper-reatividade brônquica ou eosinofilia pulmonar quando submetidos a um modelo de asma experimental (Brusselle *et al.*, 1994). Segundo os autores, esta incapacidade está relacionada à ausência de produção de anticorpos sensibilizantes, devido à falhas na geração de linfócitos Th2 (Brusselle *et al.*, 1994). Além disso, Gavett e colaboradores (1997) demonstraram que a administração de anticorpos contra o receptor de IL-4 (IL-4R) em camundongos já sensibilizados inibe a inflamação alérgica pulmonar e hiper-reatividade brônquica. Estudos com camundongos transgênicos para a expressão IL-4 demonstram seu envolvimento na produção de muco, uma vez que esses animais apresentam aumento considerável das células produtoras de muco no epitélio das vias aéreas (Temann *et al.*, 1997). Neste mesmo estudo, os autores também demonstraram que a IL-4 também regula um gene responsável pela expressão de uma mucina (*MUC5*) nas vias aéreas desses animais (Temann *et al.*, 1997).

A IL-5 parece ser um elemento essencial na indução da inflamação alérgica mediada por eosinófilos. Na medula óssea a IL-5 é importante na estimulação da eosinofiloiose e indução da diferenciação terminal de precursores mielóides em eosinófilos. A IL-5 também aumenta a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, promove a migração de eosinófilos da corrente sanguínea para os tecidos, prolonga a sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos e aumenta a atividade citotóxica dessas células (revisto em Wills-Karp, 1999). De fato, animais deficientes para o gene da IL-5 não desenvolvem eosinofilia pulmonar induzida por aeroalergenos (Foster *et al.*, 1996). A IL-5 é também a citocina predominantemente encontrada em fluidos nasais de indivíduos alérgicos (Sim *et al.*, 1994). Além disso, parece haver uma correlação entre o

aumento da concentração de IL-5 e o aumento de eosinófilos no sangue e lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (Walker *et al.*, 1991).

A IL-13 ficou primeiramente reconhecida por seus efeitos em linfócitos B e monócitos, induzindo a expressão de MHC de classe II, promovendo mudança de classe de imunoglobulina para IgE e inibindo a produção de citocinas inflamatórias (revisto em Wynn, 2003). Atualmente a IL-13 é considerada uma citocina fundamental na resposta alérgica, estando envolvida na patologia da asma e anafilaxia (revisto em Wynn, 2003). Algumas das propriedades funcionais da IL-13 se sobrepõem às da IL-4. Isso ocorre porque o receptor para IL-13 (IL-13R) compartilha uma de suas subunidades com o receptor para IL-4 (IL-4R), a IL-4R α , fazendo com que as vias de sinalização desses receptores também sejam similares (revisto em De Vries, 1998). Entretanto, estudos feitos com camundongos transgênicos que expressam IL-13 especificamente no pulmão puderam elucidar as funções específicas da IL-13 na patologia asmática. Esses camundongos desenvolvem espontaneamente diversas características da asma incluindo eosinofilia pulmonar, hiperplasia das células epiteliais das vias aéreas, metaplasia das células caliciformes, fibrose subepitelial, obstrução das vias aéreas e hiper-reatividade (Zhu *et al.*, 1999). O bloqueio da IL-13 também inibiu muitas dessas características em camundongos normais submetidos a um modelo de asma experimental, demonstrando um papel crítico e não-redundante para a hiper-reatividade mediada por IL-13 (Grunig *et al.*, 1998).

1.4.2 Quimiocinas

As quimiocinas são um grupo de citocinas quimiotáticas estruturalmente relacionadas, envolvidas principalmente na ativação e recrutamento de diversos tipos celulares. Elas são classificadas em 4 grupos distintos, denominados CXC, CC, C e CX3C, dependendo do espaçamento entre as cisteínas conservadas (onde X representa um aminoácido qualquer). Os grupos CXC e CC, ao contrário dos grupos C e CX3C, possuem vários membros e têm sido estudados mais detalhadamente. As quimiocinas da família CXC atuam principalmente em neutrófilos e linfócitos, enquanto as da família CC agem em uma diversidade de tipos celulares, incluindo macrófagos,

eosinófilos, basófilos e células dendríticas (revisto em Zimmermann *et al.*, 2003). Diversos estudos demonstraram que uma variedade de quimiocinas é fortemente induzida em modelos de inflamação alérgica e em doenças alérgicas em humanos.

Na família das CC quimiocinas, destacam-se as eotaxinas I e II, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e MCP-5. Essas quimiocinas são importantes não só na regulação do recrutamento de leucócitos, mas também por outras atividades, como ativação celular, indução da liberação de mediadores inflamatórios, participação no desenvolvimento de respostas Th2 e regulação da síntese de IgE (revisto em Gangur & Oppenheim, 2000). Camundongos geneticamente deficientes para eotaxina apresentam uma redução considerável do recrutamento de eosinófilos quando submetidos a um modelo de inflamação alérgica (Rothenberg *et al.*, 1997). Além disso, a eotaxina também tem um papel na indução da degranulação de eosinófilos (Fujisawa *et al.*, 2000). De forma similar o uso de um antagonista do receptor de RANTES inibiu completamente a eosinofilia pulmonar em camundongos submetidos a um modelo experimental de asma (Gonzalo *et al.*, 1998).

Estudos clínicos também demonstram um papel importante das quimiocinas na patofisiologia da asma. Pacientes asmáticos apresentam concentrações aumentadas de eotaxina em fluidos de lavagem broncoalveolar e maior expressão do mRNA e proteína dessa quimiocina no epitélio e submucosa de suas vias aéreas, quando comparados com seus respectivos controles (Lamkhioued *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrada uma associação direta entre níveis aumentados de eotaxina, diagnóstico de asma e diminuição da função pulmonar (Nakamura *et al.*, 1999b). Da mesma forma, as concentrações de MCP-1, MIP-1 α e RANTES também estão aumentadas em fluidos de lavagem broncoalveolar de indivíduos asmáticos (Alam *et al.*, 1996).

1.4.3 Acetilcolina

Os nervos parassimpáticos são responsáveis pelo principal mecanismo neural de broncoconstrição das vias aéreas de humanos e animais. As fibras nervosas colinérgicas partem do cérebro através do nervo vago, terminando em fibras nervosas pré e pós-ganglionares situadas nas vias aéreas. Essas fibras nervosas recebem o

impulso nervoso e o conduzem até a musculatura lisa das vias aéreas e glândulas da submucosa. A estimulação do nervo vago gera a liberação de acetilcolina (ACh) que irá ativar receptores específicos no músculo liso, resultando em broncoconstrição (revisto em Barnes, 1993).

A ACh é o principal neurotransmissor do sistema nervoso periférico. As ações fisiológicas mais importantes da ACh são iniciadas pela sua ligação à duas classes distintas de receptores de membrana: os receptores nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (mAChRs). Esses receptores foram nomeados de acordo com sua afinidade por duas substâncias, a nicotina e a muscarina, um alcalóide derivado do cogumelo venenoso *Amanita muscaria*. Enquanto os nAChRs funcionam como canais de Na⁺ e K⁺ controlados por ligante, os mAChRs são membros de uma superfamília de receptores acoplados à proteína G. As ações muscarínicas da ACh são mediadas por cinco subtipos de mAChRs molecularmente distintos (M₁-M₅) (Caulfield & Birdsall, 1998).

Baseado em sua habilidade de ativar diferentes classes de proteínas G heterotriméricas, os cinco subtipos de mAChRs podem ser subdivididos em duas classes distintas de acordo com suas atividades funcionais: os mobilizadores intracelulares de cálcio (receptores M₁, M₃ e M₅), que são acoplados seletivamente às proteínas G da família G_q, e os inibidores da adenilato ciclase (M₂ e M₄), que demonstram seletividade por proteínas G da família G_i (revisto em Felder, 1995).

Diferentes abordagens experimentais demonstram que os mAChRs estão presentes em praticamente todos os órgãos, tecidos e tipos celulares. Os mAChRs periféricos são responsáveis pelas ações clássicas da ACh em órgãos ou tecidos inervados por fibras nervosas parassimpáticas. As principais ações mediadas por esses mAChRs periféricos incluem a redução do ritmo cardíaco e estimulação de secreção glandular e contração da musculatura lisa (revisto em Wess, 2004). Os mAChRs centrais estão envolvidos na regulação de um número extraordinário de funções cognitivas, comportamentais, sensitivas, motoras e autônomas. Sinalização reduzida ou aumentada dos diferentes subtipos de mAChRs implicam na patofisiologia de diversas doenças do sistema nervoso central, incluindo a doença de Alzheimer e Parkinson, depressão, esquizofrenia e epilepsia (revisto em Wess, 2004).

1.4.3.1 Sinalização pelos mAChRs

A sinalização da via dos mAChRs é determinada por elementos estruturais desses receptores que os permitem ligar seletivamente à acetilcolina e à proteína G apropriada. Todos os membros da família dos receptores acoplados à proteína G são caracterizados por uma única proteína que transpassa a membrana plasmática sete vezes, resultando em sete domínios hidrofóbicos transmembrana conectados por três “loops” hidrofílicos extracelulares e três intracelulares. A porção N-terminal reside no meio extracelular e a porção C-terminal no citoplasma.

As proteínas G existem como um heterotrímero contendo três subunidades: α , β e γ . Na sua forma inativa, a proteína G está complexada em α , β e γ , com GDP fixado à subunidade α . Uma vez estimulada por um receptor ativado por seu ligante, a subunidade α troca seu GDP por GTP. Isso causa a dissociação de α que se separa das subunidades β e γ , interagindo com uma proteína efetora ou canal iônico a fim de estimular ou inibir mensageiros intracelulares secundários. A consequência fisiológica da ligação da ACh é determinada pelo subtipo de mAChR recebendo o estímulo bem como pela proteína G e mensageiros celulares secundários (revisto em Felder, 1995).

Os receptores M_1 e M_3 acoplados à proteína G_q , uma vez ativados, ativam a fosfolipase C (PLC), causando a hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) em inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP₃) e *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG). O InsP₃ está envolvido na mobilização de cálcio dos estoques intracelulares, gerando um aumento rápido e transiente das concentrações intracelulares de cálcio. O DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), que pode ativar a cascata de sinalização das MAP quinases (MAPK) (**Figura 4**).

Já os receptores M_2 acoplados à proteína G_i , uma vez ativados, inibem a adenilil ciclase através da ligação da subunidade α_i com essa enzima. Isso faz com que haja uma diminuição dos níveis de AMP cíclico intracelulares e conseqüente inibição da via de ativação celular induzida pela proteína quinase A (PKA) (**Figura 4**).

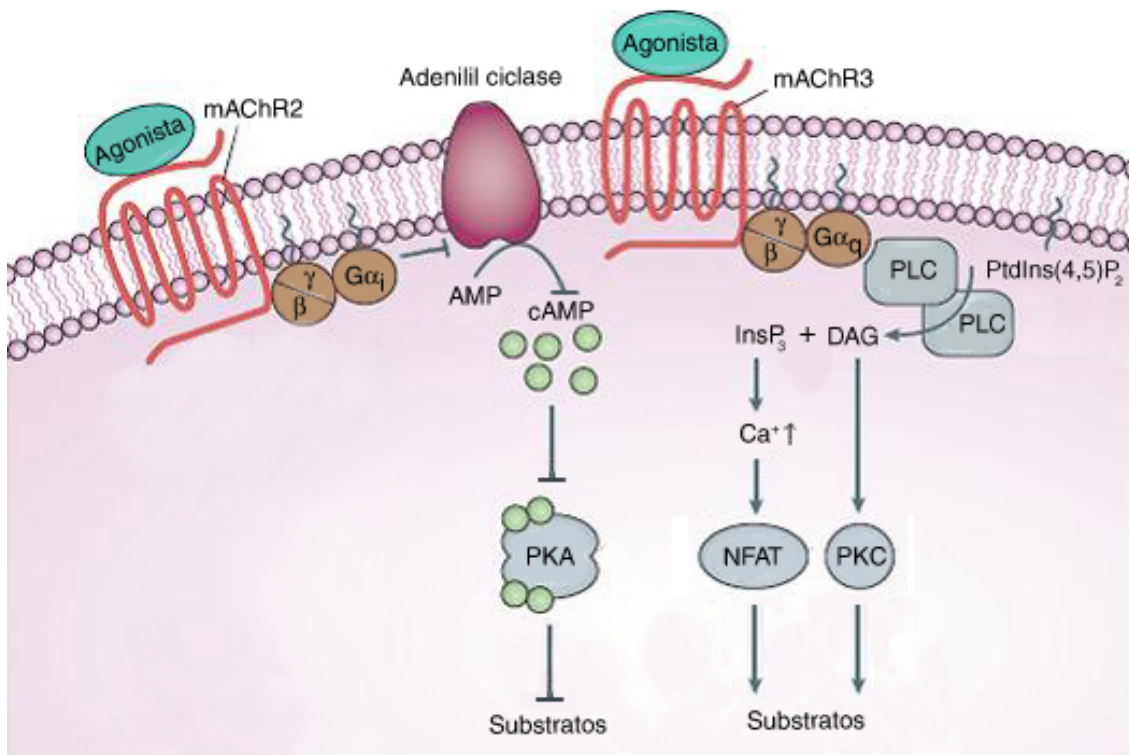


Figura 4: Vias de sinalização mediadas por proteínas G. Agonistas estimulam especificamente seus receptores acoplados a proteínas G, os quais estão inseridos na membrana plasmática. O mACHR2 ativa as proteínas G do subtipo G_i, que inibem a geração de cAMP e a conseqüente ativação da via de sinalização induzida por PKA. O mACHR3 ativa as proteínas G do subtipo G_q que induzem um influxo de Ca⁺ e ativação de PKC através da ativação da PLC e subseqüente conversão de PtdIns(4,5)P₂ em InsP₃ e DAG. Adaptado de Malbon, 2005.

1.4.3.2 Receptores muscarínicos no pulmão

Nos pulmões, as fibras nervosas parassimpáticas inervam a musculatura lisa, as glândulas produtoras de muco da submucosa e os vasos sanguíneos. Elas mantêm o tônus muscular das vias aéreas, estimulam a secreção de muco pelas glândulas da submucosa e dilatam os vasos sanguíneos (revisto em Coulson & Fryer, 2003).

A distribuição dos mACHRs no tecido pulmonar de animais e humanos revelou que esses receptores estão localizados na musculatura lisa das vias aéreas, tanto nas

vias superiores quanto nas inferiores. Os mAChRs também estão localizados no epitélio das vias aéreas e nas glândulas da submucosa (revisto em Barnes, 2004).

Dos cinco subtipos de mAChRs, três deles, os receptores M_1 , M_2 e M_3 , exercem efeitos fisiológicos nas vias aéreas. A musculatura lisa das vias aéreas apresenta mAChRs dos subtipos M_2 e M_3 . Apesar de corresponderem a 50-80% dos mAChRs pulmonares, os receptores M_2 não parecem desempenhar um papel direto na contração da musculatura lisa das vias aéreas (revisto em Fryer & Jacoby, 1998). Ao invés disso, os mAChRs do subtipo M_2 inibem qualquer tipo de broncodilatação mediada pela ativação da adenilato ciclase, como a broncodilatação induzida por β -agonistas (Fernandes *et al.*, 1992). Esses receptores também estão presentes nas fibras nervosas pré-ganglionares que chegam ao pulmão. Neste sítio os receptores M_2 funcionam diretamente como inibidores da liberação de ACh. De fato, a função alterada desses receptores aumenta a concentração de ACh liberada na musculatura lisa, resultando numa broncoconstrição aumentada em resposta a estimulação pelo nervo vago (revisto em Coulson & Fryer, 2003).

Os receptores M_3 são considerados os responsáveis pela contração da musculatura lisa das vias aéreas. A estimulação dos receptores M_3 pela ACh ativa a fosfolipase C, aumentando as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e causando a contração da musculatura lisa (revisto em Coulson & Fryer, 2003). De fato, camundongos geneticamente modificados para não expressarem o receptor M_3 (mAChR3^{-/-}) apresentam uma inibição de 60% da broncoconstrição induzida por muscarina (Struckmann *et al.*, 2003). Surpreendentemente, neste mesmo estudo, camundongos geneticamente modificados para não expressarem os dois receptores M_3 e M_2 (mAChR2^{-/-} x mAChR3^{-/-}) demonstram uma completa inibição da broncoconstrição induzida por muscarina (Struckmann *et al.*, 2003). Esses dados sugerem que a dicotomia M_2/M_3 não é tão rígida, indicando um papel importante para o receptor M_2 na contração da musculatura lisa.

As glândulas da submucosa expressam mAChRs dos subtipos M_1 e M_3 . Os receptores M_3 são predominantes e regulam a secreção de eletrólitos, muco e água. Os receptores M_1 parecem contribuir apenas para a regulação da secreção de água e eletrólitos (revisto em Coulson & Fryer, 2003).

1.4.3.3 Acetilcolina na asma

Até o momento não se tem registro de nenhuma alteração de expressão dos mAChRs na asma. Estudos funcionais em vias aéreas de camundongos demonstraram que a resposta dos mAChRs permanece inalterada após desafio antigênico (Fryer & Wills-Karp, 1991). *In vitro*, agonistas colinérgicos exógenos não produziram diferenças na contração da musculatura retirada de indivíduos asmáticos versus indivíduos normais (Whicker *et al.*, 1988). Portanto, não há evidências de que o número ou função dos receptores M₂ ou M₃ presentes na musculatura lisa das vias aéreas esteja alterado.

Entretanto, estudos demonstram que a função dos receptores M₂ nas fibras nervosas parassimpáticas estaria diminuída, fazendo com que sua atividade inibitória seja perdida em indivíduos asmáticos. Isso contribuiria para o reflexo colinérgico exagerado característico da asma. De fato, agonistas muscarínicos inibem a broncoconstrição em indivíduos normais, mas não em indivíduos asmáticos, demonstrando uma possível perda de função do receptor M₂ (Minette *et al.*, 1989; Ayala & Ahmed, 1989). O mecanismo exato pelo qual essa perda de função ocorre ainda não está completamente estabelecido, mas acredita-se que a liberação de MBP por eosinófilos pode estar envolvida nesse processo (revisto em Coulson & Fryer, 2003).

1.4.4 Serotonina

A serotonina (ou 5-hidroxitriptamina; 5-HT) foi inicialmente descrita como um importante fator vasotônico. Ela é uma amina formada pela descarboxilação do aminoácido triptofano, proveniente da dieta que se encontra armazenada nos grânulos secretórios de mastócitos de roedores, mas não de humanos. A principal fonte de serotonina em humanos são as plaquetas, apesar de também ser encontrada em células neuroendócrinas do trato respiratório e nervos periféricos (revisto em Barnes, 2001).

Seus efeitos são mediados pela interação com uma família de receptores dividida em 7 subtipos (5-HT₁₋₇). Os receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acoplados à proteína G, enquanto os receptores 5-HT₃ são canais iônicos

ativados por ligantes (revisto em Raymond *et al.*, 2001). Quatro desses subtipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄ são importantes no controle funcional das vias aéreas humanas. Entretanto, aparentemente, existem diferenças entre espécies quanto ao subtipo de receptor e sua capacidade de induzir broncoconstrição direta ou indiretamente. Em ratos a serotonina induz broncoconstrição diretamente via receptores 5-HT_{2A} localizados na musculatura lisa das vias aéreas, mas em cobaias a broncoconstrição pode ser causada pela ativação dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{1-like} e 5-HT₃. Em humanos a serotonina tem tanto uma função constritora quanto relaxante da musculatura lisa das vias aéreas mediada pelos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1A}, respectivamente (revisto em Raymond *et al.*, 2001).

Além do papel direto da serotonina na musculatura lisa induzindo broncoconstrição, também já foi comprovada uma influência indireta da serotonina nesse processo. Dupont e colaboradores (1999) demonstraram que a serotonina atua como facilitadora da contração colinérgica, induzindo a liberação de ACh pelas fibras nervosas pós-ganglionares humanas, via receptores 5-HT₃ e 5-HT₄. Em camundongos a influência da serotonina na broncoconstrição mediada por ACh também já foi demonstrada. Estudos com traquéias isoladas de camundongos utilizando antagonistas e agonistas seletivos dos diferentes receptores de serotonina demonstraram um papel importante de receptores 5-HT_{1-like} nesse processo (Van Oosterhout *et al.*, 1991).

1.4.4.1 Serotonina na asma

O papel da serotonina na patologia da asma ainda não está completamente elucidado. Lechin e colaboradores (1996) demonstraram que os níveis plasmáticos de serotonina estão aumentados em indivíduos asmáticos e que esses níveis estavam relacionados à severidade da doença. De fato, antagonistas do receptor 5-HT₂ foram capazes de inibir parcialmente a hiper-reatividade brônquica e eosinofilia induzidas em camundongos submetidos a um modelo experimental de asma (De Bie *et al.*, 1998). Além disso, a tianeptina, um antidepressivo que estimula a recaptação de serotonina pelas plaquetas, diminui os níveis de serotonina no plasma em pacientes asmáticos e foi associado à redução dos sintomas da asma (Lechin *et al.*, 1998).

1.5 Família NFAT

Muitos dos processos que fazem parte do desenvolvimento da patologia asmática têm a participação de fatores de transcrição da família NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) (revisto em Rao *et al.*, 1997). A família NFAT é composta por quatro membros distintos regulados por calcineurina: NFAT1 (NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, NFATc3) e uma proteína regulada por estresse hiperosmótico (NFAT5/TonE-BP) (nomenclatura alternativa entre parênteses) (Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999; revisto em Rao *et al.*, 1997). Todas as proteínas da família NFAT têm um domínio de ligação ao DNA (DBD) extremamente conservado, que confere a essas proteínas uma especificidade comum de ligação ao DNA (revisto em Rao *et al.*, 1997).

As proteínas NFAT1-4 são ativadas pela estimulação de receptores acoplados à mobilização de cálcio, como os receptores de antígeno presentes em linfócitos T e B, os receptores de Fc ϵ presentes em mastócitos e basófilos e os receptores de Fc γ em macrófagos e células NK (revisto em Rao *et al.*, 1997). Além disso, o NFAT também é ativado por receptores acoplados a proteínas G $_q$, mais especificamente o receptor muscarínico M $_3$ (Boss *et al.*, 1996). A ativação das proteínas da família NFAT é inibida por agentes imunossupressores, como ciclosporina A (CsA) e FK506 (revisto em Rao *et al.*, 1997).

A família NFAT foi inicialmente identificada como um fator nuclear capaz de se ligar ao promotor da IL-2 em linfócitos T ativados. Atualmente, os diversos membros da família NFAT já foram identificados em diversos tipos celulares, incluindo outras células do sistema imune e células “não-imunes”. O NFAT1 e o NFAT2 são expressos em linfócitos T periféricos enquanto o NFAT4 é predominantemente expresso no timo (Masuda *et al.*, 1995; revisto em Rao *et al.*, 1997). Já o NFAT3 é preferencialmente expresso em células que não fazem parte do sistema imune (revisto em Rao *et al.*, 1997). O NFAT1 também é expresso em linfócitos B (Peng *et al.*, 2001), mastócitos (Prieschl *et al.*, 1995), eosinófilos (Seminario *et al.*, 2001), células NK e alguns monócitos e macrófagos (Wang *et al.* 1995).

As proteínas da família NFAT são expressas constitutivamente em sua forma fosforilada, estando em sua forma inativa. Estímulos que induzem mobilização de cálcio para o citoplasma das células levam a ativação da PLC, que hidrolisa o fosfolípido de membrana $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em InsP_3 e DAG, como já descrito anteriormente. O InsP_3 induz a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, que promove a abertura dos canais ativado por liberação de cálcio (CRAC) presentes na membrana plasmática gerando um aumento rápido e transiente das concentrações intracelulares de cálcio. O cálcio então se liga à calmodulina que por sua vez ativa a calcineurina, uma serina-treonina fosfatase dependente de cálcio/calmodulina. O NFAT é então rapidamente defosforilado pela calcineurina (revisto em Macian, 2005). Uma vez defosforilado, o NFAT transloca para o núcleo, ligando-se a regiões promotoras e reguladoras de vários genes, incluindo genes que codificam para citocinas como IL-4, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2, IL-5, IL-13 e GM-CSF, e para moléculas de superfície, como CTLA-4 e CD40L (revisto em Rao *et al.*, 1997) (**Figura 5**).

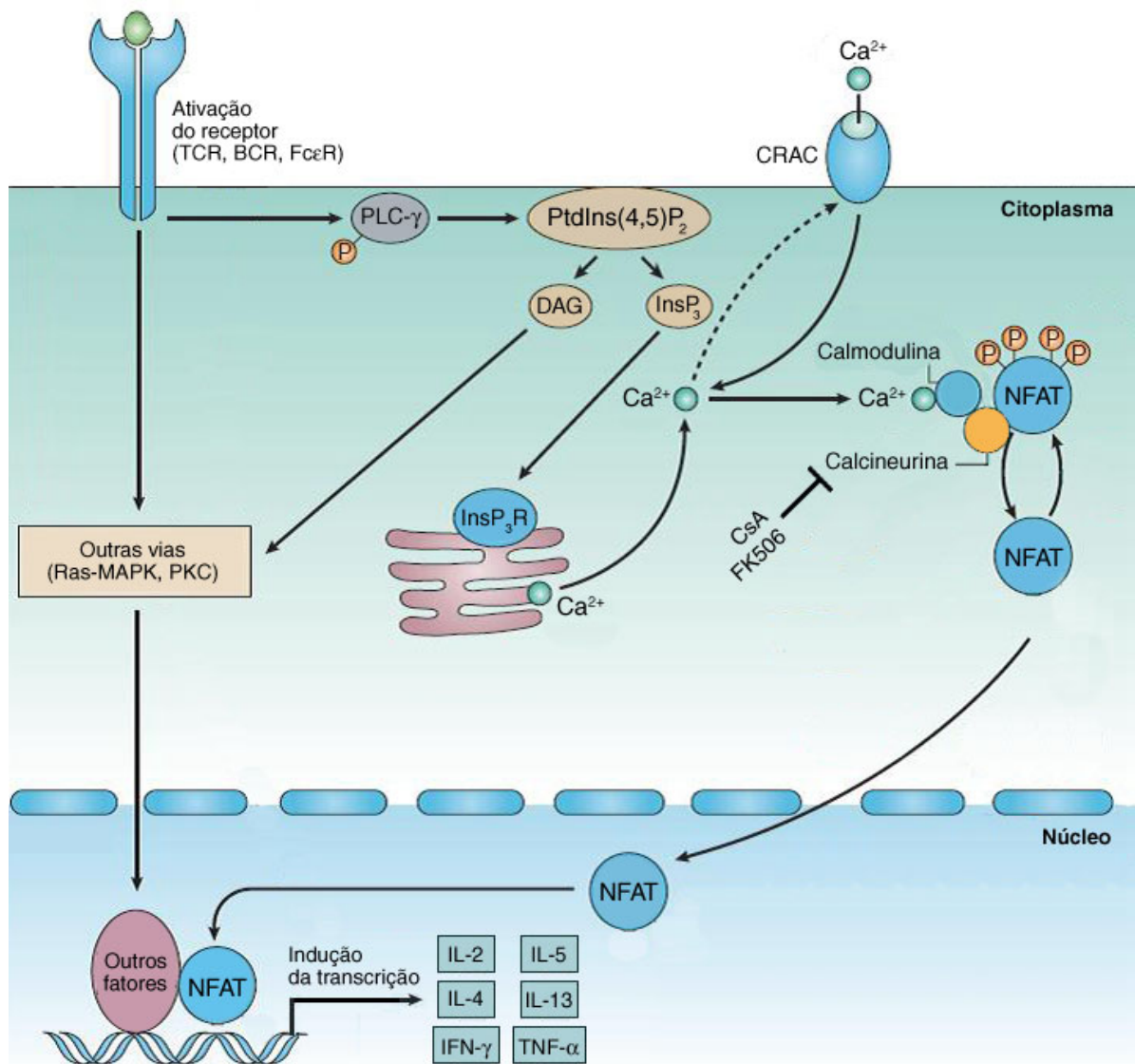


Figura 5: Vias de sinalização que levam a ativação das proteínas da família NFAT através da geração de influxo de cálcio intracelular. A ativação de receptores que induzem mobilização de cálcio ativam a PLC, que hidrolisa PtdIns(4,5)P₂ em InsP₃ e DAG. O InsP₃ induz a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. O cálcio se liga à calmodulina, que ativa a calcineurina, levando a uma rápida defosforilação do NFAT. Uma vez defosforilado, o NFAT transloca para o núcleo, ligando-se a regiões promotoras e reguladoras de vários genes. Adaptado de Macian, 2005.

1.5.1 Fenótipo dos camundongos deficientes para NFAT

Camundongos geneticamente modificados com uma deleção dos diferentes genes que codificam as proteínas NFAT1/2/4 apresentam algumas alterações nas funções do sistema imune, como descrito na **Tabela 1**. Quando mais de um membro da família é eliminado, alterações severas em diversas células e funções do sistema imune tornam-se aparentes, sugerindo que há certo grau de redundância nas funções dessas proteínas e indicando também que algumas dessas funções podem ser controladas pela regulação de proteínas NFAT específicas que podem ocupar um determinado promotor de um determinado gene em momentos diferentes de ativação celular.

Tabela 1: Fenótipo dos animais deficientes para as diferentes proteínas da família NFAT*.

Proteínas NFAT	Fenótipo dos animais NFAT “<i>knockouts</i>”
NFAT1	Hiperproliferação de linfócitos. Aumento moderado da resposta de células T e B com uma superprodução de IL-4 e outras citocinas Th2, e diminuição de expressão de IFN- γ . Hipereosinofília e alergia.
NFAT2	Fenótipo letal (defeito em desenvolvimento de válvulas cardíacas). No sistema de complementação de blastocisto de animais RAG $^{-/-}$, células T e B apresentam uma redução de proliferação e uma moderada redução da resposta Th2 com uma diminuição da produção de IL-4.
NFAT3	Ainda não mostrado.
NFAT4	Moderado comprometimento no desenvolvimento de células CD4 e CD8 devido a um aumento da apoptose de timócitos duplo positivos. Moderada hiperativação de células T periféricas.
NFAT5	Função de células T diminuída em condições hiperosmóticas. Celularidade diminuída no timo e baço.
NFAT1+NFAT2	No sistema de quimeras de fígado fetal, células T apresentam um comprometimento de funções efetoras com uma importante diminuição da produção de citocinas Th1 e Th2. Hiperreatividade de células B.
NFAT1+NFAT4	Desordem linfoproliferativa devido a uma hiperreatividade da resposta dependente da ativação via TCR e defeito de apoptose de células T. Aumento da resposta Th2 com blefarite alérgica e pneumonite intersticial.

*Adaptado de Macian, 2005.

Os camundongos NFAT1-deficientes (NFAT1^{-/-}) apresentam desenvolvimento normal, não exibem deficiências comportamentais óbvias e são, surpreendentemente, imunocompetentes (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Hodge *et al.*, 1996). Além disso, esses animais apresentam esplenomegalia e uma resposta imune exacerbada, caracterizada por uma hiperproliferação linfocitária em resposta a diferentes estímulos (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Caetano *et al.*, 2002). Quando submetidos a um modelo de pleurisia alérgica, os animais NFAT1^{-/-} apresentam uma resposta alérgica exacerbada caracterizada por hipereosinofilia na cavidade pleural e medula óssea, além de um aumento nos níveis séricos de IgE (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Viola *et al.* 1998). Corroborando os resultados da pleurisia alérgica, foi demonstrado que células CD4⁺ NFAT1^{-/-} diferenciam-se preferencialmente para um fenótipo Th2 *in vitro*, caracterizado por alta produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, confirmado pela maior susceptibilidade dos animais NFAT1^{-/-} a infecção por *L. major* (Kiani *et al.*, 1997).

Estes resultados sugerem que o NFAT1 pode ter um papel regulador negativo da expressão gênica durante a resposta imune. Entretanto, quando camundongos cujos linfócitos T não expressam NFAT1 e NFAT2 foram gerados através da transferência do fígado fetal de doadores NFAT1^{-/-} e NFAT2^{-/-} para receptores letalmente irradiados, verificou-se que os linfócitos T apresentavam produção de citocinas nula ou extremamente diminuída, incluindo tanto IFN- γ quanto IL-4 (Peng *et al.*, 2001). Analisados em conjunto, estes resultados sugerem que o NFAT1 tem papel tanto positivo quanto negativo na regulação da expressão gênica de linfócitos T. Apesar disso, as bases moleculares destes efeitos ainda estão por ser identificadas.

1.5.2 NFAT1 na resposta alérgica/asmática

Os resultados descritos na seção acima sugerem fortemente o envolvimento do NFAT1 na resposta alérgica. A predominância de um fenótipo Th2 e a exacerbção da resposta alérgica e hipereosinofilia no modelo de pleurisia em camundongos NFAT1^{-/-} indicam um possível papel desse fator de transcrição nas patologias alérgicas.

Corroborando essa hipótese, camundongos NFAT1^{-/-} x NFAT4^{-/-} desenvolvem uma síndrome predominantemente Th2, caracterizada por blefarite e pneumonite

alérgicas associadas com aumentos dos níveis séricos de IgG1 e IgE (Ranger *et al.*, 1998). Esses animais apresentam uma diferenciação preferencial para um fenótipo Th2, com uma produção de IL-4 que pode chegar a ser 600 vezes maior que a de seus respectivos controles (Ranger *et al.*, 1998). A produção de outras citocinas típicas do fenótipo Th2, como IL-5, IL-6 e IL-10 também está significativamente aumentada, enquanto a produção de IFN- γ e TNF- α apresenta-se diminuída (Ranger *et al.*, 1998).

Apesar disso, um estudo recente mostrou que a inibição de todos os membros da família NFAT em linfócitos T previne inflamação pulmonar alérgica, recrutamento inicial de eosinófilos para o pulmão e desenvolvimento de uma resposta Th2 em camundongos submetidos a um modelo de asma experimental (Diehl *et al.*, 2004). Esses resultados suportam a idéia de que diferentes membros da família NFAT podem ter papéis específicos durante a resposta imune *in vivo*, já que essa família de fatores de transcrição é composta de 5 proteínas distintas com propriedades de regulação gênica também distintas.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Geral

Com base nas informações apresentadas anteriormente, temos como objetivo principal estudar o papel do NFAT1 na patologia da asma alérgica, e sua influência na hiper-reatividade brônquica.

1.6.2 Específicos

- Confirmar os dados relativos aos ensaios de pleurisia em animais selvagens e deficientes para NFAT1;
- Avaliar e caracterizar a resposta inflamatória alérgica de animais selvagens e deficientes para NFAT1 submetidos a um modelo de asma;
- Avaliar a hiper-reatividade brônquica de animais selvagens e deficientes para NFAT1;
- Avaliar o papel do NFAT1 na broncoconstrição mediada por receptores muscarínicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais utilizados

Foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para o fator de transcrição NFAT1 (NFAT1^{-/-}) (Xanthoudakis *et al.*, 1996) e seus respectivos controles selvagens: linhagem mista de 129/Sv x C57BL/6 (NFAT1^{+/+}). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Os animais foram tratados de acordo com as normas de tratamento de animais do Council for International Organizations of Medical Sciences. Foram utilizados em todos os experimentos, camundongos de 8 a 12 semanas de idade, criados e mantidos independentemente.

2.2 Pleurisia

Os animais (5 animais/grupo) foram sensibilizados subcutaneamente em uma das patas traseiras com 0,1 ml (200 µg) de ovalbulmina (OVA) emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA), na proporção de 1:1. Quinze dias após a sensibilização a pleurisia alérgica foi induzida por injeção intratorácica de 0,1 ml de solução de ovalbumina (12 µg/cavidade). Os animais foram sacrificados (asfixia por CO₂) 24 horas depois e sua cavidade torácica foi lavada com 1 ml de PBS 0,1 % BSA (albumina bovina sérica) (Sigma). A suspensão celular recuperada foi centrifugada e as células resultantes da centrifugação foram ressuspendidas em 1 ml de PBS 0,1 % BSA, diluídas em solução de Turk e contadas em uma câmara de Neubauer.

2.3 Cultura de células

As culturas de células foram feitas em meio DME (Dulbecco's modified eagle's medium) e mantidas em estufas úmidas a 37°C, com 5 % de CO₂.

2.4 Modelo experimental de asma

Os animais (6 animais/grupo) foram sensibilizados subcutaneamente em uma das patas traseiras com 0,1 ml (50 µg) de ovalbulmina (OVA) (Sigma) emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA) ou em hidróxido de alumínio (20 mg/ml) na proporção de 1:1. Sete dias após a sensibilização os animais foram novamente sensibilizados com OVA (50 µg) intraperitonealmente, na ausência de adjuvante. Sete dias depois os animais foram desafiados através da exposição a um aerosol de PBS ou OVA 2,5 % em PBS por 30 min durante 3 dias consecutivos.

2.5 Lavado Broncoalveolar (BAL)

Os animais foram submetidos ao modelo experimental de asma descrito na **seção 2.4**. Vinte e quatro horas após a última aerolização os animais foram sacrificados, tendo sua traquéia exposta por dissecação. Um tubo plástico de 0,70 mm de diâmetro foi então inserido e fixado no interior da traquéia. Um volume de 1 ml de PBS 0,1 % BSA foi instilado e gentilmente aspirado com o auxílio de uma seringa. Cada amostra de BAL recuperada foi centrifugada e as células resultantes da centrifugação foram ressuspensas em 500 µl de PBS 0,1 % BSA (Sigma). Uma alíquota dessa suspensão celular foi então diluída em solução de Turk e contada em uma câmara de Neubauer.

2.6 Contagem diferencial de células

Alíquotas das suspensões celulares contendo as células totais recuperadas no lavado pleural ou lavado broncoalveolar foram citocentrifugadas em lâminas de vidro por 5 minutos a 450 rpm e coradas com May-Grünwald-Giemsa (Merck). A análise diferencial de leucócitos foi feita com o auxílio de uma objetiva de imersão, baseada nas características morfológicas e de coloração das células.

2.7 Análise de imunoglobulinas

Para medir a concentração de imunoglobulina E (IgE) no soro dos animais submetidos à pleurisia alérgica e modelo experimental de asma, o sangue de animais individuais foi recolhido através de punção cardíaca e deixado coagular por 30 minutos a 37°C. As amostras foram então centrifugadas por 5 min a 13000 rpm e o sobrenadante (soro) foi avaliado para os níveis protéicos de IgE através da metodologia de ELISA, como descrito pelo fabricante (BD Pharmingen).

2.8 Estimulação *in vitro*

Os animais (5 animais/grupo) foram sensibilizados como descrito na **seção 2.4**. Quinze dias após a sensibilização os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) da pata sensibilizada foram recolhidos e estimulados *in vitro* com anti-CD3 (1 µg/ml) (2C11) fixado à placa. Quarenta e oito horas após a estimulação, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e avaliados para IL-4 e IFN-γ através da metodologia de ELISA (BD Pharmingen).

2.9 Análise de citocinas e quimiocinas

Os animais (3 animais/grupo) foram submetidos ao modelo experimental de asma descrito na **seção 2.4**. Vinte e quatro horas após a última aerolização os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões isolados. O tecido retirado (0,1 g) foi colocado em 1 ml de tampão de homogeneização e homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Os homogenatos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente ao uso das amostras, essas foram descongeladas e centrifugadas a 6000 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram então coletados para quantificação de proteínas totais e análise de citocinas e quimiocinas através da metodologia de ELISA (BD Pharmingen).

2.10 Histopatologia

Os animais (3 animais/grupo) foram submetidos ao modelo experimental de asma descrito na **seção 2.4**. Vinte e quatro horas após a última aerolização os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões isolados, fixados, embebidos em parafina e seccionados na espessura de 5 µm com o auxílio de um micrótomo. As secções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), tricrômico de Gomori e PAS (Periodic Acid-Schiff). As secções foram então avaliadas por microscopia óptica.

2.11 Análise da (hiper-) reatividade brônquica

As análises de (hiper-) reatividade brônquica foram feitas em animais não-anestesiados e não-immobilizados utilizando-se o sistema conhecido como pletismografia barométrica de corpo inteiro (Buxco Electronics, Sharon, CT, USA), como descrito por Hamelmann e colaboradores (1997). A reatividade brônquica foi avaliada utilizando estímulos de metacolina ou serotonina (5-hidroxitriptamina). Os animais foram colocados numa câmara de acrílico (Buxco) e os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição por 2 min a aerosol de 0, 6, 12 e 24 mg/ml de metacolina ou 0, 5, 10 e 20 mg/ml de serotonina. A impedância expressa em Penh (enhanced pause), foi calculada de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante: $Penh = [(\text{tempo de expiração}/\text{tempo de relaxamento}) - 1] \times (\text{pico do fluxo expiratório}/\text{pico do fluxo inspiratório})$. Antes de medirem-se as variações de Penh provocadas pela exposição dos animais aos agonistas aerolizados, valores basais de Penh foram obtidos em resposta à aerolização do veículo (PBS).

2.12 RT-PCR

Para os ensaios de RT-PCR, secções de tecido do pulmão de camundongos selvagens e deficientes para NFAT1 (3 animais/grupo) foram retiradas e

congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente as amostras congeladas foram colocadas separadamente na presença de 1ml de Trizol (Gibco) e homogeneizadas com o auxílio de um homogenizador de tecidos. O RNA total das amostras foi extraído de acordo com as recomendações do fabricante. Cinco microgramas de RNA total foram incubados por 5 min a 65°C na presença de 2,5 µM oligo(dT) e 0,5 mM dNTP. As amostras foram então colocadas a 4°C por 1 min e posteriormente incubadas a 50°C por 1 h na presença de 0,5 mM DTT e 200 U Superscript III RNase Transcriptase Reversa (Invitrogen). Para a reação de PCR as amostras foram incubadas na presença de 2 mM MgCl₂ (Invitrogen), 20 pmoles de cada primer (Dialab Diagnósticos), 0,25 mM dNTP e 2 U Taq DNA polimerase (Invitrogen). Condições de amplificação: 10 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 20 seg a 62°C e 30 seg a 73°C, seguidos de 7 min a 73°C.

A seqüência dos primers utilizados está demonstrada na tabela a seguir:

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho do produto (pb)
mAChR1	Fwd Rev	cag tcc caa cat cac cgt ctt gag aac gaa gga aac caa cca c	441
mAChR2	Fwd Rev	tgt ctc cca gtc tag tgc aag g cat tct gac ctg acg atc caa c	369
mAChR3	Fwd Rev	gta caa cct cgc ctt tgt ttc c gac aag gat gtt gcc gat gat g	245
GAPDH	Fwd Rev	gtg atg ggt gtg aac cac gag cca cta tgc caa agt tgt ca	120

2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm SEM. A análise estatística dos valores correspondentes aos camundongos selvagens e deficientes para NFAT1 foi determinada utilizando um teste *t* de Student para comparações simples, ou uma

análise de variância seguida da Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.14 Soluções e reagentes utilizados

2.14.1 PBS 1x

8,0g NaCl

1,44g NaH₂PO₄

0,24g KH₂PO₄

0,2g KCl

Água milli-Q q.s.p

2.14.2 Ovalbumina

Foi feita uma solução estoque de 4 mg de OVA (Sigma) em 1 ml de PBS 1x. Para a sensibilização dos animais utilizamos uma parte dessa solução para uma parte de CFA (Sigma) ou Hidróxido de Alumínio (Pepsamar – Sanofi-Synthelabo). Para a aerolização dos animais foi feita uma solução de 2,5 % de OVA em PBS 1x.

2.14.3 Solução de Turk

2 % de ácido acético

0,01 % de cristal violeta

Água milli-Q q.s.p

2.14.4 DMEM suplementado

O meio DME (Dulbecco's modified eagle's medium - high glucose - A13233) (Gibco) foi suplementado com 10 % SFB (Gibco), 40 mM de Bicarbonato de Sódio (Sigma), 1 mM de Fosfato de Sódio Monobásico (Reagen), 1 mM de Piruvato de

Sódio (Gibco), aminoácidos essenciais (Gibco), aminoácidos não-essenciais (Gibco), vitaminas (Gibco), 10 mM de HEPES (Gibco), 100.000 U/L de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 55 μ M de β -mercaptoetanol (Gibco).

2.14.5 Hidróxido de alumínio

Para obtenção da solução de hidróxido de alumínio, diluímos 24 ml de Pepsamar (Sanofi-Synthelabo) em 320 ml de água milli-Q e centrifugamos a 3000 rpm por 6 min. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado 3 vezes em água milli-Q e centrifugado a 2500 rpm por 6 min. Após a última lavagem o sedimento foi transferido para um becher e adicionado dos seguintes reagentes: 25 ml de Tris 0,01 M pH 7, 1,8 ml de HCl 1 N, 2,9 g de NaCl e 223 ml de água milli-Q. A solução resultante foi homogeneizada por 30 min. A solução foi então dividida em 5 partes de 1 ml e cada uma foi transferida para um becher independente. A solução foi aquecida a 100°C por 24 h e, ao final desse processo de secagem, determinamos o peso seco da solução, obtendo a concentração exata do hidróxido de alumínio por ml. Para a sensibilização dos animais foi feita uma solução estoque de 20 mg/ml de hidróxido de alumínio e utilizamos uma parte dessa solução para uma parte de ovalbumina, como descrito no **item 2.14.2** desta seção.

2.14.6 Tampão de homogeneização

500 mM NaCl

50 mM Hepes, pH 7.4

0,1 % Triton X-100

0,5 mg/ml de leupeptina

1 mM PMSF

0.02 % NaN₃

PBS 1x q.s.p

3. RESULTADOS

Como demonstrado por Viola e colaboradores (1998), os animais deficientes para NFAT1 (NFAT1^{-/-}) ao serem submetidos a um modelo de pleurisia, apresentam hipereosinofilia e altos níveis séricos de IgE quando comparados aos seus respectivos controles selvagens (NFAT1^{+/+}). A fim de confirmar esses resultados e caracterizar o padrão da resposta alérgica desses animais, submetemos animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} ao mesmo modelo de pleurisia alérgica, como descrito na **Figura 6**.

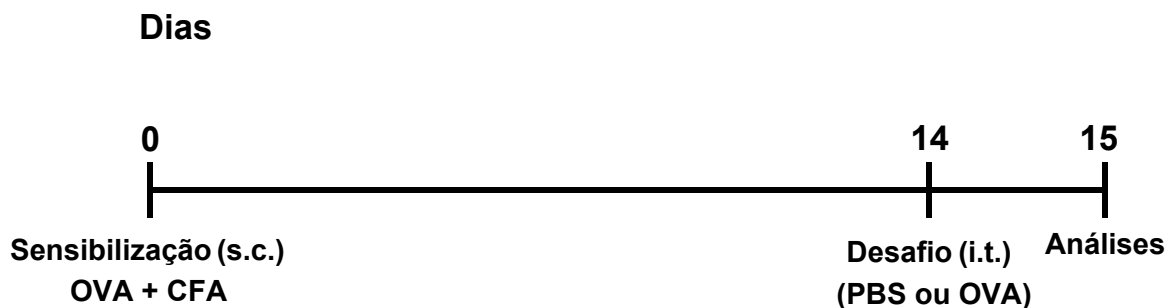


Figura 6: Esquema do modelo *in vivo* de pleurisia: Os animais foram sensibilizados subcutaneamente com OVA emulsificada em CFA em uma das patas traseiras. Quinze dias depois, os animais foram desafiados com uma injeção intratorácica de PBS ou OVA, conforme indicado. As análises seguintes foram feitas 24 h após o desafio.

Como o aumento dos níveis séricos de IgE é uma das características marcantes das patologias alérgicas, o sangue dos animais submetidos à inflamação alérgica foi coletado, processado e analisado para os níveis de IgE. Também foi avaliado o influxo de leucócitos na cavidade pleural de animais selvagens e deficientes para NFAT1, submetidos ao modelo de alergia descrito anteriormente (**Figura 6**).

Os animais desafiados com OVA desenvolveram um processo inflamatório alérgico aumentado quando comparados aos controles desafiados com PBS, uma vez que foi observado um maior influxo de eosinófilos na cavidade pleural tanto de animais NFAT1^{+/+}, quanto de animais NFAT1^{-/-} desafiados com OVA (**Figura 7**). Apesar de ambos animais apresentarem eosinofilia característica de uma resposta inflamatória alérgica, os animais NFAT1^{-/-} apresentam uma hipereosinofilia quando

comparados com seus respectivos controles selvagens (**Figura 7**). Da mesma forma, os animais NFAT1^{-/-} também apresentam uma alta concentração de IgE no soro (**Figura 8**). Esses resultados corroboram dados anteriores demonstrando que os animais NFAT1^{-/-} realmente apresentam uma resposta alérgica exacerbada quando comparados com seus respectivos controles.

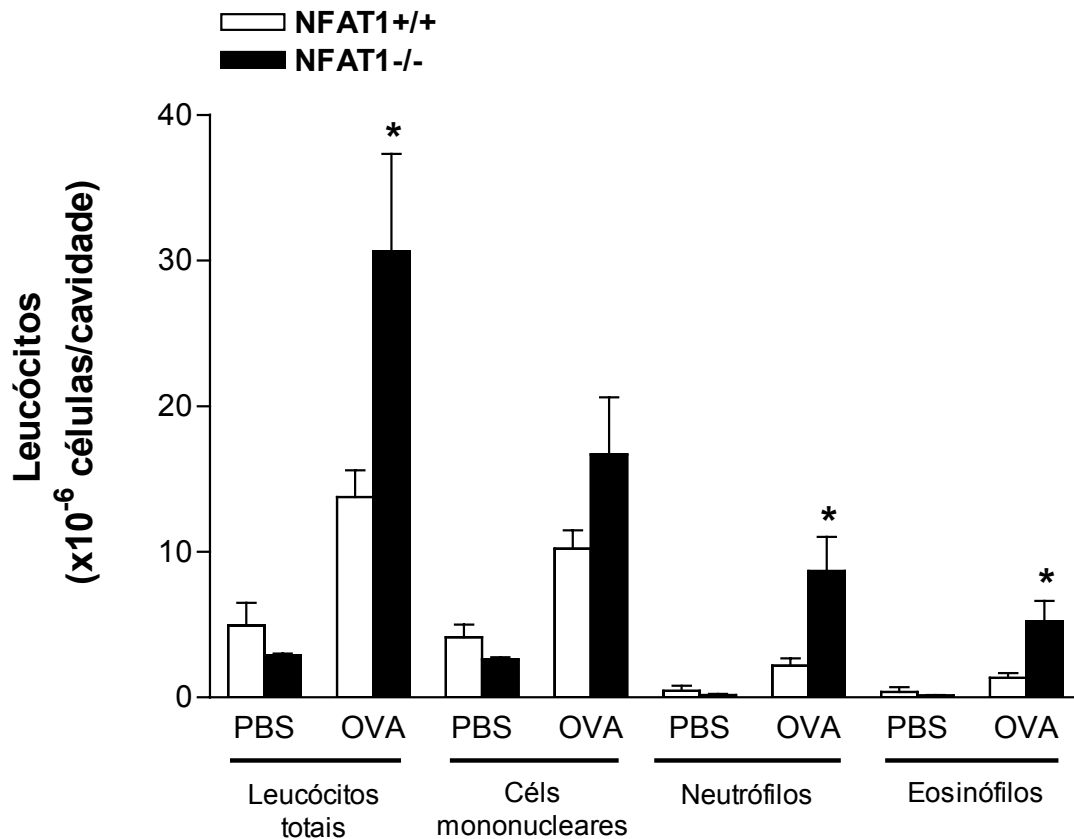


Figura 7: Caracterização do fenótipo alérgico de animais selvagens e deficientes para NFAT1 submetidos ao modelo de pleurisia. Animais selvagens (NFAT1^{+/+}) e deficientes (NFAT1^{-/-}) para NFAT1 foram sensibilizados como descrito na **Figura 6**. Vinte e quatro horas após o desafio, a cavidade torácica foi lavada e a suspensão celular foi citocentrifugada e corada com May-Grünwald/Giemsa para análise diferencial de leucócitos. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1^{+/+} desafiados com OVA ($p < 0,05$).

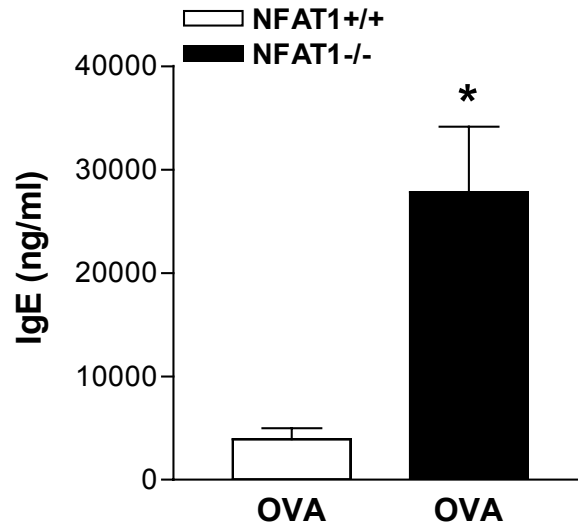


Figura 8: Caracterização dos níveis séricos de IgE de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de pleurisia. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 6**. Vinte e quatro horas após o desafio, o sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca, coagulado e centrifugado. O sobrenadante (soro) foi coletado e acessado para IgE através da metodologia de ELISA. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1+/+ desafiados com OVA ($p < 0,05$).

Com base nesses dados, estabelecemos um modelo de inflamação alérgica pulmonar que mimetiza a resposta asmática induzida por alérgenos a fim de avaliar o envolvimento do NFAT1 na patologia da asma. Os animais foram então submetidos a um modelo experimental de asma, conforme descrito na **Figura 9**.

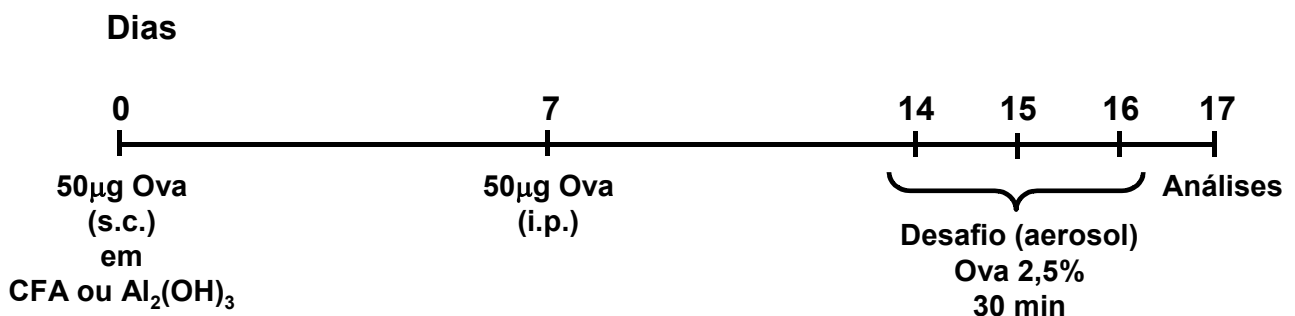


Figura 9: Esquema do modelo experimental de asma. Os animais foram sensibilizados subcutaneamente com OVA emulsificada em CFA ou hidróxido de alumínio em uma das patas traseiras. Sete dias após a sensibilização os animais foram novamente sensibilizados com OVA intraperitonealmente, na ausência de adjuvante. Sete dias depois os animais foram desafiados através da exposição a um aerosol de PBS ou OVA durante 3 dias consecutivos. As análises seguintes foram feitas 24 h após o desafio.

O lavado broncoalveolar (BAL) desses animais mostrou que os animais desafiados com OVA apresentam aumento do influxo de leucócitos totais, particularmente de eosinófilos, quando comparados aos seus respectivos controles desafiados com PBS (**Figura 10**). Esse fato demonstra a eficácia do modelo experimental escolhido uma vez que a eosinofilia é característica marcante das patologias asmáticas. Tal como no modelo de pleurisia, os animais NFAT1^{-/-} desafiados com OVA apresentaram hipereosinofilia quando comparados com os animais selvagens (**Figura 10**). De forma similar, os animais NFAT1^{-/-} também apresentam uma alta concentração de IgE sérica, quando comparados com os animais NFAT1^{+/+} (**Figura 11**).

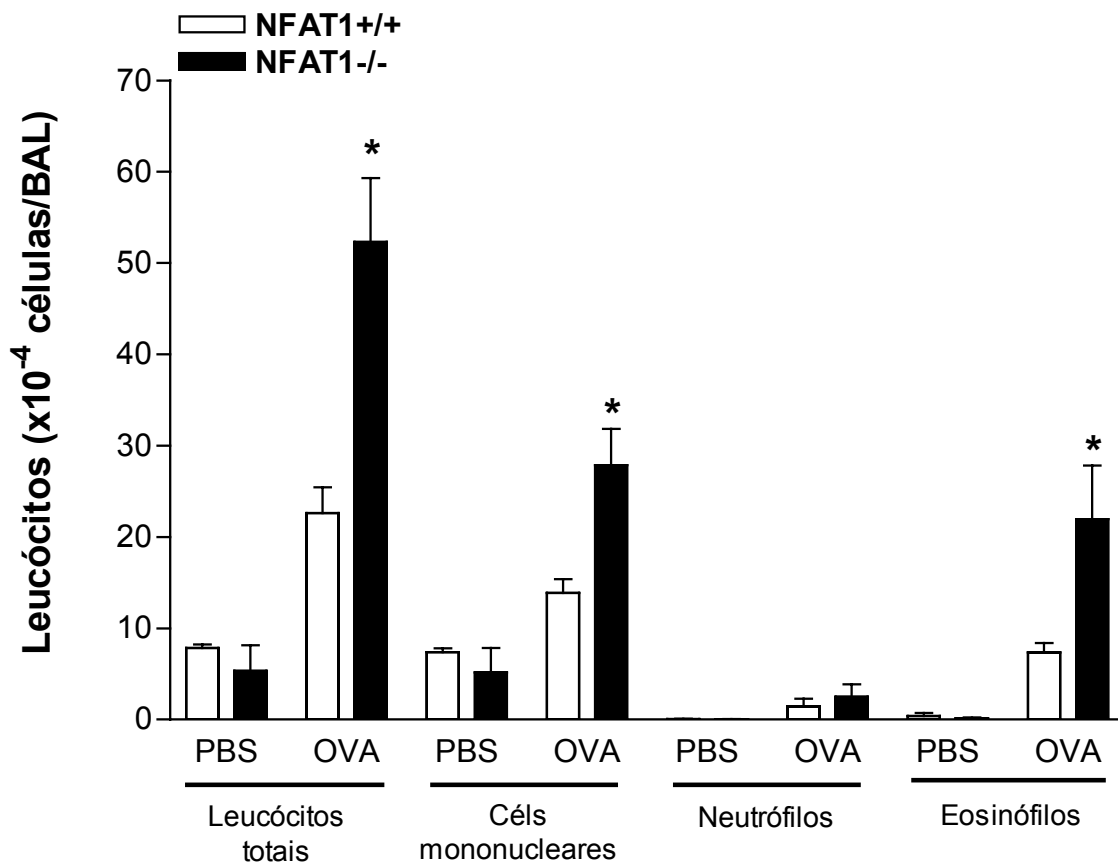


Figura 10: Caracterização do lavado broncoalveolar (BAL) de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} submetidos ao modelo de asma. Animais selvagens (NFAT1^{+/+}) e deficientes (NFAT1^{-/-}) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após a última aerolização foi feito um lavado broncoalveolar dos animais. A suspensão celular recolhida foi citocentrifugada e corada com May-Grünwald/Giemsa para análise diferencial de leucócitos. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 4 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1^{+/+} desafiados com OVA ($p < 0,05$).

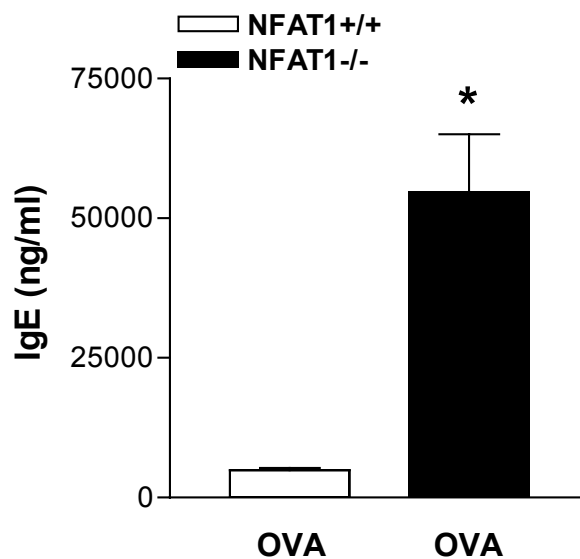


Figura 11: Caracterização dos níveis séricos de IgE de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após o desafio, o sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca, coagulado e centrifugado. O sobrenadante (soro) foi coletado e acessado para IgE através da metodologia de ELISA. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1+/+ desafiados com OVA ($p < 0,05$).

Como demonstrado por Kiani e colaboradores (1997), os linfócitos T CD4⁺ de animais deficientes em NFAT1, quando submetidos a um protocolo de diferenciação *in vitro* na ausência de citocinas exógenas, diferenciam-se preferencialmente para um fenótipo Th2. Para caracterizar o padrão de resposta predominante e a produção de IFN- γ e IL-4 *in vivo* pelos linfócitos destes animais, estes foram sensibilizados subcutaneamente com OVA em uma das patas traseiras. Quinze dias após a sensibilização, os linfonodos drenantes das patas sensibilizadas foram então recolhidos e estimulados *in vitro*. Na **Figura 12** podemos observar que, de fato, os linfócitos NFAT1-/- apresentam alta produção de IL-4 e baixa produção de IFN- γ , caracterizando a resposta Th2 predominante observada anteriormente. Já os linfócitos dos animais NFAT1+/+ apresentam alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4, característica de uma resposta Th1 (**Figura 12**). Esses dados demonstram que os animais NFAT1-/- apresentam um padrão de resposta característico de um fenótipo Th2 *in vivo*. Além disso, observamos que os animais

NFAT1^{-/-} apresentam inflamação alérgica exacerbada em relação aos animais NFAT1^{+/+}, caracterizada por hipereosinofilia e altos níveis de IgE sérica. Em conjunto, esses resultados sugerem um papel importante do NFAT1 na patologia de doenças alérgicas pulmonares.

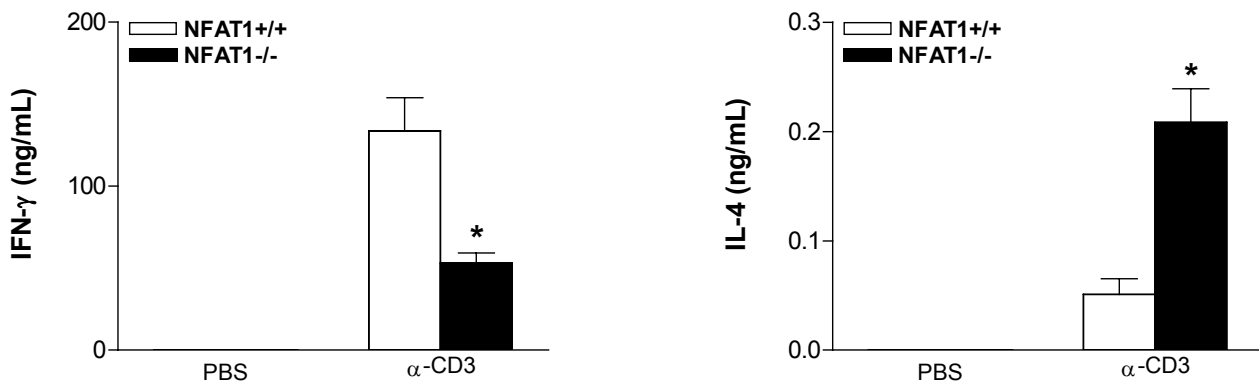


Figura 12: Padrão de produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} sensibilizados *in vivo*. Animais selvagens (NFAT1^{+/+}) e deficientes (NFAT1^{-/-}) para NFAT1 foram sensibilizados como descrito na **Figura 9**. Quinze dias depois, os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) das patas traseiras foram recolhidos e as células foram estimuladas *in vitro* por 48 h com anti-CD3 fixado à placa. Os sobrenadantes foram então recolhidos e acessados para IFN- γ e IL-4 através da metodologia de ELISA. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 2 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1^{+/+} (p<0,05).

A fim de caracterizarmos o perfil de citocinas e quimiocinas estabelecido no microambiente pulmonar desses animais, os níveis de IL-13 e eotaxina foram medidos no tecido pulmonar de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} submetidos ao modelo descrito na **Figura 9** e desafiados com OVA.

Como demonstrado na **Figura 13**, os animais NFAT1^{-/-} apresentam níveis de IL-13 no pulmão ligeiramente aumentados se comparados aos níveis apresentados pelos animais NFAT1^{+/+}, apesar desse resultado não ter atingido diferença estatisticamente significativa (p=0,1793). Além disso, os animais NFAT1^{-/-} possuem níveis aumentados de eotaxina quando comparados aos animais NFAT1^{+/+}, corroborando o maior influxo de eosinófilos no pulmão demonstrado nas análises de BAL dos animais NFAT1^{-/-} (**Figura 14**).

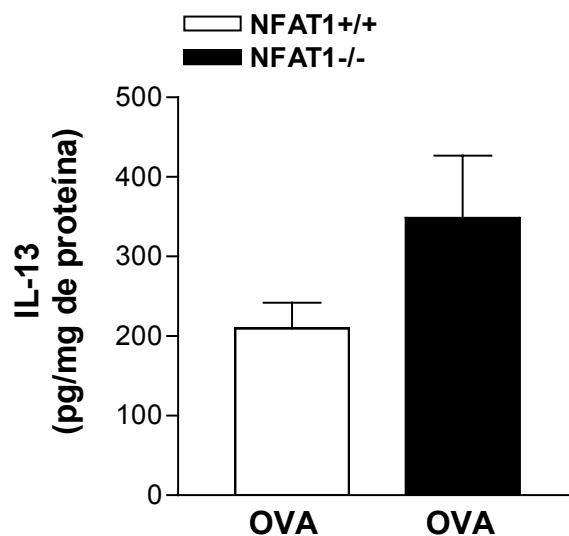


Figura 13: Níveis de IL-13 nos pulmões de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- desafiados com OVA. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após o desafio, o pulmão dos animais foi isolado, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi coletado e acessado para IL-13 através da metodologia de ELISA. Resultado expresso em média \pm EPM (n=4), representativo de 1 experimento.

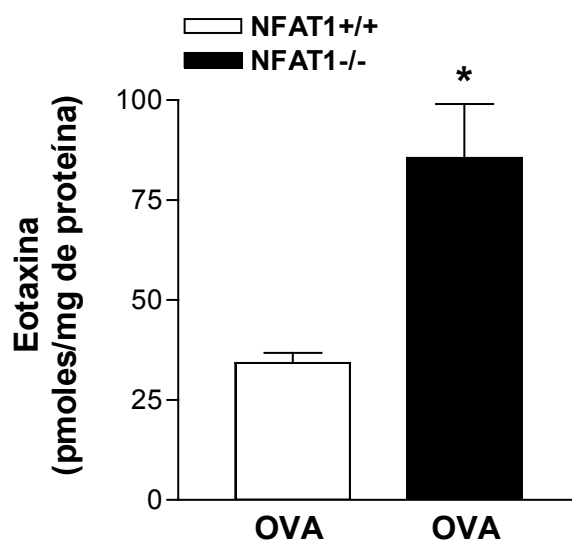


Figura 14: Níveis de eotaxina nos pulmões de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- desafiados com OVA. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após o desafio, o pulmão dos animais foi isolado, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi coletado e acessado para eotaxina através da metodologia de ELISA. Resultado expresso em média \pm EPM (n=4), representativo de 1 experimento. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1+/+ ($p < 0,05$).

Com base nesses resultados decidimos avaliar as características histológicas do pulmão de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/-, a fim de verificar quaisquer alterações na estruturação do tecido pulmonar desses animais. Para isso, os animais foram submetidos ao modelo de asma descrito na **Figura 9** e 24 h após a última aerolização seus pulmões foram isolados, fixados, embebidos em parafina e seccionados. As secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para avaliarmos a estruturação tecidual geral do pulmão, bem como a ausência ou presença de influxo leucocitário; tricrômico de Gomori, para avaliarmos a deposição de colágeno no tecido; e PAS (Periodic Acid-Schiff), a fim de verificarmos a produção de mucopolissacarídeos pelas células caliciformes.

Na **Figura 15 (A e C)** podemos observar que os animais desafiados com PBS, tanto NFAT1+/+ quanto NFAT1-/-, apresentam parênquima pulmonar limpo, sem qualquer infiltrado celular. Já os animais desafiados com OVA apresentam intenso infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença de leucócitos tanto no parênquima pulmonar quanto na região peribronquiolar (**Figura 15B e D**). Como demonstrado na **Figura 15D** os animais NFAT1-/- apresentam infiltrado leucocitário aumentado em relação aos animais NFAT1+/+, corroborando os dados obtidos nas análises de BAL.

Em comparação aos seus respectivos controles, os animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- desafiados com OVA também apresentam deposição de colágeno na região peribronquiolar (**Figura 16A e C**). Podemos observar também que os animais NFAT1-/- demonstram maior acúmulo de colágeno nessa região, evidenciado por um espessamento maior da área logo abaixo da membrana basal em comparação aos animais NFAT1+/+ (**Figura 16C e D**).

Como demonstrado na **Figura 17**, comparados com os animais controle desafiados com PBS, há um grande aumento na produção de muco pelas células do epitélio dos animais NFAT1+/+ desafiados com OVA (**Figura 17A e B**). Por outro lado, esse aumento foi mais discreto quando comparamos a produção de muco pelas células dos animais NFAT1-/- com seus respectivos controles desafiados com PBS (**Figura 17C e D**). Da mesma forma, a produção de muco pelos animais NFAT1-/- também se apresenta diminuída em relação aos animais NFAT1+/+ (**Figura 17B e D**).

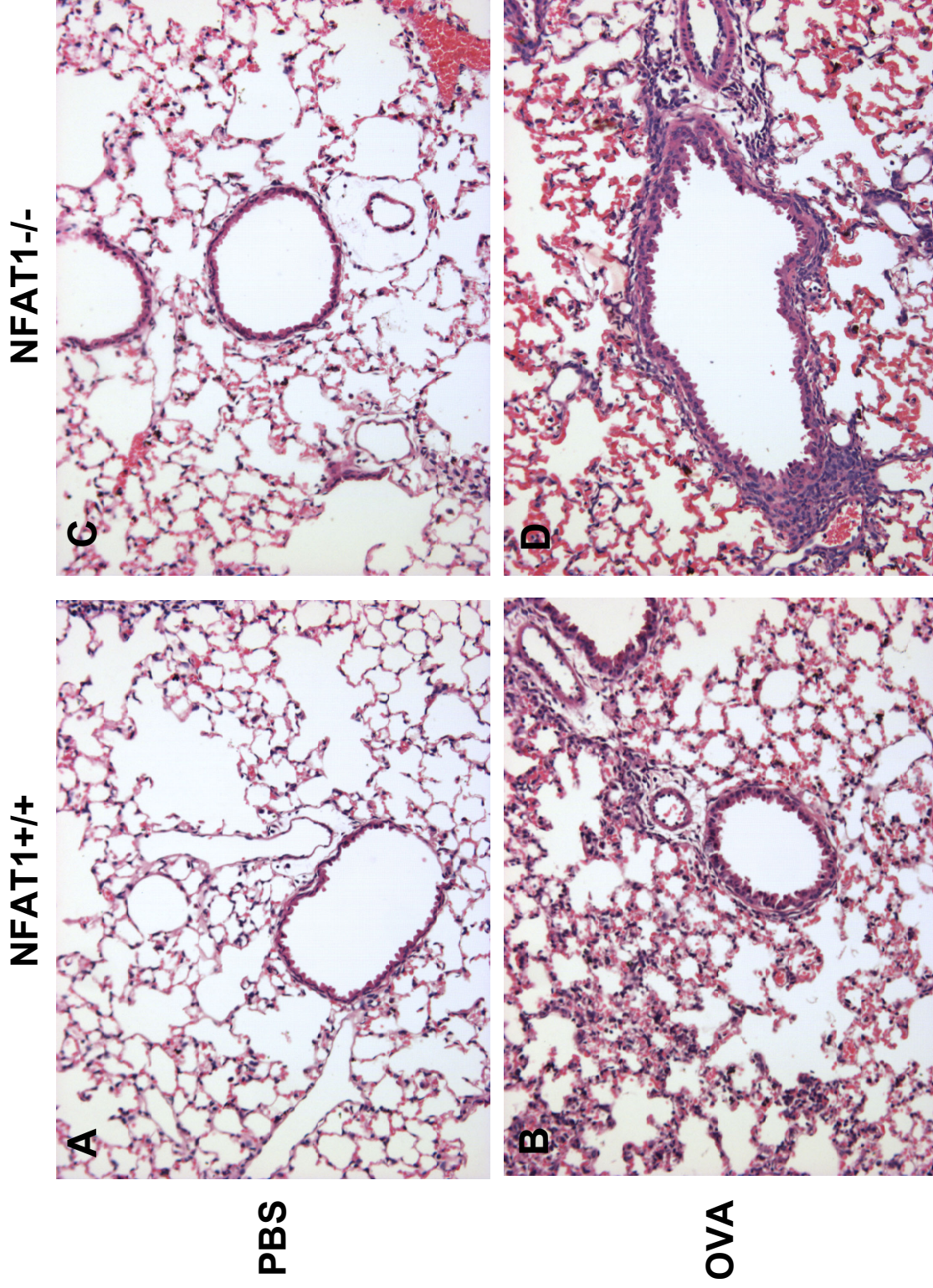


Figura 15: Histopatologia dos pulmões de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma. Animais selvagens (NFAT1+/+) (A e B) e deficientes (NFAT1-/-) (C e D) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões isolados e tiveram seus pulmões seccionados com o auxílio de um criostato. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e foram avaliadas por microscopia óptica com aumento de 40X.

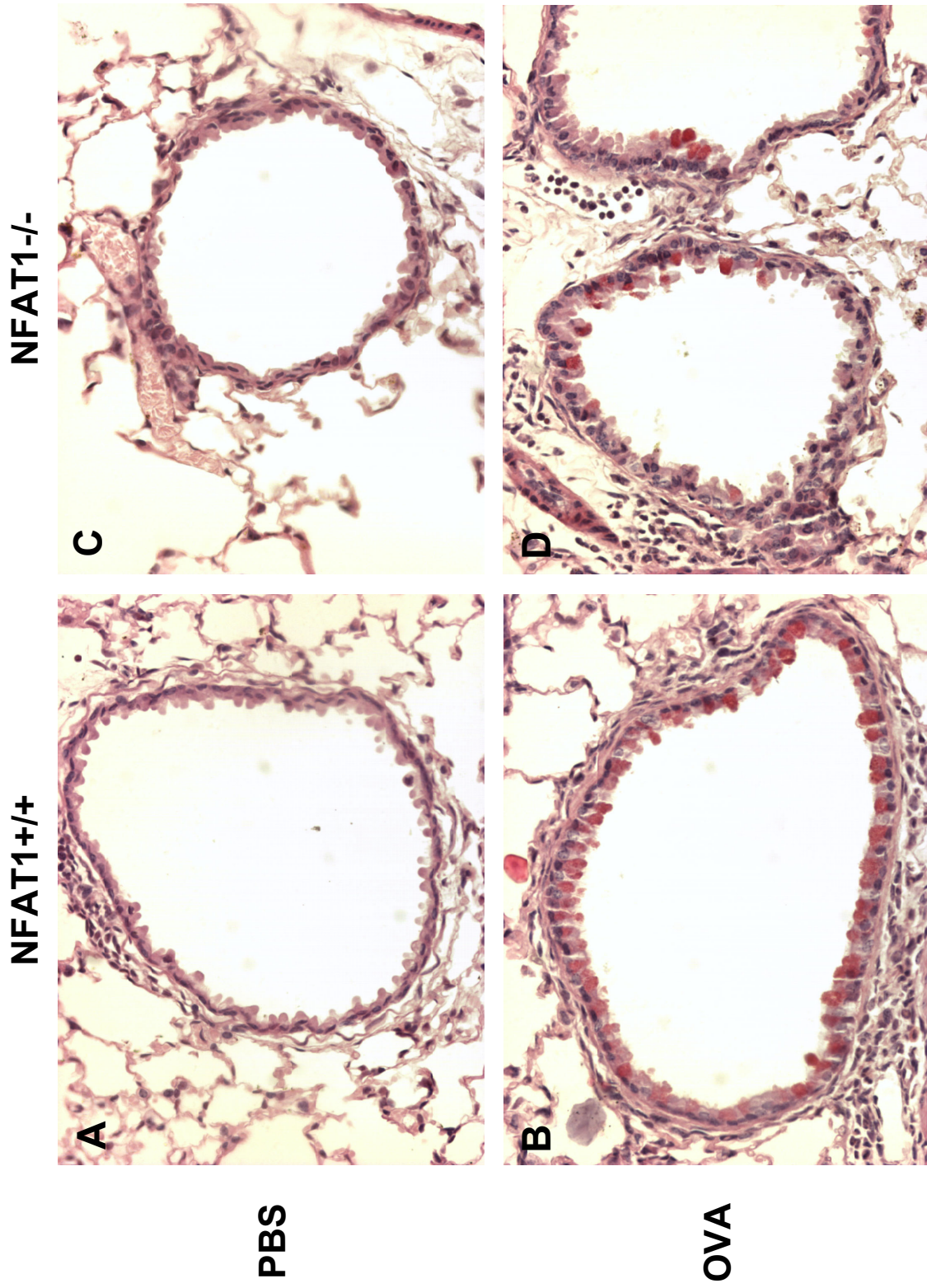


Figura 17: Histopatologia dos pulmões de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma. Animais selvagens (NFAT1+/+) (A e B) e deficientes (NFAT1-/-) (C e D) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões isolados, fixados, embebidos em parafina e seccionados com o auxílio de um criostato. As lâminas foram coradas com PAS (Periodic Acid-Schiff) e avaliadas por microscopia óptica com aumento de 60X.

A asma é uma manifestação alérgica caracterizada principalmente pela inflamação crônica da mucosa brônquica, níveis aumentados de IgE sérica e por uma hiper-reatividade das vias aéreas. Os resultados anteriores mostram que os animais NFAT1^{-/-} submetidos ao modelo experimental de asma apresentam inflamação pulmonar, caracterizada por uma hipereosinofilia, e altos níveis de IgE sérica, além de apresentarem alterações características da patologia asmática na estrutura do pulmão, sugerindo que esses animais desenvolvem asma exacerbada em relação a seus respectivos controles. Dessa forma, decidimos avaliar a hiper-reatividade brônquica dos animais selvagens e deficientes para NFAT1 através do método não-invasivo de “enhanced pause” (Penh). Os animais foram então submetidos ao modelo experimental de asma descrito na **Figura 9** e a hiper-reatividade a um broncoconstrictor análogo à acetilcolina, a metacolina, foi avaliada 24 h após a última aerolização.

Na **Figura 18**, podemos observar que comparados com os animais desafiados com PBS, os animais NFAT1^{+/+} desafiados com OVA apresentam broncoconstrição aumentada em resposta à metacolina, corroborando os dados de eosinofilia e IgE sérica observados anteriormente (**Figuras 10 e 11**). Já os animais NFAT1^{-/-} desafiados com OVA, os quais possuem inflamação e níveis de IgE aumentados em relação aos animais NFAT1^{+/+}, surpreendentemente não apresentam hiper-reatividade em relação aos controles desafiados com PBS, mesmo quando submetidos às maiores concentrações de metacolina (**Figura 18**). Similarmente, os animais NFAT1^{-/-} desafiados com PBS também não apresentam a broncoconstrição basal observada nos animais NFAT1^{+/+} desafiados da mesma maneira (**Figura 18**).

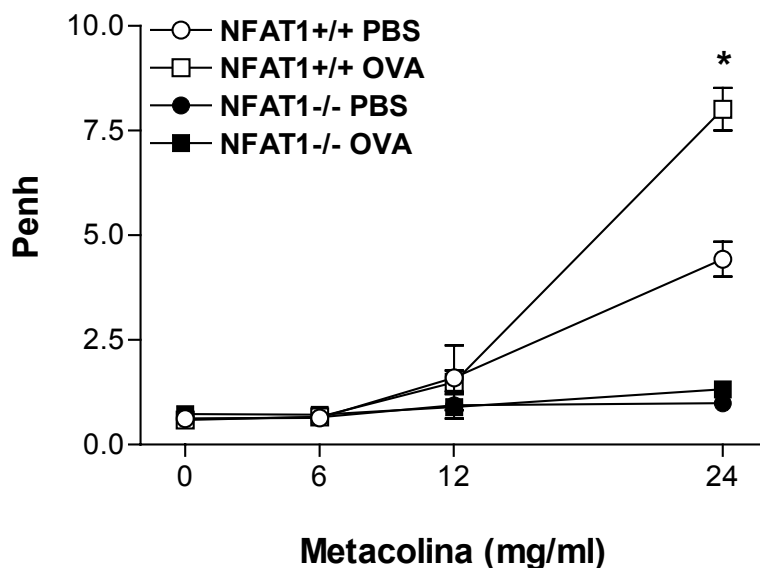


Figura 18: Hiper-reatividade à metacolina de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após a última aerolização a hiper-reatividade brônquica dos animais foi analisada por pletismografia barométrica. Os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição a aerosol de metacolina, conforme indicado. A resistência é expressa em Penh (enhanced pause), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1-/- desafiados com OVA ($p < 0,05$).

A fim de adequarmos nosso modelo aos modelos experimentais de asma mais utilizados na literatura e dessa forma corroborar os resultados de hiper-reatividade observados, utilizamos como adjuvante na sensibilização o hidróxido de alumínio ao invés do adjuvante completo de Freund (CFA). Os animais foram então submetidos ao mesmo modelo experimental de asma descrito na **Figura 9** e um lavado broncoalveolar foi feito para avaliar o influxo de leucócitos no pulmão dos animais. Como demonstrado na **Figura 19**, tanto os animais NFAT1+/+, quanto os animais NFAT1-/- desafiados com OVA apresentam níveis similares de eosinofilia pulmonar, ao contrário do que ocorre quando os animais são sensibilizados na presença de CFA (**Figura 10**).

Apesar de não observarmos diferenças no influxo de eosinófilos entre os animais selvagens e deficientes para NFAT1, ambos apresentam influxo inflamatório característico da resposta asmática (**Figura 19**). Por esse motivo, decidimos avaliar a hiper-reatividade brônquica desses animais sensibilizados com hidróxido de

alumínio. Os animais foram então submetidos ao modelo experimental de asma descrito na **Figura 9** e a hiper-reatividade brônquica à metacolina foi avaliada 24 h após a última aerolização. Na **Figura 20** podemos observar que enquanto os animais NFAT1+/+ desafiados com OVA apresentam hiper-reatividade brônquica em relação aos controles desafiados com PBS, os animais NFAT1-/- não induzem a broncoconstrição característica dessa hiper-reatividade. Portanto, independente do adjuvante utilizado na sensibilização dos animais, os animais NFAT1-/- não induzem broncoconstrição em resposta à metacolina, mesmo quando submetidos às maiores concentrações desse mediador.

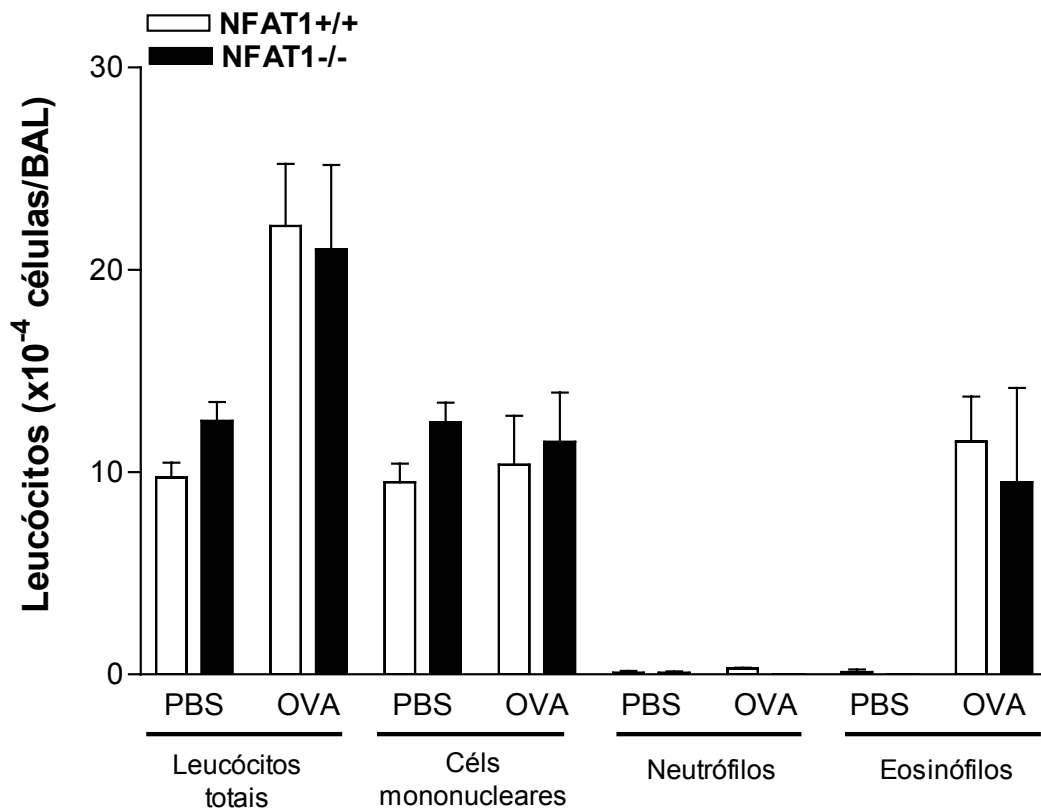


Figura 19: Caracterização do lavado broncoalveolar (BAL) de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma na presença de hidróxido de alumínio. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após a última aerolização o pulmão dos animais foi lavado com PBS 0.1% BSA. A suspensão celular recolhida foi citocentrifugada e corada com May-Grünwald/Giemsa para análise diferencial de leucócitos. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1+/+ desafiados com OVA ($p < 0,05$).

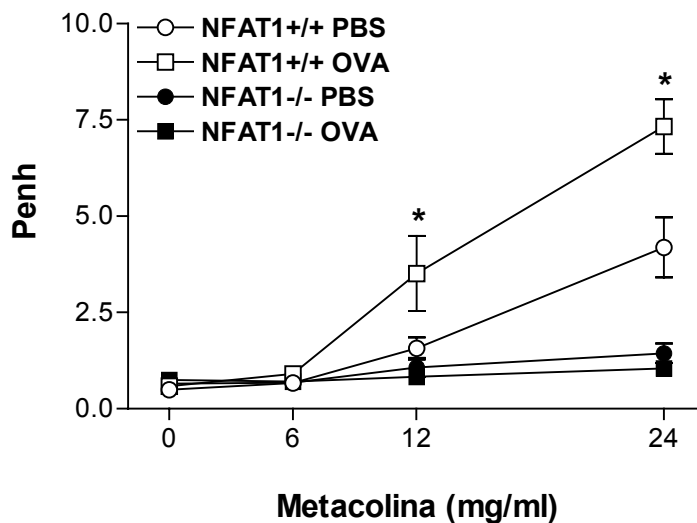


Figura 20: Hiper-reatividade à metacolina de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- submetidos ao modelo de asma na presença de hidróxido de alumínio. Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após a última aerolização a hiper-reatividade brônquica dos animais foi analisada por pletismografia barométrica. Os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição a aerosol de metacolina, conforme indicado. A resistência é expressa em Penh (enhanced pause), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com NFAT1-/- desafiados com OVA ($p < 0,05$).

Com base nesses dados, decidimos investigar a capacidade de broncoconstrição natural de animais “naive”, não sensibilizados ou submetidos a qualquer manipulação. Para isso animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- “naive” foram submetidos a aerosol de diferentes concentrações de metacolina. Verificamos então que os animais NFAT1-/- apresentam broncoconstrição diminuída em relação aos seus respectivos controles selvagens (**Figura 21**). Ou seja, os animais NFAT1-/- apresentam naturalmente uma capacidade de broncoconstrição diminuída em resposta à metacolina.

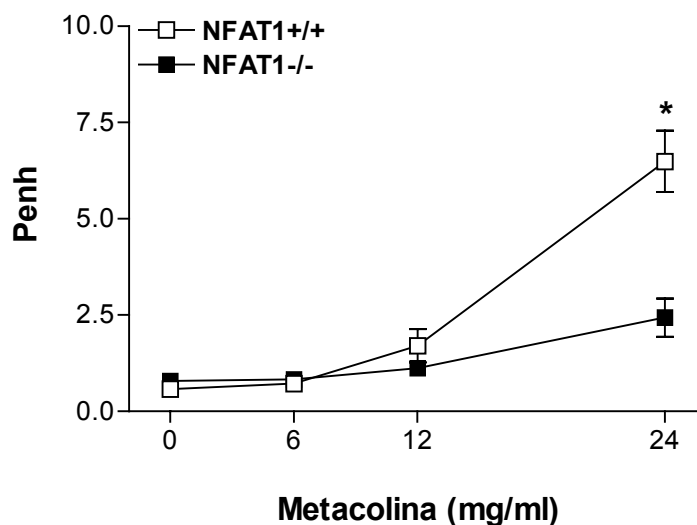


Figura 21: Reatividade à metacolina de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- “naive”. A reatividade brônquica dos animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foi analisada por pletismografia barométrica. Os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição a aerosol de metacolina, conforme indicado. A resistência é expressa em Penh (enhanced pause), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante. Resultado expresso em média \pm EPM (n=5), representativo de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com animais NFAT1-/- desafiados com OVA ($p < 0,05$).

A fim de confirmar o envolvimento do NFAT1 no fenômeno de broncoconstrição induzida por metacolina, animais NFAT1+/+ “naive” receberam diferentes concentrações de ciclosporina A (CsA), um bloqueador da ativação do NFAT. Três horas após o tratamento, os animais NFAT1+/+ tratados com CsA, juntamente com animais “naive” NFAT1+/+ não-tratados e animais “naive” NFAT1-/-, foram submetidos a aerosol de diferentes concentrações de metacolina. Os animais NFAT1+/+ tratados com a menor concentração de CsA (20 mg/kg) já apresentam redução na broncoconstrição induzida por metacolina quando comparados aos animais NFAT1+/+ (**Figura 22A**). Essa redução torna-se mais pronunciada nos animais tratados com 50 mg/kg de CsA, os quais já apresentam broncoconstrição diminuída quando submetidos a concentração de 12 mg/ml de metacolina, aproximando-se dos níveis de Penh apresentados pelos animais NFAT1-/- (**Figura 22B**). Esses resultados demonstram que ao bloquear a ativação do NFAT1, ocorre inibição da broncoconstrição induzida por metacolina de forma similar ao que ocorre

com os animais NFAT1^{-/-}, sugerindo fortemente o envolvimento do NFAT1 nesse processo.

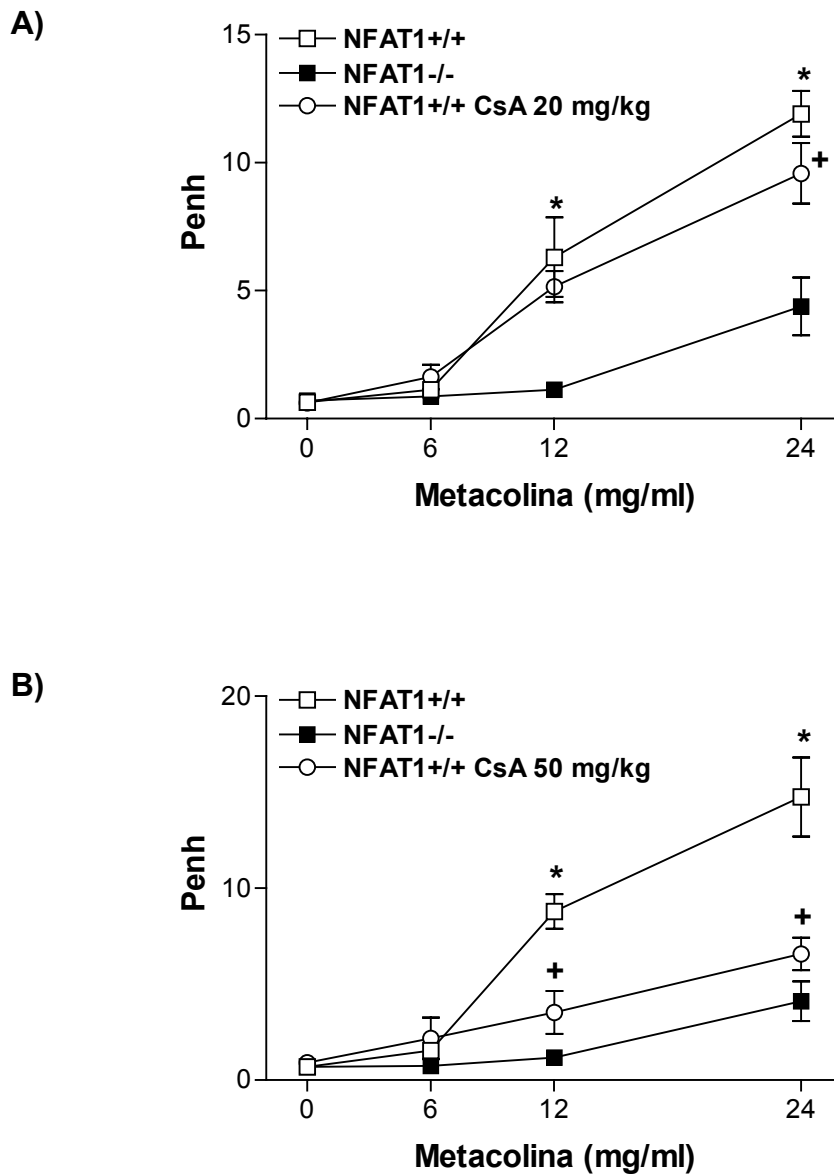


Figura 22: Reatividade à metacolina de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} “naive” tratados com CsA. A reatividade brônquica dos animais selvagens (NFAT1^{+/+}), tratados ou não com diferentes concentrações de Ciclosporina A (CsA), e deficientes (NFAT1^{-/-}) para NFAT1 foi analisada por pletismografia barométrica. Os animais foram tratados com **A)** 20 mg/kg ou **B)** 50 mg/kg de CsA e foram analisados 3 horas após o tratamento. Os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição a aerosol de metacolina, conforme indicado. A resistência é expressa em Penh (enhanced pause), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante. Resultados expressos em média \pm EPM (n=5), representativos de 2 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com os animais NFAT1^{-/-} ($p < 0,05$). (+) Resultados significativamente diferentes quando comparados com os animais NFAT1^{+/+} ($p < 0,05$).

Para avaliar a especificidade da participação do NFAT1 na broncoconstrição induzida pela via colinérgica utilizamos um mediador que induz broncoconstrição por outra via. Para isso animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- “naive” foram submetidos a aerosol de diferentes concentrações de serotonina. Verificamos então que os animais NFAT1-/- apresentam níveis de broncoconstrição similares aos níveis dos animais NFAT1+/+ (**Figura 23A**). Portanto, os animais NFAT1-/- têm capacidade normal de broncoconstrição em resposta à serotonina, mostrando que as células da musculatura lisa do pulmão desses animais têm capacidade de contração. Dessa forma, os dados sugerem que a falha na indução da resposta broncoconstrictora está envolvida exclusivamente com a via dos receptores muscarínicos.

Baseados nesses resultados decidimos investigar os níveis de hiperreatividade à serotonina dos animais NFAT1-/- e NFAT1+/+ quando os submetemos ao modelo experimental de asma utilizado inicialmente. Na **Figura 23B** podemos observar que os animais NFAT1-/- desafiados com OVA apresentam hiperreatividade brônquica aumentada em relação aos animais NFAT1+/+ desafiados da mesma maneira. Esses resultados demonstram que os animais NFAT1-/- são hiperreativos e têm real capacidade de broncoconstrição, perdendo essa capacidade quando esta é especificamente induzida por um estímulo colinérgico, como a metacolina.

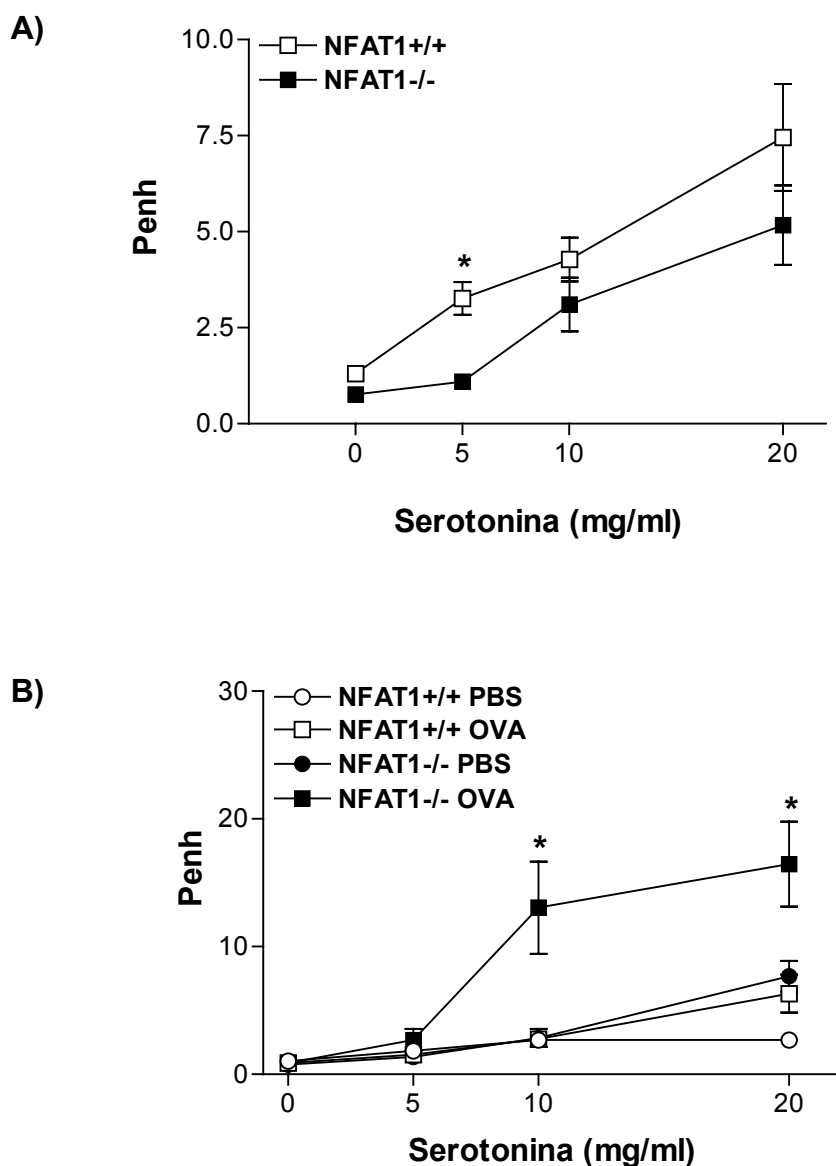


Figura 23: (Hiper-) reatividade à serotonina de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- “naive” e submetidos ao modelo de asma. A) A reatividade brônquica dos animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foi analisada por pletismografia barométrica. **B)** Animais selvagens (NFAT1+/+) e deficientes (NFAT1-/-) para NFAT1 foram sensibilizados e desafiados como descrito na **Figura 9**. Vinte e quatro horas após a última aerolização a hiper-reatividade brônquica dos animais foi analisada por pletismografia barométrica. **A e B)** Os parâmetros respiratórios foram medidos após exposição a aerosol de serotonina, conforme indicado. A resistência é expressa em Penh (enhanced pause), de acordo com os parâmetros recomendados pelo fabricante. Resultados expressos em média \pm EPM (n=5), representativos de 3 experimentos independentes. (*) Resultados significativamente diferentes quando comparados com os animais NFAT1+/+ desafiados com OVA (**B**) ou não (**A**) ($p < 0,05$).

Uma das hipóteses que poderia explicar a ausência de broncoconstrição induzida pela via colinérgica seria a ausência dos receptores muscarínicos nas células do pulmão de animais NFAT1^{-/-}. Para avaliarmos essa hipótese fizemos uma reação de RT-PCR utilizando como amostras o RNA total do pulmão de três animais “naive” individuais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}.

Na **Figura 24** podemos verificar que ambas linhagens de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} expressam mRNAs para esses receptores em seu tecido pulmonar, em quantidades relativamente similares. Dessa forma a ausência de hiper-reatividade dos animais NFAT1^{-/-} em relação aos controles selvagens não pode ser explicada por uma ausência ou diminuição da expressão do mRNA para os receptores da via colinérgica nos pulmões desses animais.

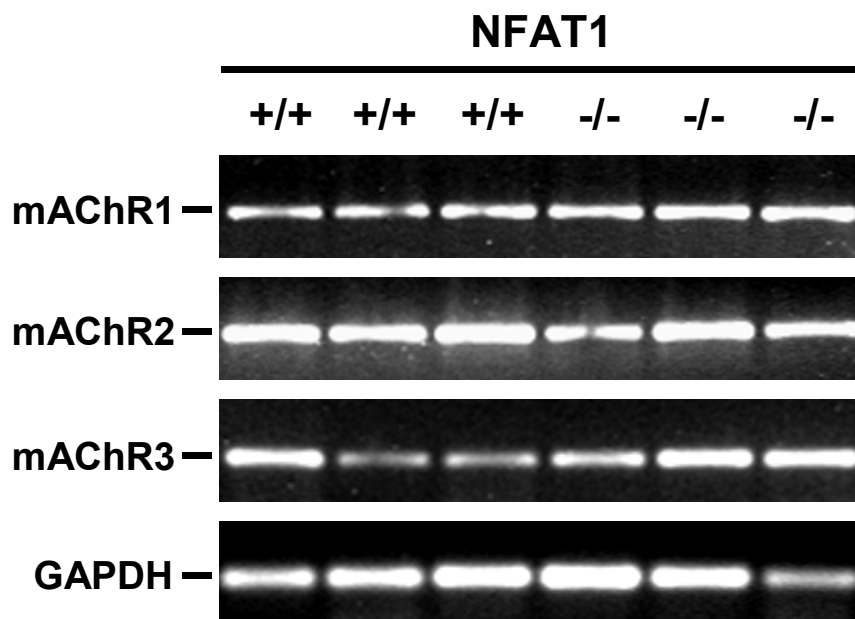


Figura 24: Análise por RT-PCR da expressão dos receptores muscarínicos 1-3 em extratos de tecido pulmonar de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. Primers específicos para os receptores mACHR1, 2 e 3 foram utilizados para amplificar o cDNA derivado de extratos de tecido pulmonar de animais NFAT1^{+/+} (três primeiras colunas) e NFAT1^{-/-} (três últimas colunas). Os detalhes da seqüência dos primers ou condições da reação de RT-PCR estão descritos na **seção 2.12** do Material e Métodos.

4. DISCUSSÃO

A incidência, morbidade e mortalidade da asma cresceram mundialmente nas últimas décadas. A asma é uma doença inflamatória do pulmão, extremamente complexa, caracterizada pela obstrução do fluxo de ar para as vias aéreas, hiper-reatividade brônquica e inflamação das vias aéreas.

A hiper-reatividade brônquica é uma característica marcante da asma, definida como uma broncoconstrição excessiva das vias aéreas em resposta a uma variedade de estímulos contráteis. Elucidar os mecanismos moleculares que induzem ou mantêm essa hiper-reatividade é extremamente importante para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças pulmonares. Diversas evidências sugerem que a contração da musculatura lisa das vias aéreas em resposta à estimulação por receptores acoplados a proteínas G regula o tônus broncomotor (revisto em Amrani & Panettieri, 2002). A contração da musculatura lisa é iniciada por aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} e subsequente ativação da maquinaria contrátil. Os níveis intracelulares de Ca^{2+} são o principal determinante na contratibilidade das células da musculatura lisa. O NFAT1 é um fator de transcrição, constitutivamente expresso no citoplasma, ativado por Ca^{2+} (revisto em Rao *et al.*, 1997). Animais geneticamente deficientes para NFAT1, ao serem submetidos a um modelo de inflamação pulmonar alérgica, apresentam uma resposta exacerbada quando comparados a seus respectivos controles (Viola *et al.*, 1998). Apesar disso, nenhum estudo sobre a fisiologia pulmonar desses animais em resposta a estímulos alérgicos havia sido feito até o momento.

A fim de confirmar os resultados de Viola e colaboradores e caracterizar o padrão de resposta alérgica dos animais NFAT1^{-/-}, esses animais foram submetidos ao modelo de pleurisia alérgica utilizado anteriormente por esses autores (Viola *et al.*, 1998) (**Figura 6**). De fato, observamos que os animais NFAT1^{-/-} desenvolvem uma resposta alérgica exacerbada em relação aos animais NFAT1^{+/+}, caracterizada por hipereosinofilia e altos níveis séricos de IgE (**Figuras 7 e 8**).

Com base nesses resultados decidimos avaliar o papel do NFAT1 na patofisiologia de uma importante doença alérgica, a asma. Para isso, os animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram submetidos a um modelo experimental de asma (**Figura 9**). A partir daí foram avaliados os principais fatores característicos dessa doença: influxo de eosinófilos, níveis de IgE, produção de citocinas, níveis de quimiocinas e citocinas no pulmão, estrutura do tecido pulmonar e, por fim, hiper-reatividade brônquica.

O lavado broncoalveolar dos animais submetidos ao modelo de asma demonstrou novamente uma hipereosinofilia dos animais NFAT1^{-/-} em relação aos animais NFAT1^{+/+} (**Figura 10**). A intensa infiltração da mucosa brônquica por eosinófilos é uma característica importante da asma (Azzawi *et al.*, 1990). Essa infiltração de eosinófilos foi correlacionada com a presença de linfócitos T ativados em fluidos de lavagem broncoalveolar de pacientes asmáticos, da mesma forma que a severidade da reação asmática foi associada ao número de linfócitos T ativados e eosinófilos (Walker *et al.*, 1991). Além disso, a análise da frequência de eosinófilos presentes no escarro de 205 pacientes asmáticos demonstrou uma correlação significativa entre eosinofilia e hiper-reatividade das vias aéreas (Woodruff *et al.*, 2001). De fato, as proteínas liberadas por eosinófilos ativados, tais como ECP e MBP, são tóxicas para o epitélio das vias aéreas. O dano ao epitélio pode levar à hiper-reatividade ao alterar a função de enzimas importantes para a degradação de neuropeptídeos (revisto em Wills-Karp, 1999). Estudos em cobaias também demonstraram que a MBP pode induzir hiper-reatividade ao inibir competitivamente a ligação da ACh ao receptor muscarínico M₂ nos nervos parassimpáticos, resultando num aumento ao invés de inibição da liberação de ACh (Jacoby *et al.*, 1993).

A dosagem dos níveis de IgE também confirmou os dados do modelo de pleurisia alérgica: os animais NFAT1^{-/-} apresentam maiores níveis de IgE no soro que seus respectivos controles (**Figura 11**). A IgE secretada liga-se a receptores de Fc específicos (Fc ϵ R) na superfície de mastócitos teciduais ou basófilos sangüíneos, preparando essas células para serem ativadas por antígenos. Uma vez ativadas essas células liberam mediadores lipídicos e vasoativos, proteases,

fatores quimiotáticos e citocinas, que irão contribuir para o desenvolvimento da resposta alérgica.

O fenótipo alérgico apresentado por esses animais foi correlacionado anteriormente com uma alta produção de IL-4 e IL-5, decorrentes de uma resposta Th2 predominante (Viola *et al.*, 1998). De fato, linfócitos CD4⁺ Th2 e suas citocinas têm um papel importante tanto no recrutamento de eosinófilos quanto na indução da produção de IgE. A depleção de células Th2 antígeno-específicas ou das citocinas (IL-4 e IL-5) produzidas por elas reduz significativamente a eosinofilia pulmonar (Garlisi *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 1996; Lukacs *et al.*, 1994). Neste estudo, verificamos que enquanto os animais NFAT1^{+/+} produzem altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, ocorre o inverso nos animais NFAT1^{-/-} (**Figura 12**). Esses resultados confirmam dados apresentados por Kiani e colaboradores (1997), os quais mostram que os linfócitos NFAT1^{-/-} produzem maiores quantidades de IL-4 que os linfócitos NFAT1^{+/+}. A expressão aumentada de IL-4 pelos linfócitos NFAT1^{-/-} foi atribuída a uma manutenção prolongada dos mRNAs para IL-4 por essas células (Kiani *et al.*, 1997). Resultados anteriores também mostram que os linfócitos T NFAT1^{-/-} já diferenciados apresentam níveis menores de expressão de mRNA para IFN- γ (Kiani *et al.*, 1997). Além disso, dados propostos por Kiani e colaboradores (2001) mostram que células CD4⁺ deficientes para NFAT1 apresentam um defeito intrínseco na expressão do gene de IFN- γ , manifestado por uma expressão diminuída dos níveis de mRNA e proteína. Adicionalmente, esses efeitos foram observados independentemente dos efeitos inibitórios da IL-4, uma vez que os animais utilizados nesse estudo são duplamente deficientes para NFAT1 e IL-4 (Kiani *et al.*, 2001).

Ao contrário do padrão de produção de IL-4 apresentado pelos animais NFAT1^{-/-}, os níveis de IL-13 no pulmão desses animais não diferiram significativamente dos níveis apresentados pelos animais NFAT1^{+/+} (**Figura 13**). Apesar disso, podemos observar uma tendência de aumento dessa citocina no pulmão dos animais NFAT1^{-/-} quando comparamos com os respectivos controles (**Figura 13**). Uma vez que Kiani e colaboradores (1997) demonstraram anteriormente que células CD4⁺ NFAT1^{-/-} apresentam alta produção de IL-13 e

Viola e colaboradores (1998) detectaram níveis aumentados dessa citocina na cavidade pleural de animais NFAT1^{-/-} submetidos ao modelo de pleurisia alérgica, acreditamos que esse resultado, por ser preliminar, ainda necessite de confirmação posterior.

A dosagem dos níveis de eotaxina nos mesmos extratos de pulmão de animais NFAT1^{-/-} desafiados com OVA demonstrou uma maior produção dessa quimiocina no tecido pulmonar desses animais (**Figura 14**). Esses dados corroboram os resultados de hipereosinofilia apresentados pelos animais NFAT1^{-/-}, uma vez que a eotaxina tem alto grau de seletividade para recrutamento de eosinófilos. Muitos tipos celulares são capazes de produzir eotaxina no pulmão, incluindo fibroblastos, células da musculatura lisa, células endoteliais, macrófagos alveolares, eosinófilos e linfócitos (revisto em Pease & Williams, 2001). A geração dessa quimiocina no pulmão é dependente da presença de linfócitos T uma vez que a depleção dessas células inibe a expressão de eotaxina, reduzindo a infiltração de eosinófilos no pulmão (MacLean *et al.*, 1996). Além disso, já foi demonstrado que a IL-4 estimula a transcrição do gene da eotaxina em fibroblastos pulmonares e células epiteliais das vias aéreas de humanos (Teran *et al.*, 1999; Stellato *et al.*, 1999). Em conjunto, esses dados sugerem que o infiltrado inflamatório aumentado associado aos altos níveis de IL-4 apresentados pelos animais NFAT1^{-/-} podem estar correlacionados com o aumento dos níveis de eotaxina no pulmão desses animais.

As alterações estruturais na arquitetura do tecido pulmonar são extremamente importantes na patofisiologia da asma. O interesse pelas alterações estruturais evidenciadas em vias aéreas asmáticas surgiu pela observação de que em alguns pacientes asmáticos havia queda da função pulmonar de caráter irreversível ao longo do tempo (Lange *et al.*, 1998). Além disso, alguns estudos mostraram que certos pacientes têm alteração persistente da função pulmonar, apesar de não manifestarem a doença clinicamente (revisto em Cohn *et al.*, 2004). Esse processo de remodelamento das vias aéreas é um processo crônico, resultante da persistência da inflamação que age em cada um dos compartimentos das vias aéreas e leva a um dano tecidual progressivo. Com base

nessas informações, avaliamos neste estudo as alterações mais imediatas que são características das vias aéreas asmáticas: infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e produção de muco.

Na **Figura 15** podemos observar que os animais NFAT1^{-/-} apresentam infiltrado leucocitário peribronquiolar aumentado em relação aos animais NFAT1^{+/+}. Esses resultados confirmam os dados anteriores que mostram um aumento do influxo de leucócitos totais nos fluidos de lavagem broncoalveolar desses animais (**Figura 10**). A infiltração de células inflamatórias no pulmão é um dos achados histopatológicos mais comuns na asma. A presença e ativação dessas células, principalmente de eosinófilos, linfócitos e mastócitos gera a liberação de diversos mediadores inflamatórios, como histamina, leucotrienos, PAF, etc. Os efeitos contráteis desses mediadores são mediados através da estimulação direta de receptores na musculatura lisa e através de mecanismos que incluem a indução da liberação de outros agonistas contráteis (revisto em Wills-Karp, 1999).

As paredes das vias aéreas são compostas por um epitélio associado a uma membrana basal e uma camada de tecido submucoso contendo glândulas, todas circundadas por musculatura lisa. A membrana basal consiste de três camadas: a lamina lúcida, adjacente à membrana plasmática basal das células que repousam na lamina, tipicamente células epiteliais; a lamina densa e a lamina reticularis, contendo fibrilas de colágeno, que liga a membrana basal ao tecido conjuntivo subjacente. Na asma ocorre o espessamento da lamina reticularis da membrana basal que se torna uma densa camada de colágeno fibrilar, decorrente de uma deposição anormal de componentes da matriz intersticial extracelular, como as fibras colágenas tipos I, III e V (Roche *et al.*, 1989). Os animais NFAT1^{-/-} desenvolvem maior acúmulo dessas fibras quando comparados aos animais NFAT1^{+/+} (**Figura 16**). Em humanos, esse espessamento, avaliado através de fragmentos de biópsias brônquicas feitas através da broncoscopia de 34 pacientes asmáticos, demonstrou uma correlação estreita entre espessura da membrana basal e gravidade da doença (Chetta *et al.*, 1997). As principais células associadas a esse acúmulo de colágeno e à fibrose subepitelial em pacientes

asmáticos são os miofibroblastos (Brewster *et al.*, 1990). Os fibroblastos, fontes bem conhecidas de colágeno intersticial, não expressam NFAT1 (revisto em Rao *et al.*, 1997). Portanto esse aumento da deposição de colágeno não pode ser explicado por uma superprodução dessa substância pelos miofibroblastos pulmonares. Entretanto, o grau de deposição subepitelial de colágeno está intimamente relacionado à expressão de TGF β_1 por eosinófilos presentes nas vias aéreas de pacientes asmáticos (Minshall *et al.*, 1997). Os níveis de TGF β_1 nos pulmões dos animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- não foram analisados nesse estudo, mas a hipereosinofilia dos animais NFAT1-/- sugere níveis aumentados dessa citocina que poderiam explicar o aumento da espessura da camada subepitelial observado nesses animais.

A produção excessiva de muco e a obstrução das vias aéreas devido ao acúmulo dessa substância são achados muito comuns em pacientes asmáticos. Essa hipersecreção de muco está associada a uma hipertrofia das glândulas mucosas e hiperplasia e metaplasia das células caliciformes na superfície do epitélio, culminando num aumento da secreção intraluminal com conseqüente obstrução das vias aéreas. O acúmulo de muco nas vias aéreas reduz a tensão superficial e aumenta a probabilidade de colapso das vias aéreas (revisto em Maddox & Schwartz, 2002). A capacidade secretória relativa das glândulas da submucosa e das células caliciformes ainda não é bem definida, mas estudos recentes demonstram que as células caliciformes presentes no epitélio são tão importantes, se não mais, para a secreção de muco quanto as glândulas (revisto em Jackson, 2001). Essa resposta secretória aumentada está relacionada a efeitos de mediadores inflamatórios e citocinas produzidas nas vias aéreas, principalmente IL-13, além de efeitos de mecanismos neuronais, especialmente os ligados à via colinérgica (revisto em Rogers, 2004). Neste estudo, pudemos verificar que os animais NFAT1-/- desafiados com OVA apresentam menor marcação para muco nas células caliciformes do epitélio das vias aéreas quando comparados aos animais NFAT1+/+ (**Figura 17**). Mesmo apresentando níveis similares de produção de IL-13 no pulmão, os animais NFAT1-/- apresentam uma secreção de muco diminuída, ao contrário do que ocorre nos animais NFAT1+/+. A

via colinérgica é o principal mecanismo neural responsável pelo controle da secreção de muco das vias aéreas. Agonistas de receptores colinérgicos induzem a secreção de mucinas pelas células caliciformes em modelos de asma em roedores e cobaias. Nessas espécies, onde o componente glandular na submucosa é relativamente pequeno, a regulação neuronal da secreção de muco pelas células caliciformes é extremamente importante (revisto em Jackson, 2001). Uma vez que o NFAT é ativado pela via dos receptores muscarínicos, os principais receptores da via colinérgica no pulmão, a ausência desse fator de transcrição poderia comprometer a indução da secreção de muco por essa via.

Os animais NFAT1^{-/-} quando comparados com seus controles selvagens apresentam hipereosinofilia, altos níveis de IgE no soro, fenótipo Th2 predominante, presença de IL-13 e altos níveis de eotaxina no pulmão, intenso infiltrado inflamatório e maior deposição de fibras colágenas no pulmão. Todos esses fatores caracterizariam os animais NFAT1^{-/-} como potenciais asmáticos exacerbados em relação aos animais NFAT1^{+/+}, uma vez que essas características estão presentes na patologia asmática como discutido nos parágrafos anteriores. A hiper-reatividade brônquica é um fenômeno marcante da asma que é determinado e influenciado por todos esses fatores. Conseqüentemente, as características apresentadas pelos animais NFAT1^{-/-} contribuiriam para que esses animais apresentassem maiores níveis de hiper-reatividade brônquica em relação aos controles selvagens. Apesar disso, quando os animais NFAT1^{-/-} desafiados com OVA são aerolizados com metacolina como broncoconstrictor, esses animais além de não serem hiper-reativos quando comparados com os controles desafiados com PBS, têm broncoconstrição diminuída em relação aos animais NFAT1^{+/+}, desafiados ou não com OVA (**Figura 18**).

O hidróxido de alumínio é, de fato, o adjuvante mais comumente utilizado na literatura para sensibilização de animais nos modelos experimentais de asma. Por causa disso decidimos reproduzir esses resultados utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante na sensibilização. Esses experimentos corroboraram os dados da hiper-reatividade observados nos animais NFAT1^{-/-} sensibilizados com

CFA, demonstrando que independente do adjuvante utilizado no processo de sensibilização os animais NFAT1^{-/-} realmente apresentam um defeito na broncoconstrição induzida por metacolina (**Figura 20**).

Nestes ensaios também verificamos que os animais NFAT1^{-/-} apresentam níveis de eosinofilia similares aos apresentados pelos animais NFAT1^{+/+}, ao contrário do que ocorre quando os animais são sensibilizados utilizando o CFA como adjuvante (**Figura 19**). Como descrito anteriormente, a eosinofilia pulmonar característica da asma está fortemente associada ao desenvolvimento de um fenótipo Th2 pelos linfócitos T CD4⁺ (revisto em Wills-Karp, 1999). Estudos anteriores demonstraram que enquanto o hidróxido de alumínio estimula a diferenciação de linfócitos CD4⁺ para o fenótipo Th2, o CFA faz o oposto, promovendo a diferenciação Th1 (Grun & Maurer, 1989). Posteriormente esses resultados foram confirmados por Chuang e colaboradores (1997) que demonstraram um aumento da relação IFN- γ /IL-4 produzida por esplenócitos de animais sensibilizados com CFA. Como mencionado anteriormente, os animais NFAT1^{-/-} têm uma produção de IL-4 aumentada concomitante com uma produção de IFN- γ diminuída de maneira independente dos efeitos mediados pela IL-4. De fato, durante um estímulo primário os linfócitos T CD4⁺ de animais NFAT1^{-/-} “naive” produzem níveis de IL-4 bastante similares aos produzidos pelas mesmas células NFAT1^{+/+}, que tornam-se aumentados em 72 h de estimulação (dados não mostrados). Por outro lado, ao passo que os linfócitos T CD4⁺ NFAT1^{+/+} já produzem IFN- γ em momentos iniciais da cultura, essa produção não é acompanhada por linfócitos T CD4⁺ NFAT1^{-/-}, mesmo em momentos tardios de estimulação primária (dados não mostrados). Essa diferença inicial de produção de IFN- γ é refletida no padrão de diferenciação dessas células, como demonstrado na **Figura 12**. Uma vez que o CFA induz a produção de IFN- γ e que os animais NFAT1^{-/-} têm um defeito nessa produção, o equilíbrio Th1/Th2 desses animais é afetado. Ou seja, a ausência da produção de IFN- γ faz com que não ocorra o contrabalanço ou “freio” natural da produção de IL-4, fazendo com que os animais NFAT1^{-/-} desenvolvam um fenótipo Th2 aumentado em relação aos animais NFAT1^{+/+}. Como o hidróxido de alumínio favorece a produção de IL-4 e ambos

animais são capazes de produzir essa citocina, o IFN- γ por não ser preferencialmente induzido nesse tipo de sensibilização, não teria um papel tão ativo no contrabalanço ou “freio” da diferenciação Th2. Ou seja, os níveis basais de IFN- γ produzidos tanto pelos animais NFAT1+/+ quanto NFAT1-/- não seriam suficientes para afetar a produção de IL-4 e acentuar a diferença de produção dessa citocina entre as duas linhagens de animais. É claro que para confirmarmos essa hipótese, o padrão de produção de citocinas dos linfócitos de animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- sensibilizados na presença de hidróxido de alumínio ainda precisa ser analisado. Com esses dados poderemos verificar se os animais NFAT1+/+ e NFAT1-/- de fato apresentam níveis similares de produção de IL-4 quando sensibilizados com hidróxido de alumínio, o que poderia explicar a similaridade no influxo de eosinófilos apresentado por esses animais.

Os ensaios anteriores com animais sensibilizados sugerem que os animais NFAT1-/- têm um defeito na broncoconstrição induzida por metacolina de maneira independente do processo de sensibilização. Para confirmar essa hipótese, animais “naive” NFAT1+/+ e NFAT1-/-, os quais não foram submetidos a qualquer protocolo de sensibilização ou desafio, foram aerolizados com metacolina. Corroborando os dados anteriores, os animais NFAT1-/- “naive” também apresentam broncoconstrição diminuída em relação aos animais selvagens (**Figura 21**), sugerindo que este é um fenômeno intrínseco causado pela ausência do NFAT1 e não por quaisquer efeitos do processo de sensibilização ou desafio. O tratamento com CsA, um inibidor da ativação do NFAT, confirmou o envolvimento do NFAT1 no processo de broncoconstrição uma vez que os animais NFAT1+/+ tratados com CsA apresentaram níveis de broncoconstrição diminuídos, similares aos apresentados pelos animais NFAT1-/- (**Figura 22**).

Como descrito anteriormente, a liberação de acetilcolina (ACh) pelos nervos parassimpáticos é responsável pelo principal mecanismo neural de broncoconstrição das vias aéreas. Os receptores muscarínicos do subtipo M₁ e M₃, ao se ligarem a ACh, geram um influxo de cálcio intracelular ao ativarem a cascata de sinalização da PLC (revisto em Felder, 1995). Experimentos anteriores demonstraram que células T Jurkat que expressam ectopicamente o receptor M₁

(J-HM1-2.2) quando ativadas com carbachol, um agonista de receptores muscarínicos, produzem IL-2 e induzem a atividade do NFAT (Desai *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995). Posteriormente foram feitos experimentos similares tanto com linhagens de células linfóides (Jurkat) quanto com linhagens de células não-linfóides (feocromocitoma PC12) (Boss *et al.*, 1996). Ambas linhagens foram transfectadas com vetor de expressão para o receptor M₃ e vetor que continha seqüências consenso de ligação para NFAT conjugadas a um gene repórter, a luciferase. O tratamento com carbachol induz expressão de luciferase pelas células transfectadas demonstrando que a ativação do receptor M₃ leva à indução da ativação do NFAT (Boss *et al.*, 1996). Isso ocorre de maneira específica para o receptor M₃, uma vez que células PC12 transfectadas com um vetor de expressão para o receptor M₂, quando tratadas com carbachol, não apresentam indução do gene da luciferase (Boss *et al.*, 1996). Além disso, o tratamento com CsA inibe a expressão de luciferase induzida por carbachol nas células PC12 que expressam o receptor M₃, demonstrando que de fato o NFAT é ativado por esses receptores em células não-imunes (Boss *et al.*, 1996).

Os receptores muscarínicos do subtipo M₃ estão presentes na musculatura lisa do pulmão e são os principais mediadores da broncoconstrição (revisto em Coulson & Fryer, 2003). Camundongos deficientes para esse receptor têm broncoconstrição induzida por metacolina completamente abolida (Fisher *et al.* 2004). Outros experimentos mostram uma inibição de 60% da broncoconstrição induzida por metacolina em camundongos geneticamente deficientes para M₃ (Struckmann *et al.*, 2003). Até o momento, não há qualquer registro na literatura que indique especificamente quais membros da família NFAT estão expressos na musculatura lisa do pulmão. No entanto, ensaios com uma linhagem de células de musculatura lisa das vias aéreas de humanos (HASM) demonstraram que essas células não só expressam NFAT, mas apresentam atividade funcional desses fatores de transcrição (Ediger *et al.*, 2003). Quando essas células HASM são transduzidas com vetor retroviral contendo regiões consenso de ligação para NFAT fusionadas a luciferase e são posteriormente estimuladas, ocorre expressão do gene repórter (Ediger *et al.*, 2003). Além disso, já foi demonstrado que os

membros da família NFAT são expressos principalmente na musculatura lisa vascular de diversos tecidos, incluindo cérebro e coração (Boss *et al.*, 1998; revisto em Hill-Eubanks *et al.*, 2003). Em uma linhagem de células de musculatura lisa vascular aórtica, a estimulação com diversos agonistas de receptores acoplados a proteínas G da família G_q foi capaz de ativar o NFAT (Boss *et al.*, 1998).

Todas essas informações juntas sugerem um papel importante do NFAT na musculatura lisa e na sinalização via receptores muscarínicos acoplados a proteína G da família G_q . A fim de comprovar a especificidade da resposta broncoconstritora à metacolina observada nos animais NFAT1^{-/-}, utilizamos outro broncoconstritor, a serotonina. Como demonstrado na **Figura 23**, os animais “naive” NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} apresentam respostas broncoconstritoras similares quando expostos à serotonina, ao contrário do que ocorre durante a exposição à metacolina. Já os animais NFAT1^{-/-} submetidos ao modelo de asma e desafiados com OVA além de apresentarem hiper-reatividade em relação aos controles desafiados com PBS, têm resposta broncoconstritora exacerbada em relação aos animais NFAT1^{+/+} (**Figura 23**). Por causa da grande diversidade de receptores para serotonina há bastante controvérsia sobre qual receptor é capaz de induzir broncoconstrição em diferentes espécies. Acredita-se que a ativação do receptor 5HT_{2A} presente na musculatura lisa das vias aéreas seja a principal via de broncoconstrição induzida por serotonina em ratos, mas não há qualquer estudo que demonstre os mesmos dados para camundongos (Saxena, 1995). A via de sinalização do receptor 5HT_{2A} também envolve influxo de Ca^{+2} através da ativação da PLC, mas até o momento não há qualquer evidência de que o NFAT seja ativado por esse receptor (Raymond *et al.*, 2001). Além disso, a natureza do estímulo indutor do influxo de Ca^{+2} também é importante para a ativação de diferencial de alguns fatores de transcrição, como o NFAT (Dolmetsch *et al.*, 1997).

A ausência dos receptores muscarínicos do subtipo M₃ no pulmão dos animais NFAT1^{-/-} poderia explicar o defeito na broncoconstrição apresentado por esses animais. De fato, o promotor do gene que codifica para o receptor M₃ de

humanos possui diversos sítios de ligação para NFAT (Forsythe *et al.* 2002). Apesar disso a análise da expressão desses receptores no pulmão de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} revelou que todos os três subtipos de receptores muscarínicos têm mRNAs igualmente expressos (**Figura 24**). Esses resultados sugerem que o NFAT1 está atuando abaixo da via dos receptores muscarínicos do subtipo M₃ e não como regulador direto de sua expressão. Para confirmar essa hipótese ainda precisam ser feitos experimentos que confirmem a expressão protéica desses receptores, assim como sua funcionalidade.

Os resultados anteriores, em conjunto, mostram que o NFAT1 é essencial para a broncoconstrição induzida especificamente pela via colinérgica. O processo de contração da musculatura lisa é extremamente complexo e pode ser regulado por uma variedade de fatores. O exato papel do NFAT1 nesse processo ainda permanece obscuro. Sabe-se que o NFAT2 é importante para a transcrição do gene que codifica para a cadeia pesada da miosina específica de músculo liso em células da musculatura lisa aórtica, o que poderia influenciar na contração muscular (Wada *et al.*, 2002). Além disso, a modulação da homeostase do Ca⁺² também é extremamente importante para a resposta da musculatura lisa a estímulos contráteis (Amrani & Panettieri, 2002). Análises de sítios putativos de ligação NFAT/AP1 em células T identificaram sítios de ligação para NFAT nas regiões promotoras de genes que codificam para proteínas que se ligam à Ca⁺², incluindo a calmodulina 2 (Kel *et al.*, 1999). Para dar continuidade ao trabalho, pretendemos investigar mais detalhadamente a via do receptor muscarínico M₃, a fim de fundamentar uma hipótese mais completa de como ocorre exatamente a participação do NFAT1 no processo de broncoconstrição.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o NFAT1 tem papel extremamente importante na resposta alérgica, sendo fundamental na broncoconstrição induzida pela via colinérgica.

- Os animais NFAT1^{-/-} quando comparados com seus controles selvagens apresentam hipereosinofilia, altos níveis de IgE no soro, fenótipo Th2 predominante, presença de IL-13 e altos níveis de eotaxina no pulmão, intenso infiltrado inflamatório e maior deposição de fibras colágenas no pulmão, sugerindo um papel regulador negativo da proteína NFAT1 na resposta alérgica asmática;
- Os animais NFAT1^{-/-}, quando expostos a metacolina, não apresentam hiper-reatividade em relação a seus respectivos controles, além de apresentarem broncoconstrição diminuída quando comparados com os animais NFAT1^{+/+}, sugerindo um papel essencial para o NFAT1 no processo de broncoconstrição induzido pela via colinérgica;
- Quando expostos a serotonina, os animais NFAT1^{-/-} são hiper-reativos em relação a seus respectivos controles e apresentam resposta broncoconstritora aumentada quando comparados aos animais NFAT1^{+/+}. Além disso, animais NFAT1^{-/-} “naive” apresentam broncoconstrição similar aos controles selvagens, excluindo um papel do NFAT1 no processo de broncoconstrição mediado pela serotonina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., MURPHY, K.M., SHER, A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787-793.

ALAM, R., YORK, J., BOYARS, M., STAFFORD, S., GRANT, J.A., LEE, J., FORSYTHE, P., SIM, T., IDA, N. 1996. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* **153**:1398-1404.

AMRANI, Y. & PANETTIERI, R.A. 2002. Modulation of calcium homeostasis as a mechanism for altering smooth muscle responsiveness in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **2**:39-45.

AYALA, L.E. & AHMED, T. 1989. Is there loss of a protective muscarinic receptor in asthma? *Chest* **96**:1285–1291.

AZZAWI, M., BRADLEY, B., JEFFERY, P.K., FREW, A.J., WARDLAW, A.J., KNOWLES, G., ASSOUI, B., COLLINS, J.V., DURHAM, S., KAY, A.B. 1990. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis.* **142**:1407-1413.

BARNES, P.J. 1993. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci.* **52**:521-527.

BARNES, P.J. 2001. Histamin and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther.* **14**:329-339.

BARNES, P.J. 2004. Distributon of receptor targets in the lung. *Proc Am Thor Soc.* **1**:345-351.

BEASLEY, R. [For the The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee] 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. **351**: 1225-1232.

BENNICH, H.H., ISHIZAKA, K., JOHANSSON, S.G.O., ROWE D.S., STANWORTH, D.R., TERRY, W.D. 1968. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull World Hlth Org*. **38**:151-152.

BOSS, V., TALPADE, D.J., MURPHY, T.J. 1996. Induction of NFAT-mediated transcription by G_q-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J Biol Chem*. **271**:10429-10432.

BOSS, V., ABBOTT, K.L., WANG, X.F., PAVLATH, G.K., MURPHY, T.J. 1998. The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. *J Biol Chem*. **273**:19664-19671.

BRUSSELLE, G.G., KIPS, J.C., TAVERNIER, J.H., VAN DER HEYDEN, J.G., CUVELIER, C.A., PAUWELS, R.A., BLUETHMANN, H. 1994. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy*. **24**:73-80.

BREWSTER, C.E., HOWARTH, P.H., DJUKANOVIC, R., WILSON, J., HOLGATE, S.T., ROCHE, W.R. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **3**:507-511.

CAETANO, M.S., VIEIRA-DE-ABREU, A., TEIXEIRA, L.K., WERNECK, M.B., BARCINSKI, M.A., VIOLA, J.P. 2002. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J*. **16**:1940-1942.

CASTRO, H.J., MALKA-RAIS, J., BELLANTI, J.A. 2005. Current epidemiology of asthma: emerging patterns of asthma. *Allergy Asthma Proc.* **26**:79-82.

CAULFIELD, M.P. & BIRDSALL, N.J.M. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* **50**:279–290.

COFFMAN, R.L., SEYMOUR, B.W.P., LEBMAN, D.A., HIRAKI, D.D., CHRISTIANSEN, J.A., SHRADER, B., CHERWINSKI, H.M., SAVELKOUL, H.F.J., FINKELMAN, F.D., BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* **102**:5-28.

CHETTA, A., FORESI, A., DEL DONNO, M., BERTORELLI, G., PESCI, A., OLIVIERI, D. 1997. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest.* **111**:852-857.

CHUANG, Y.H., CHIANG, B.L., CHOU, C.C., HSIEH, K.H. 1997. Immune effector cells induced by complete Freund's adjuvant exert an inhibitory effect on antigen-specific type 2 T helper responses. *Clin Exp Allergy.* **27**:315-324.

COHN, L., HOMER, R.J., MARINOV, A., RANKIN, J., BOTTOMLY, K. 1997. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med.* **186**:1737-1747.

COHN, L., ELIAS, J.A., CHUPP, G.L. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* **22**: 789-815.

COOKSON, W. 2004. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol.* **4**: 978-988.

CORRIGAN, C.J. & KAY, A.B. 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today.* **13**:501-507.

COULSON, F.R. & FRYER, A.D. 2003. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther.* **98**:59-69.

DAS, J., CHEN, C.H., YANG, L., COHN, L., RAY, P., RAY, A. 2001. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and Th2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol.* **2**:45-50.

DE BIE J.J., HENRICKS, P.A.J., CRUIKSHANK W.W., HOFMAN, G., JONKER, E.H., NIJKAMP, F.P., VAN OOSTERHOUT A.J.M. 1998. Modulation of airway hyperresponsiveness and eosinophilia by selective histamine and 5-HT receptor antagonists in a mouse model of allergic asthma. *Br J Pharmacol.* **124**:857-864.

DE VRIES, J.E. 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol.* **102**:165-169.

DESAI, D.M., NEWTON, M.E., KADLECEK, T., WEISS, A. 1990. Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T-cell activation. *Science.* **348**:66-69.

DIEHL, S., KRAHL, T., RINALDI, L., NORTON, R., IRVIN, C.G., RINCON, M. 2004. Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J Immunol.* **172**:3597-3603.

DOLMETSCH, R.E., LEWIS, R.S., GOODNOW, C.C., HEALY, J.I. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* **386**:855-858.

DUPONT, L.J., PYPE, J.L., DEMEDTS, M.G., DE LEYN, P., DENEFFE, G., VERLEDEN, G.M. 1999. The effects of 5-HT on cholinergic contraction in human airways *in vitro*. *Eur Respir J.* **14**:642-649.

EDIGER, T.L., SCHULTE, N.A., MURPHY, T.J., TOEWS, M.L. 2003. Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* **21**:759-769.

ELIAS, J.A. ZHU, Z., CHUPP, G., HOMER, R.J. 1999. Airway remodeling in asthma. *J Clin Investig.* **104**:1001-1006.

ERB, K.J., KIRMAN, J., DELAHUNT, B., MOLL, H., LE GROS, G. 1999. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon- γ signaling. *Eur Cytokine Netw.* **10**:147-154.

FELDER, C. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple receptors. *FASEB J.* **9**:619-625.

FERNANDES, L. B., A. D. FRYER, C. A. HIRSHMAN. 1992. M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* **262**:119-126.

FINOTTO, S., DE SANCTIS, G.T., LEHR, H.A., HERZ, U., BUERKE, M., SCHIPP, M., BARTSCH, B., ATREYA, R., SCHMITT, E., GALLE, P.R., RENZ, H., NEURATH, M.F. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med.* **193**:1247-1260.

FINOTTO, S., NEURATH, M.F., GLICKMAN, J.N., QIN, S., LEHR, H.A., GREEN, F.H.Y., ACKERMAN, K., HALEY, K., GALLE, P.R., SZABO, S.J., DRAZEN, J.M., DE SANCTIS, G.T., GLIMCHER, L.H. 2002. Development of spontaneous airway

changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. **295**:336-338.

FISHER, J.T., VINCENT, S.G., GOMEZA, J., YAMADA, M., WESS, J. 2004. Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M₂ or M₃ muscarinic acetylcholine receptors. *FASEB J*. **18**:711-713.

FORSYTHE, S.M., KOGUT, P.C., MCCONVILLE, J.F., FU, Y., MCCAULEY, J.A., HALAYKO, A.J., LIU, H.W., KAO, A., FERNANDES, D.J., BELLAM, S., FUCHS, E., SINHA, S., BELL, G.I., CAMORETTI-MERCADO, B., SOLWAY, J. 2002. Structure and transcription of the human m3 muscarinic receptor gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **26**:298-305.

FOSTER, P.S., HOGAN, S.P., RAMSAY, A.J., MATTHAEI, K.I., YOUNG, I.G. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. **183**:195-201.

FRYER, A.D. & WILLS-KARP, M. 1991. Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J Appl Physiol*. **71**:2255 – 2261.

FRYER, A.D. & JACOBY, D.B. 1998. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*. **158**:S154-S160.

FUJISAWA, T., KATO, Y., NAGASE, H., ATSUTA, J., TERADA, A., IGUCHI, K., KAMIYA, H., MORITA, Y., KITaura, M., KAWASAKI, H., YOSHIE, O., HIRAI, K. 2000. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol*. **106**:507-513.

GANGUR, V. & OPPENHEIM, J.J. 2000. Are chemokines essential or secondary participants in allergic responses? *Ann Allergy Asthma Immunol*. **84**:569–581.

GARLISI, C.G., FALCONE, A., KUNG, T.T., STELTS, D., PENNLIN, K.J., BEAVIS, A.J., SMITH, S.R., EGAN, R.W., UMLAND, S.P. 1995. T cells are necessary for Th2 cytokine production and eosinophil accumulation in airways of antigen-challenged allergic mice. *Clin Immunol Immunopathol.* **75**:75-83.

GAVETT, S.H., O'HEARN, D.J., KARP, C.L., PATEL, E.A., SCHOFIELD, B.H., FINKELMAN, F.D., WILLS-KARP, M. 1997. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol.* **272**:L253-261.

GONZALO, J.A., LLOYD, C.M., WEN, D., ALBAR, J.P., WELLS, T.N., PROUDFOOT, A., MARTINEZ-A, C., DORF, M., BJERKE, T., COYLE, A.J., GUTIERREZ-RAMOS J. C. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* **188**:157-167.

GOULD, H.J., SUTTON, B.J., BEAVIL, A.J., BEAVIL, R.L., MCCLOSKEY, N., COKER, H.A., FEAR, D., SMURTHWAITE, L. 2003. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol.* **21**:579-628.

GRUN, J.L., MAURER, P.H. 1989. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol.* **121**:134-145.

GRÜNIG, G., WARNOCK, M., WAKIL, A.E., VENKAYYA, R., BROMBACHER, F., RENNICK, D.M., SHEPPARD, D., MOHRS, M., DONALDSON, D.D., LOCKSLEY, R.M., CORRY, D.B. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* **282**:2261-2263.

HAMELMANN, E., SCHWARZE, J., TAKEDA, K., OSHIBA, A., LARSEN, G.L., IRVIN, C.G., GELFAND, E.W. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* **156**:766-775.

HILL-EUBANKS, D.C., GOMEZ, M.F., STEVENSON, A.S., NELSON, M.T. 2003. NFAT regulation in smooth muscle. *Trends Cardiovasc Med.* **13**:56-62.

HODGE, R.M., RANGER, A.M., DE LA BROUSSE, F.C., HOEY, T., GRUSBY, M., GLIMCHER, L. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-Atp-deficient mice. *Immunity.* **4**:397-405.

HOFFJAN, S. & OBBER, C. 2002. Present status of the genetic studies of asthma. *Curr Opi Immunol.* **14**:709–717.

ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. 1967a. Identification of gamma-E antibodies as a carrier or reaginic activity. *J Immunol.* **99**:1187-1198.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T., TERRY, W.D. 1967b. Antigenic structure of gamma-E-globulin and reaginic antibody. *J Immunol.* **99**:849-858.

JACKSON, A.D. 2001. Airway goblet-cell mucus secretion. *Trends Pharmacol Sci.* **22**:39-45

JACOBY, D.B., GLEICH, G.J., FRYER, A.D. 1993. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest.* **91**:1314-1318.

JEFFERY, P.K., WARDLAW A.J., NELSON F.C., COLLINS J.V., KAY, A.B. 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* **140**:1745-1753.

JOHANSSON, S.G.O. 2002. Milestones in understanding allergy and its diagnosis. *Clin Exp All Rev.* **2**:2-7.

KEL, A., KEL-MARGOULIS, O., BABENKO, V., WINGENDER, E. 1999. Recognition of NFATp/AP-1 Composite Elements within Genes Induced upon the Activation of Immune Cells. *J Mol Biol.* **288**:353-376.

KIANI, A., VIOLA, J.P.B., LICHTMAN, A.H., RAO, A. 1997. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity.* **7**:849-860.

KIANI, A., GARCÍA-CÓZAR, F.J., HABERMANN, I., LAFORSCH, S., AEBISCHER, T., EHNINGER, G., RAO, A. 2001. Regulation of interferon- γ gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood.* **98**:1480-1488.

KITA, H., OHNISHI, T., OKUBO, Y., WEILER, D., ABRAMS, J.S., GLEICH, G.J. 1991. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med.* **174**:745-748.

LAMKHIOUED, B., RENZI, P.M., ABI-YOUNES, S., GARCIA-ZEPADA, E.A., ALLAKHVERDI, Z., GHAFFAR, O., ROTHENBERG, M.D., LUSTER, A.D., HAMID, Q. 1997. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol.* **159**:4593-4601.

LANGE, P., PARNER, J., VESTBO, J., SCHNOHR, P., AND JENSEN, G. 1998. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med.* **339**:1194–1200.

LECHIN, F., VAN DER DIJS, B., OROZCO, B., LECHIN, M., LECHIN, A.E. 1996. Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **77**:245-253.

LECHIN, F., VAN DER DIJS, B., OROZCO, B., JARA, H., RADA, I., LECHIN, M.E., LECHIN, A.E. 1998. The serotonin uptake-enhancing drug tianeptine suppresses asthmatic symptoms in children: a double-blind, crossover, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol.* **38**:918–925.

LEE, J.J., DIMINA, D., MACIAS, M.P., OCHKUR, S.I., MCGARRY, M.P., O'NEILL, K.R., PROTHEROE, C., PERO, R., NGUYEN, T., CORMIER, S.A., LENKIEWICZ, E., COLBERT, D., RINALDI, L., ACKERMAN, S.J., IRVIN, C.G., LEE, N.A. 2004. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science.* **305**:1773-1776.

LOPEZ-RODRIGUEZ, C., ARAMBURU, J., RAKEMAN, A.S., RAO, A. 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:7214-7219.

LUKACS, N.W., STRIETER, R.M., CHENSUE, S.W., KUNKEL, S.L. 1994. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**:526-532.

LUKACS, N.W. 2001. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* **1**:108-116.

MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* **5**:472-484.

MACLEAN, J.A., OWNBEY, R., LUSTER, A.D. 1996. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen-induced pulmonary eosinophilia. *J Exp Med.* **184**:1461-1469.

MADDOX, L., SCHWARTZ, D.A. 2002. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* **53**:477-498.

MALBON, C.C. 2005. G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**:689-701.

MASUDA, E.S., NAITO, Y., TOKUMITSU, H., CAMPBELL, D., SAITO, F., HANNUM, C., ARAI, K-I., ARAI, N. 1995. NFAT χ , a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol.* **15**:2697-2706.

MINETTE, P.J., LAMMERS, J.W.J., DIXON, C.M.S., MCCUSKER, M.T., BARNES, P.J. 1989. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not asthmatic subjects. *J Appl Physiol.* **67**:2461–2465.

MINSHALL, E.M., LEUNG, D.Y.M., MARTIN, R.J., SONG, Y.L., CAMERON, L., ERNST, P., HAMID, Q. 1997. Eosinophil-associated TGF β ₁ mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **17**:326-333.

MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., AND COFFMAN, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**:2348-2357.

MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**:145-173.

NAKAMURA, Y., GHAFFAR, O., OLIVENSTEIN, R., TAHA, R.A., SOUSSIGOUNNI, A., ZHANG, D.H., RAY, A., HAMID, Q. 1999a. Gene expression of the

GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **103**:215-222.

NAKAMURA, H., WEISS, S.T., ISRAEL, E., LUSTER, A.D., DRAZEN, J.M., LILLY, C.M. 1999b. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **160**:1952-1956.

PEASE, J.E. & WILLIAMS, T.J. 2001. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* **1**:248-253.

PENG, S.L., GERTH, A.J., RANGER, A.M., GLIMCHER, L.H. 2001. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity.* **14**:13-20.

POHUNEK, P., WARNER, J.O., TRZIKOVA, J., KURDMANN, J., ROCHE, W.R. 2005. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* **16**:43-51.

PRAUSNITZ, C. & KÜSTNER, H. 1921. Studien über die Überempfindlichkeit. *Zentralbl Bakteriol I. Abt Orig* **86**:160-169. Originally published, in English, in PRAUSNITZ, C. In: GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A., editors. *Clinical aspects of immunology.* Oxford: Blackwell; 1962. p. 128.

PRESCOTT, S.L., MACAUBAS, C., HOLT, B.J., SMALLACOMBE, T.B., LOH, R., SLY, P.D., HOLT, P.G. 1998a. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol.* **60**:4730-4737.

PRESCOTT, S.L., MACAUBAS, C., SMALLACOMBE, T., HOLT, B.J., SLY, P.D., LOH, R., HOLT, P.G. 1998b. Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy.* **28**:39-44.

PRIESCHL, E.E., GOUILLEUX-GRUART, V., WALKER, C., HARRER, N.E., BAUMRUKER, T. 1995. A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J Immunol.* **154**:6112-6119.

RANGANATH, S., OUYANG, W., BHATTARCHARYA, D., SHA, W.C., GRUPE, A., PELTZ, G., MURPHY, K.M. 1998. GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J Immunol.* **161**:3822-3826.

RANGER, A.M., OUKKA, M., RENGARAJAN, J., GLIMCHER, L.H. 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity.* **9**:627-635.

RAO, A., LUO, C., HOGAN, P.G. 1997 Transcription Factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol.* **15**:707-747.

RAYMOND, J.R., MUKHIN, Y.V., GELASCO, A., TURNER, J., COLLINSWORTH, G., GETTYS, T.W., GREWAL, J.S., GARNOVSKAYA, M.N. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* **92**:179-212.

RENAULD, J-C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* **54**:577-589.

ROCHE, W.R., BEASLEY, R., WILLIAMS, J.H., HOLGATE, S.T. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* **1**:520-524.

ROGERS, D.F. 2004. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol.* **4**:241-250.

ROTHENBERG, M.E., MACLEAN, J.A., PEARLMAN, E., LUSTER, A.D., LEDER, P. 1997. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med.* **185**:785-790.

SAXENA, P.R. 1995. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol Ther.* **66**:339-368.

SEDER, R.A. & PAUL, W.E. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol.* **12**:635-673.

SEMINARIO, M.C., GUO, J., BOCHNER, B.S., BECK, L.A., GEORAS, S.N. 2001. Human eosinophils constitutively express nuclear factor of activated T cells p and c. *J Allergy Clin Immunol.* **107**:143-152.

SIM, T.C., GRANT, J.A., HILSMIEIER, K.A., FUKUDA, Y., ALAM, R. 1994. Proinflammatory cytokines in nasal secretions of allergic subjects after antigen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* **149**:339-344.

SHI, H.Z., HUMBLE, A., GERARD, C., JIN, Z., WELLER, P.F. 2000. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest.* **105**:945-953.

STELLATO, C., MATSUKURA, S., FAL, A., WHITE, J., BECK, L.A., PROUD, D., SCHLEIMER, R.P. 1999. Differential regulation of epithelial-derived C-C chemokine expression by IL-4 and the glucocorticoid budesonide. *J Immunol.* **163**:5624-5632.

STRACHAN, D.P. 1989. Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J.* **299**:1259-1260.

STRUCKMANN, N., SCHWERING, S., WIEGAND, S., GSCHNELL, A., YAMADA, M., KUMMER, W., WESS, J., HABERBERGER, R.V. 2003. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol.* **64**:1444-1451.

SZABO, S.J.; KIM, S.T.; COSTA, G.L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C.G.; GLIMCHER, L.H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* **100**:655-669.

TEMANN, U.A., PRASAD, B., GALLUP, M.W., BASBAUM, C., HO, S.B., FLAVELL, R.A., RANKIN, J.A. 1997. A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **16**:471-478.

TERAN, L.M., MOCHIZUKI, M., BARTELS, J., VALENCIA, E.L., NAKAJIMA, T., HIRAI, K., SCHRODER, J.M. 1999. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **20**:777-786.

VAN OOSTERHOUT, A.J.M., HOFMAN, G., WOUTERSEN-VAN NIJNANTEN F.M.A., NIJKAMP, F.P. 1991. 5-HT₁-like receptors mediate potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction of isolated mouse trachea. *Eur J Pharmacol.* **209**:237-244.

VIOLA, J.P.B., KIANI, A., BOZZA, P.T., RAO, A. 1998. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood.* **91**:2223-2230.

VON PIRQUET, C. 1906. Allergie. *Munchen Med Wchnschr.* **53**:1457. Originally published, in English, in VON PIRQUET, C. In: GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A., editors. *Essentials of clinical immunology*. Oxford: Blackwell; 1963. p. 805.

WADA, H., HASEGAWA, K., MORIMOTO, T., KAKITA, T., YANAZUME, T., ABE, M., SASAYAMA, S. 2002. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription. *J Cell Biol.* **156**:983-991.

WALKER, C., KAEGI, M.K., BRAUN, P., BLASER, K. 1991. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* **88**:935-942.

WANG, D.Z., MCCAFFREY, P.G., RAO, A. 1995. The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* **766**:182-194.

WESS, J. 2004. Muscarinic Acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **44**:423-450.

WHICKER, S.D., ARMOUR, C.L., BLACK, J.L. 1988. Responsiveness of bronchial smooth muscle from asthmatic patients to relaxant and contractile agonists. *Pulm Pharmacol.* **1**:25-31.

WILLS-KARP, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* **17**:255-281.

WILLS-KARP, M., SANTELIZ, J., KARP, C.L. 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* **1**:69-75.

WILLS-KARP, M. & EWART, S.L. 2004. Time to draw breath: asthma susceptibility genes are identified. *Nat Rev Gen.* **5**:376-387.

WOODRUFF, P.G., KHASHAYAR, R., LAZARUS, S.C., JANSON, S., AVILA, P., BOUSHEY, H.A., SEGAL, M., FAHY, J.V. 2001. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **108**:753-758.

WU, J., KATZAV, S., WEISS, A. 1995. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95^{vaV} activity. *Mol Cell Biol.* **15**:4337-4346.

WYNN, T.A. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* **21**:425-456.

XANTHOUDAKIS, S., VIOLA, J.P.B., SHAW, K.T.Y., LUO, C., WALLACE, J.D., BOZZA, P.T., CURRAN, T., RAO, A. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science.* **272**:892-895.

ZHANG, D.H., YANG, L., COHN, L., PARKYN, L., HOMER, R., RAY, P., RAY, A. 1999. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity.* **11**:473-482.

ZHENG, W., FLAVELL, R.A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* **89**:587-596.

ZHU, Z., HOMER, R.J., WANG, Z., CHEN, Q., GEBA, G.P., WANG, J., ZHANG, Y., ELIAS, J.A. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* **103**:779-788.

ZIMMERMANN, N., HERSHEY, G.K., FOSTER, P.S., ROTHENBERG, M.E. 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* **111**:227-242.

7. ANEXOS

7.1 Anexo I

TEIXEIRA, L.K., **FONSECA, B.P.F.**, VIEIRA DE ABREU, A., BARBOZA, B.A., ROBBS, B.K., BOZZA, P.T., VIOLA, J.P.B. IFN- γ production by CD8 T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol.* 175:5931-5939. 2005.

IFN- γ Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation¹

Leonardo K. Teixeira,* Bruna P. F. Fonseca,* Adriana Vieira-de-Abreu,[†] Bianca A. Barboza,* Bruno K. Robbs,* Patrícia T. Bozza,[†] and João P. B. Viola^{2*}

CD8⁺ T lymphocytes are excellent sources of IFN- γ ; however, the molecular mechanisms that dictate IFN- γ expression upon TCR stimulation in these cells are not completely understood. In this study, we evaluated the involvement of NFAT1 in the regulation of IFN- γ gene expression in murine CD8⁺ T cells and its relevance during Th differentiation. We show that CD8⁺, but not CD4⁺, T cells, represent the very first source of IFN- γ upon primary T cell activation, and also that the IFN- γ produced by naive CD8⁺ T cells may enhance CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro*. TCR stimulation rapidly induced IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes in a cyclosporin A-sensitive manner. Evaluation of CD8⁺ T cells showed that calcium influx alone was sufficient to activate NFAT1 protein, transactivate IFN- γ gene promoter, and induce IFN- γ production. In fact, NFAT1-deficient mice demonstrated highly impaired IFN- γ production by naive CD8⁺ T lymphocytes, which were totally rescued after retroviral transduction with NFAT1-encoding vectors. Moreover, NFAT1-dependent IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment was crucial to control a Th2-related response *in vivo*, such as allergic inflammation. Consistently, CD8 α - as well as IFN- γ -deficient mice did not mount a Th1 immune response and also developed *in vivo* allergic inflammation. Our results clearly indicate that IFN- γ production by CD8⁺ T cells is dependent of NFAT1 transcription factor and may be an essential regulator of Th immune responses *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 5931–5939.

Upon T cell stimulation, CD4⁺ T lymphocytes may undergo a Th1/Th2 differentiation that is mostly characterized by the distinct pattern of cytokines they secrete. Th1 cells produce IFN- γ , which is essential for the eradication of intracellular pathogens, whereas Th2 cells secrete IL-4, IL-5, and IL-13, which are crucial to the elimination of extracellular organisms and to sustain allergic reactions. Several factors can influence the differentiation pathway of CD4⁺ Th cells, especially the cytokines prevailing within the microenvironment where these cells encounter Ags (1, 2). IL-12 and IFN- γ are known to be the major Th1-inducing cytokines (3). IFN- γ is a pleiotropic cytokine that is essential for both innate and adaptive immunities (4), and its role in CD4⁺ Th1 differentiation has been intensely addressed. *In vitro* studies have shown that IFN- γ exerts both indirect and direct effects during Th1 development (5, 6). It induces APCs to produce IL-12, which is of great importance during Th1 cell commitment (7, 8). In addition, IFN- γ is responsible for inducing/maintaining the expression of the β -chain of the IL-12R (IL-12R β 2) on CD4⁺ T cells, indicating an important role for IFN- γ in the Th1 effects mediated by IL-12 (9, 10). Furthermore, IFN- γ and Th1 responses are considered to be protective against Th2-related disorders such

as asthma and allergy (11–13). In animal models, the adoptive transfer of IFN- γ -producing cells into allergen-sensitized recipients has protected from airway eosinophilia after Ag challenge (14, 15). Defective IFN- γ production also predisposes toward the development of allergic diseases, and patients with severe asthma present significantly reduced IFN- γ production in response to allergen compared with control individuals (16, 17).

Different transcription factors have been shown to regulate IFN- γ gene expression in T lymphocytes (3, 18). In CD4⁺ T cells, T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ production in developing Th1 lymphocytes (19). However, T-bet expression is induced by IFN- γ signaling pathway through STAT1, and thus is dependent on an initial source of IFN- γ (10, 20). Several cellular compartments of the immune system have been characterized as potential sources of IFN- γ *in vivo*, including NK cells and CD8⁺ T cells (21, 22). It has been suggested that CD8⁺ T cells may represent an early source of IFN- γ , which acts directly on CD4⁺ Th1 differentiation (22). Nevertheless, there are no available data concerning the involvement of TCR-induced transcription factors in the regulation of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells.

NFAT proteins are pre-existing cytoplasmic transcription factors that are rapidly activated in T lymphocytes upon TCR stimulation (23). The activation of NFAT proteins requires sustained intracellular calcium levels that are induced shortly after TCR triggering (23, 24). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which dephosphorylates NFAT (25, 26). Once activated, NFAT translocates to the nucleus, where it binds to regulatory sequences and regulates the expression of several cytokine genes, including IFN- γ (27, 28). The process of NFAT activation is blocked by immunosuppressive drugs, such as cyclosporin A (CsA)³ and FK506, which inhibit the phosphatase activity of calcineurin (29, 30). In fact, NFAT1-deficient mice

*Division of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil; and [†]Laboratory of Immunopharmacology, Department of Physiology and Pharmacodynamics, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Received for publication February 4, 2005. Accepted for publication August 24, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino, Furnas Centrais Elétricas S.A. and Conselho Nacional de Pesquisas (to J.P.B.V.); and Howard Hughes Medical Institute and Conselho Nacional de Pesquisas (to P.T.B.). L.K.T. and B.A.B. were supported by an Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino fellowship; B.P.F.F., A.V.-A. and B.K.R. were supported by a Conselho Nacional de Pesquisas fellowship.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. João P. B. Viola, Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro, Brasil 20231-050. E-mail address: jpviola@inca.gov.br

³ Abbreviations used in this paper: CsA, cyclosporin A; EGFP, enhanced GFP; Eomes, eomesodermin; IRES, internal ribosomal entry sequence.

(NFAT1^{-/-}) present a preferential differentiation toward a Th2 phenotype, including low levels of IFN- γ and high levels of IL-4 (31, 32). Consistently, CD4⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice present an impaired IFN- γ production (33), but no reports regarding the participation of NFAT1 in the regulation of IFN- γ in CD8⁺ T lymphocytes have been described.

Thus, we addressed the involvement of NFAT1 transcription factor in the regulation of IFN- γ production in CD8⁺ T cells and its influence on Th1/Th2 immune responses using *in vitro* and *in vivo* models of Th differentiation. In this study we show that naive CD8⁺ T cells do produce high levels of IFN- γ upon TCR triggering during the primary response, which is dependent on NFAT1 transcription factor. Also, we demonstrate that IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment enhances CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro* and is crucial to control allergic inflammation, which has been related to a Th1/Th2 immune response deregulation. Our results thus suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role in IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which may modulate Th immune response *in vivo*.

Materials and Methods

Animals, cells, and reagents

C57BL/6, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{-/-}, and IFN- γ ^{-/-} 8- to 12-wk-old female mice were used in all experiments. Animals were bred and maintained in the Brazilian National Cancer Institute animal facility. Animals were treated according to the animal care guidelines of the Council for International Organizations of Medical Sciences. All primary cells (lymph nodes, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes) and the mouse CD8⁺ CTLL-R8⁺ cell line were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine, streptomycin-penicillin, essential and nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, and 2-ME (all from Invitrogen Life Technologies). Hybridomas 2C11 (anti-CD3) and 53-6.7 (anti-CD8) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. All Abs were purified from hybridoma supernatants by chromatography over protein G (Amersham Biosciences), and their activities were functionally tested by cellular proliferation, complement-dependent depletion, and ELISA. The cytokines IFN- γ , IL-2, IL-12, and IL-18 were purchased from PepruTech. The polyclonal Ab 67.1 (Dr. A. Rao, Harvard University, Boston, MA) was used to detect the NFAT1 protein. PMA and ionomycin were obtained from Calbiochem, and the immunosuppressive drug CsA was obtained from LC Laboratories. CFA and OVA were purchased from Sigma-Aldrich. The solutions of May-Grünwald and Giemsa were obtained from Merck. Polybrene (hexadimethrin bromide) was obtained from Fluka Chemie, and chondroitin 6-sulfate sodium salt was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell isolation and flow cytometry

In all experiments, different cell populations (CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells) were obtained from lymph nodes (inguinal, brachial, axillary, and superficial cervical). Purified single-cell suspensions were isolated by negative selection with magnetic beads (Micro Beads, MACS technology) according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Streptavidin magnetic beads were conjugated to specific-biotinylated Abs (anti-CD4, anti-CD8, and anti-B220/CD45R) to sort out undesired cell populations. For cytometric analysis, cells were stained with specific fluorochrome-labeled Abs as previously described (32). Labeled mAbs were all obtained from BD Pharmingen, and cells were analyzed by flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences). Cell populations were isolated to >95% purity.

CD4⁺ Th differentiation

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were purified from C57BL/6 (IFN- γ ^{+/+}) or IFN- γ ^{-/-} as described. For cocultivation assays, CD4⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} mice were cultured together with CD8⁺ T cells from either IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice (CD4:CD8 ratio, 2:1) and primarily stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were harvested, washed, and rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were isolated again as described and were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cell-free supernatants were assessed for IFN- γ or IL-4 by ELISA.

ELISA and intracellular cytokine staining

Cells were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 24, 48, or 72 h at 37°C with different stimuli as indicated. Cell-free supernatant was as-

essed for IFN- γ and IL-4 protein levels by ELISA according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen). For intracellular cytokine staining, indicated cell populations (1 \times 10⁶ cells) from naive C57BL/6, NFAT1^{+/+}, and NFAT1^{-/-} mice were stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Brefeldin A (1/1000; Cytofix/Cytoperm; BD Pharmingen) was added to the culture 5 h before the staining procedure. Briefly, cells were harvested, and surface markers were stained with anti-CD8-FITC or anti-CD4-FITC Ab. Cells were next fixed and permeabilized for intracellular cytokine staining with anti-IFN- γ -PE Ab, then analyzed by flow cytometry.

RNase protection assays, Western blot, and immunofluorescence staining

For RNase protection assay analysis, purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁶ cells) from C57BL/6 mice were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 6 h at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before anti-CD3 stimulation. Total RNA was immediately extracted with TRIzol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen Life Technologies). mRNA expression was analyzed with a multiprobe RNase protection assay kit (Ribo-Quant; BD Pharmingen). For IFN- γ expression analysis, mCK-1 and mCK-2 multiprobe sets were used, and RNA loading was estimated by measuring GAPDH and L32 housekeeping genes.

To detect the presence of the NFAT1 protein, purified CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice or the CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 15 min at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before stimulation. Total protein lysates were obtained as previously described (26). Briefly, cells were lysed in buffer containing 40 mM Tris (pH 7.5), 60 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, and 5% SDS, followed by incubation at 100°C for 20 min. Small-scale nuclear extracts were made as previously described (34). Briefly, cells were resuspended in buffer containing 0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 2 mM leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF. The supernatant was removed to a separate tube, and the nuclear pellet was lysed in the same buffer as described above. Cell extracts were analyzed by electrophoresis on 6% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane, and NFAT1 protein was detected by the polyclonal Ab 67.1 as previously described (26).

Intracellular localization of NFAT1 protein was addressed in purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁵ cells) from C57BL/6 mice by immunofluorescence staining, also as previously described (26). Briefly, cells were attached to coverslips previously coated for 1 h with 2% gelatin and were left unstimulated or were stimulated for 16 h at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before ionomycin. Then cells were fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Nonidet P-40, and stained with anti-NFAT1 67.1 Ab. The cells were photographed under \times 100 magnification with a Zeiss Axiovert S100 microscope.

Retroviral construction and lymphocyte transduction

The pLIREs-EGFP bicistronic vector was constructed by inserting a 1.4-kb *BgIII-NoI* fragment from the pIRES2-EGFP vector (BD Clontech), comprising the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sequence (IRES) and the enhanced GFP (EGFP) coding region, into the pLEGFP-N1 retroviral vector (BD Clontech; pLIREs-EGFP-empty). To generate the retroviral vector encoding for NFAT1, the full-length cDNA from NFAT1 isoform C was cloned into the pLIREs-EGFP (pLIREs-EGFP-NFAT1). Then, the BD Eco-Pack2 ecotropic packing cell line (BD Biosciences) was transiently transfected with retroviral vectors by calcium phosphate precipitation for 16 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection, and concentrated as previously described (35). The supernatant was supplemented with IL-2 (20 U/ml), and immediately used for spin infection (twice, 45 min each time, 1800 rpm, room temperature) of purified CD8⁺ T cells from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice previously stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for 24 h. Infected cells were incubated at 37°C for an additional 48 h, supplemented with fresh medium, and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for another 48 h. Cells were then stained for intracellular cytokine as described above, and EGFP⁺ CD8⁺ lymphocytes were analyzed by flow cytometry for IFN- γ production as described.

Transactivation assays

CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) was electroporated (950 μ F, 250 V) in a 0.4-cm GenePulser Cuvette (Bio-Rad) with 5 μ g of the indicated IFN- γ -promoter constructs fused to a luciferase reporter gene (Luc; donated by Dr. C. Wilson, University of Washington, Seattle, WA) (28) in serum-free

medium. After 24 h, cells were washed and left unstimulated or were stimulated in vitro for 16 h at 37°C with PMA (10 nM) or ionomycin (5 μ M) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before any other treatment when indicated. The next day, cells were harvested, and lysis was performed for 20 min at room temperature with 50 μ l of 1 \times cell culture lysis reagent (Promega). Crude extract (10 μ l) was added to 100 μ l of luciferase assay substrate (Promega). Luciferase activity was promptly measured in a Monolight 3010 Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) and was expressed as relative light units.

Eomesodermin (Eomes) RT-PCR

Purified CD8⁺ T cells (2×10^6 cells) from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice were left unstimulated (0 h) or were in vitro stimulated for the indicated time periods at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), and semiquantitative RT-PCR for murine Eomes expression was performed using the Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). The primers used were as follows: Eomes, 5'-GCC CAC GTC TAC CTG TGC AAC CG-3' and 5'-TGT TAT TGG TGA GTT TTA ACT TCC C-3' (334-bp product); and GAPDH, 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' and 5'-ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA-3' (276-bp product). PCR conditions were as follows: 95°C for 3 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s; and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Pleurisy model

Naive animals were s.c. sensitized with 200 μ g (0.1 ml) of OVA emulsified in CFA in a hind footpad, as previously described (36). Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, thoracic cavity was rinsed with 1 ml of PBS/0.1% BSA. Cells were then cytocentrifuged and stained with May-Grünwald/Giemsa for differential leukocyte analysis. Draining lymph nodes (popliteal and inguinal) were harvested, and cells (2×10^6 cells) were stimulated in vitro for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were then assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. For in vivo CD8⁺ T cell depletion, NFAT1^{+/+} mice were i.v. treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days in a total of five injections before sensitization (NFAT1^{+/+} and anti-CD8). Thereafter, mice continued to be treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days until challenge. CD8⁺ T cell depletion was evaluated by flow cytometry of lymph nodes, which always showed <3% CD8⁺ T cells.

Statistical analysis

Statistical analysis of values from wild type (+/+) and knockout (-/-) mice and between control and treated groups was performed using unpaired Student's *t* test for single comparison. A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Influence of IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation

The cytokine IL-12 was initially characterized as the dominant cytokine influencing the Th1 phenotype (3, 7, 8). However, additional studies have shown that other cytokines, such as IFN- γ , may also play a role during Th1 development (5, 6). In an in vitro model of Th differentiation, disruption of IFN- γ R signaling pathway drastically reduced IFN- γ production by CD4⁺ T cells even when stimulated in the presence of IL-12, indicating that IFN- γ directly enhances CD4⁺ Th1 differentiation (data not shown). Several cellular sources of IFN- γ may enhance CD4⁺ Th1 differentiation, such as NK, dendritic cells and CD8⁺ T cells (3, 21, 22). As shown in Fig. 1A, upon TCR stimulation of primary lymph node cells, CD8⁺ T lymphocytes represent the very first source of IFN- γ production. To specifically address the influence of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation, naive CD4⁺ T lymphocytes cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3. After this primary stimulation, CD4⁺ T lymphocytes were purified, stimulated in vitro, and assessed for their ability to produce IFN- γ and IL-4. We observed in this study that

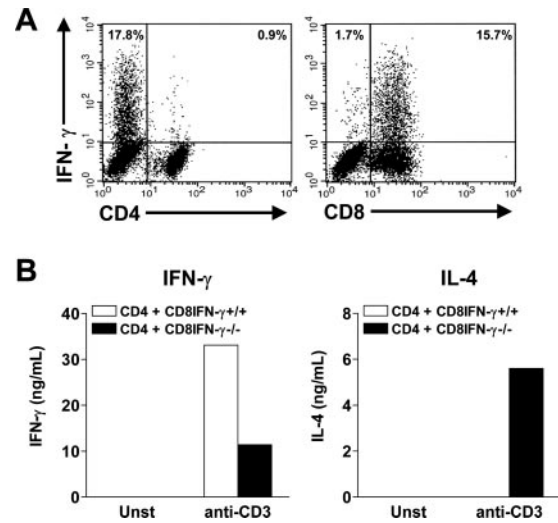


FIGURE 1. IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes enhances CD4⁺ Th1 differentiation. *A*, Total lymph node cells from naive C57BL/6 mice were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. Data are representative of three independent animals. *B*, Purified CD4⁺ T lymphocytes from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice, and then stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were purified again and were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. All results are from a pool of three mice and are representative of two independent experiments.

CD4⁺ T cells, which were cocultivated with IFN- γ -competent CD8⁺ T cells, clearly produce more IFN- γ and less IL-4 than those cocultivated with IFN- γ -deficient CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 1B). Thus, our results demonstrate that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells enhances Th1 phenotype development of CD4⁺ T lymphocytes during primary stimulation in vitro.

IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes

The molecular mechanisms that control IFN- γ gene expression in CD4⁺ Th cells are widely known; however, the mechanisms that dictate its expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. Thus, we decided to address the molecular pathways by which CD8⁺ T cells produce IFN- γ . We show in this study that purified naive CD8⁺ T cells produce IFN- γ upon TCR stimulation, but not in response to IL-12/IL-18 treatment alone (Fig. 2A). We also observed that the IFN- γ production level was not altered when anti-CD28 costimulation was administered together with anti-CD3 (data not shown). However, IL-12/IL-18 administration highly increased IFN- γ levels when associated with TCR triggering, suggesting that both cytokines may play a secondary role on TCR-induced IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2B). To evaluate the influence of other pathways in IFN- γ production, we stimulated naive CD8⁺ T cells with different stimuli. Surprisingly, ionomycin-driven Ca²⁺ influx was sufficient to induce IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which was slightly potentiated by PMA administration (Fig. 2C). However, PMA stimulation alone was not sufficient to induce IFN- γ production in these cells (Fig. 2C). In addition, we found that IFN- γ expression is totally dependent on TCR stimulation, because IFN- γ transcript levels could be detected as early as 6 h after TCR triggering, but not in unstimulated CD8⁺ T cells (Fig. 2D). In this study, we also show that IFN- γ expression/production by CD8⁺ T lymphocytes is totally inhibited when CsA is administered together

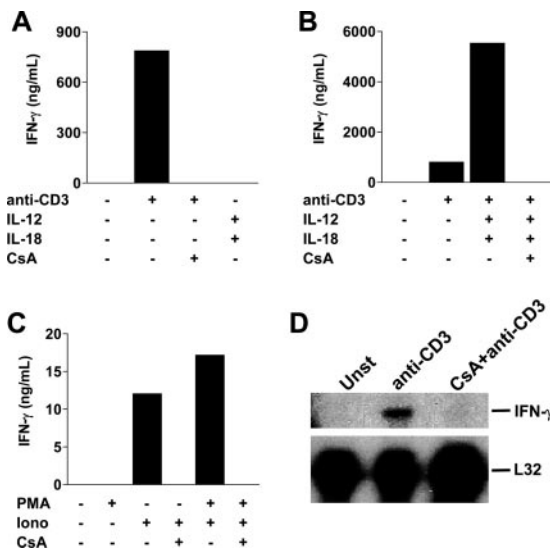


FIGURE 2. TCR triggering induces IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes in a CsA-sensitive manner. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated or stimulated in vitro as indicated: anti-CD3 (1 μ g/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml), PMA (10 nM), ionomycin (Iono; 5 μ M), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. *A–C*, Analysis of IFN- γ production by CD8⁺ T cells after 72 h of stimulation as indicated. Cell-free supernatant was assessed for IFN- γ by ELISA. *D*, Analysis of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells by RNase protection assay after 6 h of stimulation. RNA loading was estimated by measuring the intensity of L32 housekeeping ribosomal protein gene. All results are from a pool of three mice and are representative of three independent experiments.

with any other stimulus (Fig. 2). These results clearly demonstrate that CD8⁺ T lymphocytes are competent for IFN- γ production upon TCR engagement, and IFN- γ expression was totally inhibited by CsA at the transcriptional level.

CD8⁺ T lymphocytes present functional NFAT1 protein

The activation of NFAT transcription factors requires sustained intracellular Ca²⁺ levels induced by TCR engagement (23). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which is blocked by the immunosuppressive drug CsA (23). Taking into account that IFN- γ expression is Ca²⁺ dependent and blocked in a CsA-sensitive manner, we decided to investigate whether CD8⁺ T lymphocytes presented NFAT transcription factor. We demonstrate for the first time, to our knowledge, that naive CD8⁺ T cells do present inactive endogenous NFAT1 transcription factor (phosphorylated form), which is activated by ionomycin-induced Ca²⁺ influx (dephosphorylated form), and blocked by CsA (Fig. 3). In fact, ionomycin treatment not only led to NFAT1 dephosphorylation, but also resulted in NFAT1 nuclear translocation, which was again blocked by CsA as observed by Western blot of nuclear lysate and immunofluorescence staining of CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3).

Effect of NFAT transcription factor on IFN- γ promoter

We then examined the ability of NFAT transcription factor to regulate the IFN- γ promoter in a CD8⁺ T cell line. The CTLL-R8⁺ cell line presents endogenous NFAT1 whose activation is induced by ionomycin and blocked by CsA (Fig. 4A). Moreover, the CTLL-R8⁺ cell line did not produce IFN- γ when maintained in culture without stimulation, but ionomycin treatment was sufficient to induce its production, as assessed by ELISA (data not shown). We then transiently transfected these cells with different IFN- γ promoter constructs containing NFAT-binding sites and driving

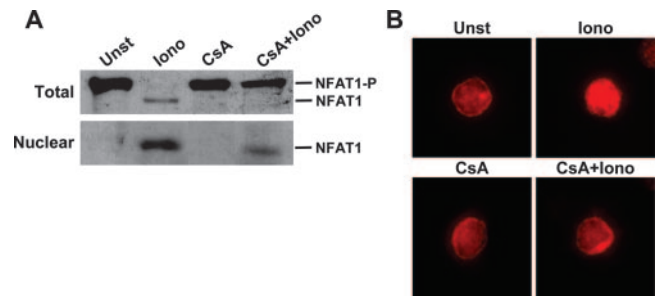


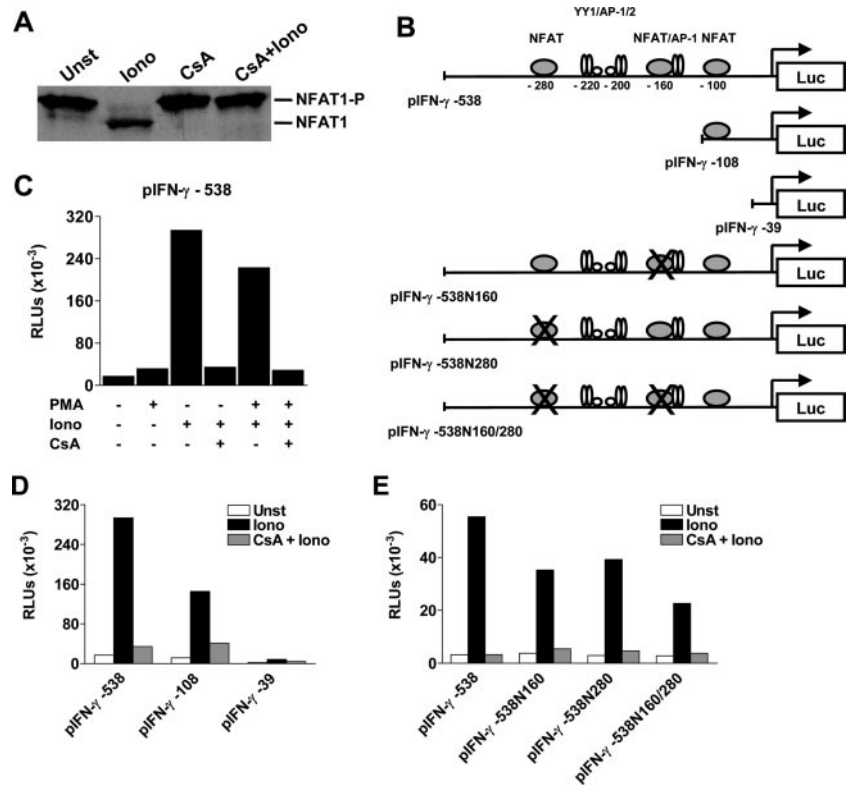
FIGURE 3. NFAT1 is dephosphorylated and translocated to the nucleus in CD8⁺ T lymphocytes after Ca²⁺ influx. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M) or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before ionomycin. *A*, Detection of NFAT1 transcription factor in CD8⁺ T cells in total lysates (Total; upper panel) or nuclear lysates (Nuclear; lower panel) by Western blot analysis after 15 min of stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. *B*, Cellular localization of NFAT1 protein in CD8⁺ T cells by immunofluorescence staining after 15 min of stimulation. All results are representative of at least two independent experiments.

the luciferase reporter gene (Fig. 4B). Three NFAT-binding sites were approximately identified at positions -100, -160, and -280 bp through the proximal 538 bp of the IFN- γ promoter (pIFN- γ -538; Fig. 4B) (28). Interestingly, ionomycin stimulation was sufficient to highly transactivate the IFN- γ proximal promoter construct pIFN- γ -538 (Fig. 4C). In accordance with primary CD8⁺ T cells results, PMA administration alone did not induce luciferase activity or enhance reporter expression when associated with ionomycin, indicating that ionomycin-driven Ca²⁺ influx alone was sufficient to induce optimal response (Fig. 4C). The partial promoter construct pIFN- γ -108, which contained a single NFAT-binding site, still showed 50% luciferase activity compared with the full-length promoter construct (Fig. 4D). Again, IFN- γ promoter activity remained sensitive to CsA (Fig. 4, C and D). However, promoter construct pIFN- γ -39 showed no luciferase expression at all (Fig. 4D). To evaluate the direct role of NFAT on IFN- γ promoter transactivation, we analyzed the effects of point mutations in different NFAT binding sites (Fig. 4B) (28). As shown in Fig. 4E, point mutations at the NFAT -160 site (N160), -280 site (N280), or both sites (N160/N280) decreased luciferase activity compared with the wild-type pIFN-538 construct. Point mutation at both sites (N160/N280) decreased luciferase expression by an average of 50% compared with the pIFN-538 construct, which is similar to the reduction observed in the pIFN- γ -108 construct (Fig. 4, D and E). It is still important to note in this study the presence of a third intact NFAT binding site at position -100, which could explain at least some of the luciferase activity observed in the double mutant (N160/N280) and pIFN-108 constructs (Fig. 4, D and E). This site might play an important unrecognized role in IFN- γ promoter regulation in CD8⁺ T cells. Moreover, luciferase expression always remained sensitive to CsA in all constructs (Fig. 4, D and E). Based on these results, we conclude that NFAT transcription factor plays a positive role in regulation of the IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell compartment.

Involvement of NFAT1 in IFN- γ production by CD8⁺ T cells

To unequivocally test the hypothesis that NFAT1 is required for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes, we evaluated intracellular IFN- γ production by these cells in NFAT1-deficient mice (NFAT1^{-/-}). Strikingly, upon stimulation of purified naive CD3⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} mice, CD8⁺, but not CD4⁺, T

FIGURE 4. NFAT is able to transactivate IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell line. CTLL-R8⁺ cells were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M), PMA (10 nM), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. **A**, Detection of NFAT1 transcription factor in CTLL-R8⁺ cells by Western blot analysis 15 min after stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. **B**, Schematic view of the plasmid constructs used in the transactivation assay. Different IFN- γ -promoter constructs containing NFAT-binding sites were used: pIFN- γ -538 (proximal 538 bp of IFN- γ promoter), pIFN- γ -108, pIFN- γ -39, pIFN- γ -538N160 (point mutation in the NFAT -160 site), pIFN- γ -538N280 (point mutation in the NFAT1 -280 site), and pIFN- γ -538N160/N280 (double mutation). Element binding sites for the transcription factors NFAT, AP-1, AP-2, and YY-1 are indicated. **C–E**, CTLL-R8⁺ cells were transfected with the indicated IFN- γ -promoter constructs and left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro for 16 h as indicated. Then luciferase activity (Luc) was measured, and gene reporter activity was expressed as relative light units (RLUs). All results are representative of at least two independent experiments.



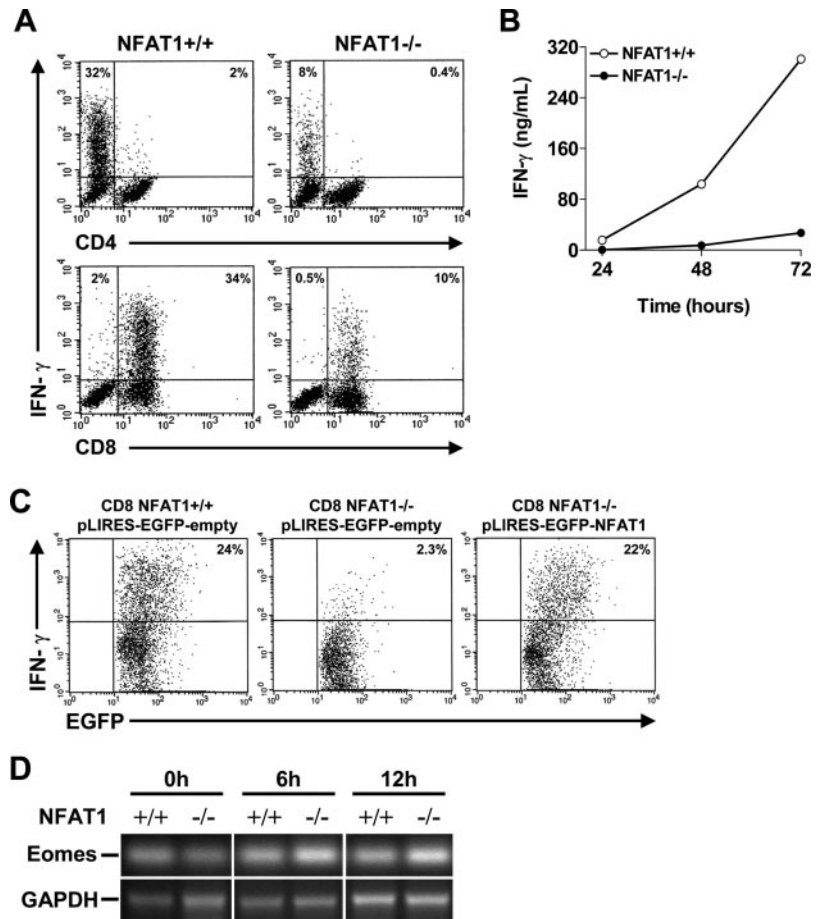
cells represented the main source of IFN- γ during the primary response (Fig. 5A). Furthermore, NFAT1^{-/-} mice showed a 3-fold decrease in the frequency of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells compared with NFAT1^{+/+} mice after 72 h of in vitro stimulation (Fig. 5A). Also, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells showed a drastic impairment of IFN- γ production compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells, as assessed by ELISA (Fig. 5B). To investigate the essential role of NFAT1 transcription factor during IFN- γ expression in CD8⁺ T cells, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes were retrovirally transduced with an NFAT1-encoding vector. As shown in Fig. 5C, CD8⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice infected with pLIREs-EGFP-empty construct showed drastically decreased IFN- γ -producing cells compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells infected with the same construct. However, the frequency of IFN- γ -producing cells was rescued in NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells retrovirally transduced with NFAT1-encoding vector (pLIREs-EGFP-NFAT1) to the same levels as the NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells (Fig. 5C). Although these results clearly demonstrate that IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes is extremely dependent on NFAT1, we also decided to investigate the expression levels of the transcription factor Eomes, which has been shown to be responsible for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes (37). As shown in Fig. 5D, no differences were observed on Eomes gene expression levels in CD8⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} compared with NFAT1^{-/-} mice. Thus, our results clearly demonstrate that the IFN- γ produced by T lymphocytes upon TCR stimulation primarily originates from CD8⁺ T cells and depends mostly on NFAT1 transcription factor.

In vivo consequences of NFAT1-dependent IFN- γ production

To further characterize the relevance of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells during in vivo Th immune responses, we took advantage of a well-defined pleurisy model. Allergic diseases are usually characterized by eosinophil tissue infiltration, increase in the level of serum IgE, and a Th2 pattern of cytokine production,

including IL-4, IL-5, and IL-13, which is totally dependent on CD4⁺ T lymphocytes (38). It has been clearly shown that Th1 cytokines, such as IFN- γ and IL-12, may suppress and counteract the Th2 response of some allergic diseases (11, 12). Thus, we asked whether NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could modulate the Th1/Th2 immune response and control allergic inflammation in vivo. We performed a pleurisy model of allergic inflammation to evaluate the influence of IFN- γ on eosinophil infiltration and cytokine production profile. As previously demonstrated, we show in this study that NFAT1^{-/-} mice present more eosinophils in the pleural cavity than wild-type mice after Ag challenge (Fig. 6) (36, 39). Reinforcing our proposal, in vivo depletion of CD8⁺ T cells from wild-type mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) led to eosinophilia in the pleural cavity similar to levels in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 6). Consistently, CD8 α ^{-/-} and IFN- γ ^{-/-} mice also presented more pleural eosinophils compared with respective wild-type mice (Fig. 6). To better understand the immune response generated in vivo in this model, we analyzed the cytokine production profile after restimulation ex vivo. As shown in Fig. 7, NFAT1^{-/-} mice presented an enhanced Th2 phenotype, including higher levels of IL-4 production and lower levels of IFN- γ compared with wild-type mice. Surprisingly, CD8⁺ T cell-depleted NFAT1^{+/+} mice, which presented eosinophilia similar to NFAT1^{-/-} mice, did not show high levels of IL-4 production (Fig. 7). However, IFN- γ production was strikingly decreased to levels similar to those in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7). Consistently, the frequency of IFN- γ -competent CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell-depleted mice was also decreased to the level in NFAT1^{-/-} mice as analyzed by intracellular cytokine staining (data not shown). Interestingly, CD8 α ^{-/-} mice also presented a highly decreased IFN- γ response compared with respective wild-type mice, but showed a mild increase in IL-4, which was observed in IFN- γ ^{-/-} mice (Fig. 7). These results suggest that NFAT1 transcription factor-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells plays a crucial role in eosinophil migration in this model of allergic inflammation

FIGURE 5. NFAT1 is crucial for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes. *A*, CD3⁺ T lymphocytes were purified from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice as described and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. *B–D*, CD8⁺ T lymphocytes were purified as described from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). *B*, Cell-free supernatants of stimulated cells were assessed for IFN- γ by ELISA at the indicated time points. *C*, Cells were transduced with either pLIRESEGFP-empty or -NFAT1 vector after 24 h of stimulation. Then, EGFP⁺ cells were analyzed by flow cytometry for intracellular IFN- γ production at 96 h as described. *D*, Eomes gene expression was analyzed by semiquantitative RT-PCR at the indicated time points. RNA loading was estimated by measuring the intensity of the GAPDH housekeeping gene. All results are from a pool of three mice and are representative of at least two independent experiments.



and may be important to control Th immune responses and allergic diseases in vivo.

Discussion

In this study, we have demonstrated that IFN- γ production by CD8⁺ T cells during the primary response is dependent on NFAT1 transcription factor. Little is known about the molecular mechanisms that regulate IFN- γ production in CD8⁺ T cells. T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ expression in CD4⁺ T cells (19). Nonetheless, it is noteworthy that T-bet expression is induced through the IFN- γ signaling pathway, and thus its effects are dependent on an initial source of this cytokine (10, 20). Pearce et al. (37) have shown that the transcription factor Eomes, a T-bet paralog, controls effector functions of CD8⁺ T cells, including IFN- γ

production. However, this transcription factor is highly induced in activated CD8⁺ T lymphocytes, but moderately detectable in naive CD8⁺ T cells (37). Also, the regulatory mechanisms that dictate Eomes gene expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. In fact, Eomes expression was induced in CD8⁺ T cells early after TCR triggering (Fig. 5D), but this does not seem to explain the striking differences observed in IFN- γ production by NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes.

By contrast, the NFAT family of transcription factors is largely known to be activated soon after TCR stimulation. Within minutes after Ca²⁺ influx, NFAT translocates to the nucleus and binds to regulatory sequences of the IFN- γ promoter region, regulating its expression (23, 27, 28). In this study we have shown that ionomycin-induced calcium influx was sufficient for IFN- γ production

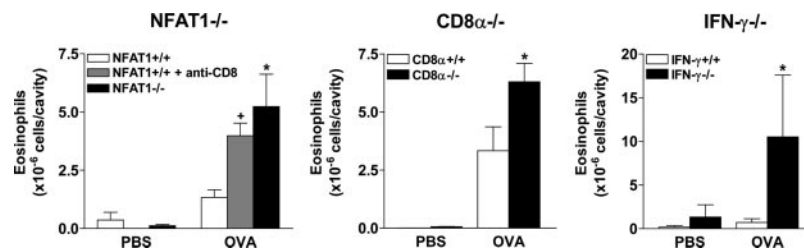
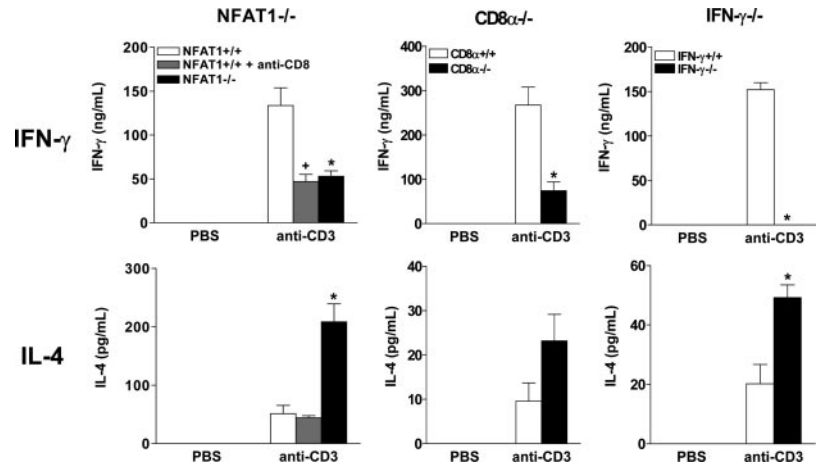


FIGURE 6. NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes controls eosinophilia in vivo. Naive animals (NFAT1^{+/+}, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{+/+}, CD8 α ^{-/-}, IFN- γ ^{+/+}, and IFN- γ ^{-/-}) or CD8⁺ T cell-depleted mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) were s.c. sensitized with OVA (200 μ g) emulsified in CFA in a hind footpad as described. Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, the thoracic cavity was assessed for differential leukocyte analysis. The total number of pleural eosinophils is shown in control (PBS) and treated (OVA) groups. Data are expressed as the mean \pm SEM of values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).

FIGURE 7. IFN- γ production by CD8⁺ T cells regulates the cytokine profile in vivo. Naive animals were treated as described in Fig. 6. One day after challenge, the draining lymph nodes (popliteal and inguinal) of the indicated animals were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Then cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SEM values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).



in naive CD8⁺ T lymphocytes. In fact, the three NFAT-binding sites identified in the proximal regulatory region of the IFN- γ promoter are required for maximum inducibility of this gene in Jurkat T cells and primary murine splenocytes (27, 28). Consistently, CD4⁺ T lymphocytes lacking NFAT1 display a substantial defect in IFN- γ gene expression, independent of the down-regulatory effects of IL-4 and GATA-3 (33). It has also been proposed that NFAT transcription factors may act as candidates to drive early transcription of cytokine genes in T cells, because they can recruit histone acetyltransferases and thus initiate localized histone modification in the IFN- γ promoter region (40–42). Thus, TCR-inducible transcription factors, such as NFAT1, may represent the very first switch on IFN- γ production in CD8⁺ T cells.

The local cytokine microenvironment is fundamental to define the Th1/Th2 balance that CD4⁺ T cells may undergo during Ag recognition (1, 2). The cytokine IFN- γ induces IL-12 production by APCs and also up-regulates the expression of IL-12R β 2 on CD4⁺ T cells through the activation of T-bet (7–10). Both mechanisms are widely known to promote/enhance CD4⁺ Th1 differentiation (3). Myeloid cells, such as dendritic cells and macrophages, represent an early source of IFN- γ and IL-12 in the innate arm of the immune system (3, 4). In fact, CD8a⁺ dendritic cells are able to prime CD4⁺ T lymphocytes toward the Th1 phenotype (43, 44). Furthermore, it has been recently demonstrated that NK cells may also represent an initial source of IFN- γ during Th1 polarization of naive CD4⁺ T cells (21). Our data indicate that upon TCR stimulation of primary T cells, CD8⁺, but not CD4⁺, T lymphocytes, are excellent producers of IFN- γ , which is crucial to enhance CD4⁺ Th1 differentiation (Fig. 1). We thus suggest that CD8⁺ T cells also function as another source of IFN- γ that may reinforce and amplify an adaptive Th1-specific response. In accordance, it has been argued that the IFN- γ secreted by CD8⁺ T cells acts directly on CD4⁺ Th1 priming and also stimulates APCs to secrete IL-12 (22). In that work, in vivo injections of anti-CD3 in various MHC gene knockout mice have clearly demonstrated that IFN- γ is rapidly produced by a distinct population of CD8⁺ T cells and polarizes CD4⁺ T cells toward the Th1 phenotype (22). It has also been shown that the presence of IFN- γ during the early phase of CD4⁺ Th priming is essential for Th1 phenotype stabilization, because CD4⁺ T cells lacking the IFN- γ gene or its receptor do not mount an efficient Th1 response and retain the capacity to produce IL-4 (6). We thus suggest that CD8⁺ T lymphocytes represent an early source of NFAT1-dependent IFN- γ production during the initial adaptive response, which may account for the consolidation of Th1 immunity.

Altering the cytokine-producing profile of Th cells by inducing Th1 responses has been proposed to be protective against Th2-related dis-

orders, such as allergy (11–13). Our findings show that IFN- γ and also CD8⁺ T cells are regulators of eosinophil recruitment and Th immune responses in vivo. Because the IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes was highly dependent on NFAT1, we suggest that mice lacking this transcription factor could not counteract a Th2 response and presented overexpression of Th2 cytokines and eosinophilia in vivo. Thus, the impaired NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could be an alternative explanation for the allergic phenotype described in the NFAT1-deficient mice (36, 39). However, we cannot rule out the hypothesis that NFAT1^{-/-} mice present a Th2-biased phenotype in consequence of an intrinsic defect of CD4⁺ T cells to silence IL-4. This hypothesis could explain the low levels of IL-4 production observed in CD8⁺ T cell-depleted mice and the only moderate increase in CD8 α - and IFN- γ -deficient mice, rather than the profound increase in IL-4 levels observed in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7).

In vivo studies of airway allergic inflammation have demonstrated that IFN- γ , CD8⁺ T cells, and also CD4⁺ Th1 cells are able to regulate Ag-induced eosinophil infiltration by inhibiting Th2 responses (11–15). Interestingly, T-bet-deficient mice had impaired IFN- γ production and also developed spontaneous airway hyper-responsiveness similar to asthma patients, who revealed deficient T-bet expression of the lungs and significantly lower IFN- γ secretion by PBMC compared with healthy individuals (45, 46). In accordance, it has been recently shown in a model of *Leishmania major* infection that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells directly promotes Th1 differentiation and down-regulates initial Th2 immune responses (47). Although depletion of CD8⁺ T lymphocytes in NFAT1^{+/+} mice induced eosinophil infiltration in our model of allergic inflammation (Fig. 6), we cannot exclude the involvement of other cell types in this phenomenon. In addition to CD8⁺ T cells, in vivo treatment with anti-CD8 Ab could deplete CD8a⁺ dendritic cells, which have been implicated in Th1 differentiation as well (43, 44). Thus, it is still possible that the absence of both CD8⁺ T cells and CD8a⁺ dendritic cells might explain the enhanced allergic inflammation observed in CD8-depleted NFAT1^{+/+} mice. Nevertheless, conflicting results have been documented regarding the protective action of CD8⁺ T and CD4⁺ Th1 cells against allergic diseases (48–50).

The suppressive effects of IFN- γ on allergic inflammation may be explained by several mechanisms. It is most likely that IFN- γ directly induces the differentiation of naive T cells toward the Th1 phenotype and/or represses Th2 cell recruitment/differentiation rather than acting on eosinophils itself (4–6). It is also possible that IFN- γ suppresses the release of Th2 cytokines from activated T cells (51, 52) and thus inhibits the following Th2-dependent

eosinophil recruitment (11, 38). However, other reports have shown inhibitory properties of IFN- γ directly on eosinophil infiltration into inflammatory tissues (53, 54). Our results support the idea that NFAT1 plays a positive regulatory role in IFN- γ production by CD8⁺ T cells and may control allergic inflammation in vivo. In contrast, a recent report have shown that inhibition of all NFAT family members in T cells prevents allergic pulmonary inflammation, early eosinophil recruitment to the lungs, and Th2 response development (55). These results support the idea that different NFAT members may play specific roles during immune responses in vivo, because this family consists of five proteins with distinct properties in the regulation of cytokine genes.

In conclusion, we demonstrate in this study that IFN- γ production by naive CD8⁺ T cells during primary stimulation is highly dependent on NFAT1 transcription factor. We also indicate that CD8⁺ T cells and IFN- γ are essential to control allergic inflammation. Finally, we suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role on IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which is central to the generation of Th1 immune responses in vivo.

Acknowledgments

We are especially grateful to M. A. Barcinski and B. L. Diaz for comments on the work and manuscript, and to members of our laboratory for helpful advice and discussions. We are in debt to A. Rao, C. Wilson, and F. Cunha for kindly providing reagents, and to E. Abrantes for help with gene reporter experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635–673.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787–793.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 713–758.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749–758.
- Bradley, L. M., D. K. Dalton, and M. Croft. 1996. A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.* 157: 1350–1358.
- Zhang, Y., R. Apilado, J. Coleman, S. Ben-Sasson, S. Tsang, J. Hu-Li, W. E. Paul, and H. Huang. 2001. Interferon γ stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* 194: 165–172.
- Ma, X., J. M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S. F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183: 147–157.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W. E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188–10192.
- Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, et al. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907–1910.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 3: 549–557.
- Iwamoto, I., H. Nakajima, H. Endo, and S. Yoshida. 1993. Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 177: 573–576.
- Dow, S. W., J. Schwarze, T. D. Heath, T. A. Potter, and E. W. Gelfand. 1999. Systemic and local interferon γ gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum. Gene Ther.* 10: 1905–1914.
- Cohn, L., R. J. Homer, N. Niu, and K. Bottomly. 1999. T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J. Exp. Med.* 190: 1309–1318.
- Suzuki, M., R. Taha, D. Ihaku, Q. Hamid, and J. G. Martin. 1999. CD8⁺ T cells modulate late allergic airway responses in Brown Norway rats. *J. Immunol.* 163: 5574–5581.
- Suzuki, M., K. Maghni, S. Molet, A. Shimbara, Q. A. Hamid, and J. G. Martin. 2002. IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 803–809.
- Leonard, C., V. Tormey, C. Burke, and L. W. Poulter. 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 368–375.
- Renzi, P. M., J. P. Turgeon, J. E. Marcotte, S. P. Drblik, D. Bérubé, M. F. Gagnon, and S. Spier. 1999. Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1417–1422.
- Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, and T. L. Murphy. 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 451–494.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338–342.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, et al. 2001. T. bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15137–15142.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for Th1 priming. *Nat. Immunol.* 5: 1260–1265.
- Das, G., S. Sheridan, and C. A. Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. *J. Immunol.* 167: 2004–2010.
- Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 707–747.
- Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 497–521.
- Shaw, K. T. Y., A. M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao, and P. G. Hogan. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11205–11209.
- Loh, C., K. T. Y. Shaw, J. Carew, J. P. B. Viola, C. Luo, B. A. Perrino, and A. Rao. 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* 271: 10884–10891.
- Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, and H. A. Young. 1997. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 30412–30420.
- Sweetser, M. T., T. Hoey, Y. L. Sun, W. M. Weaver, G. A. Price, and C. B. Wilson. 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 34775–34783.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807–815.
- Clipstone, N. A., and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695–697.
- Hodge, M. R., A. M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4: 397–405.
- Kiani, A., J. P. B. Viola, A. H. Lichtman, and A. Rao. 1997. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7: 849–860.
- Kiani, A., F. J. Garcia-Cózar, I. Habermann, S. Laforsch, T. Aebischer, G. Ehninger, and A. Rao. 2001. Regulation of interferon- γ gene by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 98: 1480–1488.
- Jain, J., P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, and A. Rao. 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 365: 801–804.
- McMillin, D. W., N. Landazuri, B. Gangadharan, B. Hewes, D. R. Archer, H. T. Spencer, and J. M. Le Doux. 2005. Highly efficient transduction of repopulating bone marrow cells using rapidly concentrated polymer-complexed retrovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 768–775.
- Viola, J. P. B., A. Kiani, P. T. Bozza, and A. Rao. 1998. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 7: 2223–2230.
- Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, et al. 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor eomesodermin. *Science* 302: 1041–1043.
- Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 255–281.
- Xanthoudakis, S., J. P. B. Viola, K. T. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, D. C. Luk, T. Curran, and A. Rao. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272: 892–895.
- García-Rodríguez, C., and A. Rao. 1998. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.* 187: 2031–2036.
- Avots, A., M. Buttman, S. Chuvpilo, C. Escher, U. Smola, A. J. Bannister, U. R. Rapp, T. Kouzarides, and E. Serfling. 1999. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10: 515–524.
- Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T_H cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immunol.* 3: 643–651.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189: 587–592.
- Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser. 2001. Cytokines regulate the capacity of CD8 α^+ and CD8 α^- dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J. Immunol.* 167: 4345–4350.
- Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Y. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, et al. 2002. Development of

- spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336–338.
46. Nurse, B., M. Haus, A. S. Puterman, E. G. Weinberg, and P. C. Potter. 1997. Reduced interferon- γ but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 662–668.
 47. Uzonna, J. E., K. L. Joyce, and P. Scott. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 199: 1559–1566.
 48. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T. A. Potter, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.* 183: 1719–1729.
 49. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 103: 175–183.
 50. Miyahara, N., K. Takeda, T. Kodama, A. Joetham, C. Taube, J. W. Park, S. Miyahara, A. Balhorn, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Contribution of antigen-primed CD8⁺ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J. Immunol.* 172: 2549–2558.
 51. Coyle, A. J., S. Tsuyuki, C. Bertrand, S. Huang, M. Aguet, S. S. Alkan, and G. P. Anderson. 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 156: 2680–2685.
 52. Elser, B., M. Lohoff, S. Kock, M. Giaisi, S. Kirchhoff, P. H. Krammer, and M. Li-Weber. 2002. IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17: 703–712.
 53. Luttmann, W., E. Dauer, S. Schmidt, O. Marx, M. Hossfeld, H. Matthys, and J. C. Virchow, Jr. 2000. Effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand. J. Immunol.* 51: 54–59.
 54. Fulkerson, P. C., N. Zimmermann, E. B. Brandt, E. E. Muntel, M. P. Doecker, J. L. Kavanaugh, A. Mishra, D. P. Witte, H. Zhang, J. M. Farber, et al. 2004. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1987–1992.
 55. Diehl, S., T. Krahl, L. Rinaldi, R. Norton, C. G. Irvin, and M. Rincón. 2004. Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 172: 3597–3603.

7.2 Anexo II

TEIXEIRA L.K., **FONSECA, B.P.F.**, BARBOZA B.A., VIOLA, J.P.B. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 137-144. 2005.

The role of interferon- γ on immune and allergic responses

Leonardo K Teixeira⁺⁺, Bruna PF Fonseca⁺⁺, Bianca A Barboza⁺⁺, João PB Viola⁺

Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, 20231-050 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Allergic diseases have been closely related to Th2 immune responses, which are characterized by high levels of interleukin (IL) IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13. These cytokines orchestrate the recruitment and activation of different effector cells, such as eosinophils and mast cells. These cells along with Th2 cytokines are key players on the development of chronic allergic inflammatory disorders, usually characterized by airway hyperresponsiveness, reversible airway obstruction, and airway inflammation. Accumulating evidences have shown that altering cytokine-producing profile of Th2 cells by inducing Th1 responses may be protective against Th2-related diseases such as asthma and allergy. Interferon- γ (IFN- γ), the principal Th1 effector cytokine, has shown to be crucial for the resolution of allergic-related immunopathologies. In fact, reduced production of this cytokine has been correlated with severe asthma. In this review, we will discuss the role of IFN- γ during the generation of immune responses and its influence on allergic inflammation models, emphasizing its biologic properties during the different aspects of allergic responses.

Key words: interferon- γ - lymphocytes - immune system - allergy - allergic inflammation

Airway allergic diseases are common disorders, which affect approximately 5% of the Western world population, and show reportedly increasing incidence in developing countries during the last decades. Asthma, rhinitis, and allergy represent the most common allergic diseases, which arise as a result of interaction between multiple genetic and environmental factors. Most patients exhibit an acute immediate hypersensitivity to inhaled antigens, known as allergens, as a consequence of a genetic predisposition for the development of deregulated immune responses (atopy). The inflammatory process may be divided into early- and late-phase reactions. The early (immediate) response is usually mediated by mast cell degranulation, whereas late phase is followed by neutrophil, eosinophil, and lymphocyte migration to the inflammatory site. This chronic inflammatory disorder of the lung is usually characterized by (i) airway hyperresponsiveness (AHR), (ii) reversible airway obstruction and mucus hypersecretion, and (iii) airway inflammation (Wills-Karp 1999). Although allergic diseases have been linked to an enhanced Th2 immune response associated with high levels of interleukin (IL) IL-4, IL-5 and IL-13, accumulating evidences demonstrate that a decreased Th1 immune response is also important in the pathogenesis of these diseases, and that interferon- γ (IFN- γ) could act as a central regulator in this phenomenon. Therefore, in this review we have decided to focus on some of the major functions of IFN- γ that may be implicated in the pathogenic process of allergic inflammation.

The IFN- γ cytokine

The molecule - The cytokine IFN- γ belongs to the family of interferons, which are closely related by their ability to protect cells from viral infections. Based on several criteria, the IFN molecules have been divided into two distinct classes. The first class is named type I IFN and includes the IFN- α and IFN- β molecules, which are the classical interferons induced in response to viral infections. The second class is solely composed by IFN- γ (also termed type II or immune IFN), which is not related to the type I IFN at both the genetic and the protein levels. Although IFN- γ displays most of the biologic activities that have been described to the other IFN, it has a lower specific antiviral activity, but presents more immunomodulatory properties than the type I interferons (Farrar & Schreiber 1993).

Both human and mouse IFN- γ genes generate a unique 1.2 kb mRNA that encodes an amino acid polypeptide of 166 and 134 residues, respectively (Boehm et al. 1997). Two polypeptide chains self-associate in an antiparallel fashion, producing a molecule that exhibits a twofold axis of symmetry with an apparent molecular weight of 34 kDa (Farrar & Schreiber 1993, Bach et al. 1997). Only the dimer displays biologic activity, possibly because it is the only conformation of the molecule that can induce IFN- γ receptor (IFN- γ R) dimerization (Farrar & Schreiber 1993). For a long time, the production of IFN- γ has been considered to be restricted to activated natural killer (NK) cells, CD4⁺ T helper-1 (Th1) cells, and CD8⁺ T cytotoxic cells (Farrar & Schreiber 1993, Boehm et al. 1997). However, we now know that these cells are the most potent, but not the only sources of IFN- γ . Several studies have identified additional IFN- γ -secreting cell types, including $\gamma\delta$ T cells, NKT cells, macrophages, dendritic cells, naive CD4⁺ T cells, and even B cells (Frucht et al. 2001, Szabo et al. 2003).

Molecular mechanisms of gene expression - Much of the knowledge regarding the molecular mechanisms for IFN- γ expression has been described in T lymphocytes,

Financial support: Inca/FAF, Furnas Centrais Elétricas S.A., CNPq

⁺Corresponding author. E-mail: jpviola@inca.gov.br

⁺⁺Inca/FAF fellowship.

Received 8 November 2004

Accepted 30 December 2004

since these cells are excellent producers of this cytokine. Its gene expression is dictated by several transcription factors, which bind to DNA elements located within specific regulatory regions of the IFN- γ locus (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003). DNase I-hypersensitive experiments have shown that the IFN- γ regulatory region encompasses more than 8.0 Kb of genomic DNA, and consists of promoter cis elements, intronic regions and distal enhancers. The promoter region contains binding sites for a sort of IFN- γ -inducers, such as NF- κ B, NFAT, STAT-4, and T-bet (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003).

The expression of the IFN- γ gene has showed to be repressed by the immunosuppressive drug cyclosporin. In fact, three binding sites for the cyclosporin-sensitive NFAT family of transcription factors have been identified through the proximal region of the IFN- γ promoter. These sites are required for maximal IFN- γ expression in T cell lines and primary T lymphocytes (Sweetser et al. 1998). The NFAT and NF- κ B transcription factors are thought to bind to similar DNA sequences, and may thus coordinately cooperate for the regulation of IFN- γ gene expression. Hence, NF- κ B induction within T cells is crucial for substantial IFN- γ production and Th1 response (Sica et al. 1997). It has also been shown that both IL-12 and IL-18 augments IFN- γ production through the activation of NF- κ B pathway. However, the influence of the IL-12/IL-18 pathway on IFN- γ production in Th1 effector cells depends mainly on STAT4, which is able to directly bind to the promoter region of the IFN- γ gene. Even so, STAT4 does not seem to be essential for the initial production of IFN- γ , but to amplify the amount of IFN- γ produced by individual cells since STAT4^{-/-} T lymphocytes are still able to produce this cytokine (Murphy et al. 2000, Szabo et al. 2003).

While some nuclear factors are ubiquitous regulators of gene expression, others are required for selective gene expression in specific cellular subsets. In CD4⁺ T lymphocytes, T-bet (T-box expressed in T cells) was recently identified as the master switch of Th1 differentiation and to be the key regulator of IFN- γ expression in these cells (Szabo et al. 2000). T-bet is largely expressed in the lymphoid system, and also has shown to transactivate the IFN- γ gene and induce chromatin remodeling of the IFN- γ locus (Szabo et al. 2003). Three putative T-box binding sites were identified in the IFN- γ gene locus, two sites located 2 Kb from the start site and one in the third intron. Recently, Reiner and collaborators have identified two transcription factors also related to IFN- γ production: Hlx, a potential interacting partner for T-bet that has presented synergistic effects on IFN- γ production (Mullen et al. 2002); and Eomesodermin, a T-bet paralogue that controls effector functions of CD8⁺ T cells, including IFN- γ production (Pearce et al. 2003). Although some transcription factors are conserved regulators of IFN- γ gene expression among different cell types, it remains to be determined the key effectors of each cell lineage. Furthermore, the regions responsible for tissue-specific expression of the IFN- γ gene remain to be elucidated.

The signaling pathway - IFN- γ exerts its pleiotropic effects through a specific interaction with the cell surface

IFN- γ R. The receptor complex consists of two chains: IFN- γ R1 (also known as IFN- γ receptor α), which is the major ligand-binding subunit, and IFN- γ R2 (also known as IFN- γ receptor β), which is obligatory for IFN- γ signal transduction, and also increases the affinity of IFN- γ R1 for its ligand, presumably by enhancing the stability of the complex (Boehm et al. 1997, Tau & Rothman 1999).

Signal transduction starts with an interaction of the IFN- γ homodimer with two α -chain receptors, thereby inducing α -chain dimerization and the subsequent recruitment of two β -chains to the complex. Each chain is constitutively associated with a specific Janus kinase (JAK) (the α -chain with JAK1 and the β -chain with JAK2) (Igarashi et al. 1994). The aggregation of the receptor components brings inactive JAKs into close proximity with one another. Once clustered, JAKs are reciprocally activated through sequential auto and transphosphorylation events. After activation, JAKs then phosphorylate a specific tyrosine residue near the C-terminus of the IFN- γ R1, which serve as a docking site to the binding of STAT1 (Heim et al. 1995). The recruitment of STAT1 is followed by its phosphorylation on tyrosine residue 701 by the receptor-associated JAKs. This phosphorylation leads to a rapid dissociation of the receptor and to the formation of STAT1 homodimers (also called GAF, for gamma-activated factor) (Greenlund et al. 1995). At some point during the early phase of activation, STAT1 is also phosphorylated on serine 727 by a process involving phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and Akt that is required for maximal transcriptional activity (Nguyen et al. 2001). The STAT1 homodimer then translocates into the nucleus, where it is able to bind to defined DNA sequences (known as GAS, for gamma-activated site) and initiate or suppress transcription of IFN- γ -regulated genes (Darnell et al. 1994) (Fig. 1). In addition to the well known Jak-STAT pathway, IFN- γ activates several additional signal-transduction proteins (Ramana et al. 2002). In fact, targeted disruption of the STAT1 gene in mice has revealed STAT1-independent pathways in IFN- γ -dependent signaling (Gil et al. 2001). The role of these pathways in the variety of physiological and pathological conditions remains to be elucidated.

In summary, by activating the latent cytosolic transcription factor STAT1, IFN- γ initiates the transcription of a number of genes containing STAT1-binding sites in their promoter regions. Many of these induced genes are transcription factors (for example, IRF-1) that are able to further drive the regulation of the next wave of transcription. The total number of IFN- γ -regulated genes is estimated to be ~500 (Boehm et al. 1997). It has been demonstrated that IFN- γ upregulates the transcription of genes related to antigen presentation (MHC class I and II, β 2-microglobulin, TAP), Th1 phenotype development (STAT1, T-bet), chemokine-based recruitment of monocytes, T cells, eosinophils and basophils (MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES), cellular adhesion (VLA-4, ICAM-1, VCAM-1 molecules), immunoglobulin heavy chain class switch (IFN- γ upregulates IgG and downregulates IgE), cytokines network (IL-12, IFN- γ , CD40), apoptosis (CD95, caspases), lymphocyte activation (B7-1 and B7-2 molecules), and others (Boehm et al. 1997). As we shall dis-

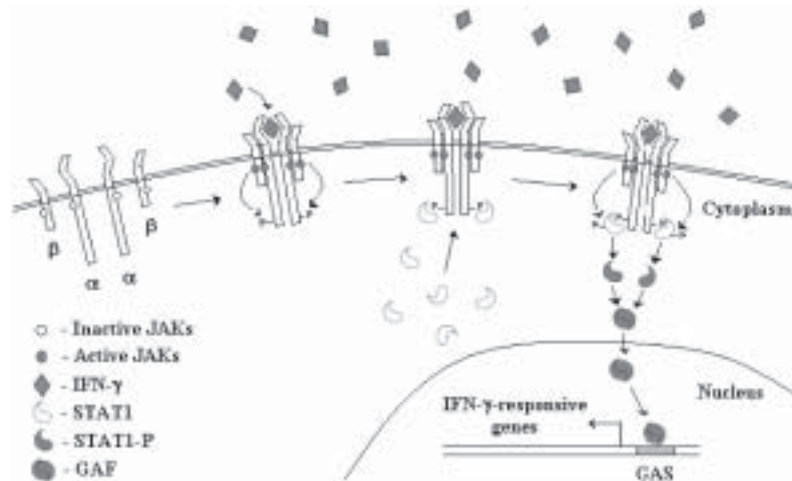


Fig. 1: interferon- γ (IFN- γ) signaling pathway. IFN- γ binds to its receptor (IFN- γ R) and leads to the aggregation of α and β -chains, which are constitutively associated with Janus Kinases (JAKs). Once activated, JAKs phosphorylate the IFN- γ R α chain, creating a docking site for STAT1, which is then phosphorylated and associated in homodimers (named GAF, for gamma-activated factor). The STAT1 homodimer translocates to the nucleus where it is able to bind to specific DNA sequences (named GAS, for gamma-activated site) and regulate the expression of IFN- γ -responsive genes.

cuss here, these IFN- γ -regulated genes take part in the generation of immune responses related to several stages of some allergic processes.

Immunologic basis of allergic diseases

Allergic inflammation has been closely associated with CD4⁺ Th lymphocytes, since a classical Th2 pattern of cytokine production has shown to contribute to the pathogenesis of this disease (Renauld 2001). Elevated numbers of Th2 cells have been identified in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids and airway biopsies from asthmatic patients. These lymphocytes produce high levels of IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13, which orchestrate the recruitment and activation of effector cells related to allergic responses, such as eosinophils and mast cells. The cytokine IL-4 was originally identified as a B cell growth factor, and further showed to promote IgE isotype switch in B cells. In addition, IL-4 is required for optimal Th2 and mast cell differentiation, whereas IL-5 is a selective factor for eosinophil activation and development. IL-4 and IL-5 also increase eosinophil adhesion to vascular endothelial cells, and promotes its infiltration to inflammatory sites by regulating surface markers on eosinophils (such as VLA-4) and endothelium (such as VCAM-1). These cytokines may be produced not only by CD4⁺ T cells, but also by mast cells and eosinophils themselves. Still considering Th2 cytokines, IL-13 is responsible for the mucus hypersecretion of submucosal glands and/or epithelial cells, and IL-9 has been recently related to mast cell and eosinophil proliferation/differentiation (Wills-Karp 1999, Renauld 2001).

In line with all these features, allergic inflammation is correlated with pronounced levels of serum IgE, eosinophil migration to the site of inflammation, and activation of specific cellular compartments. Together with allergen recognition, IgE antibodies bind to Fc receptors (FcR) present on the surface of mast cells and basophils, and

thus trigger the release of inflammatory mediators (such as histamine, prostaglandin and leukotrienes), as well as chemotactic factors (such as eotaxin/CCL11, MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5) and cytokines that in a fine-tuned way are responsible for several allergic reactions. In the mucosa, these mediators of hypersensitivity reactions rapidly induce vascular changes, edema, mucus production, and smooth muscle constriction. Furthermore, it seems that eosinophils are also involved in the pathogenesis of allergic diseases because they usually infiltrate to the target tissues, where they release several inflammatory mediators and cytokines that contribute to airway wall epithelium damage. Finally, chemokines, or chemoattractants, are also relevant in allergy not only for their role in regulating leukocyte recruitment (mainly basophils, eosinophils, and mast cells), but also because they can regulate cellular activation and inflammatory mediators release, IgE synthesis, and Th2 cell recruitment to the site of allergic inflammation. Taken all together, these findings indicate that Th2 cells and their cytokines can account for some of the initial hallmarks of airway inflammation, and are crucial for the pathogenesis of allergic diseases (Wills-Karp 1999, Renauld 2001). During the next sections, we will focus on how IFN- γ regulates Th immune responses, and may thus control allergic diseases.

IFN- γ and Th immune response

A critical aspect of the immune response to allergens is mediated by the helper function of CD4⁺ T cells. After engagement of the T cell receptor (TCR) by the appropriate peptide-MHC complex, naive CD4⁺ T cells rapidly undergo a differentiation process that leads to the development of two functionally distinct cell subsets. These subsets are characterized by a mutually exclusive pattern of cytokine secretion. Th1 cells secrete IFN- γ and TNF- β and are efficient in eliminating intracellular pathogens. Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, which affect

humoral immunity to helminthic parasites and are responsible for immune responses to persistent allergens (Abbas et al. 1996). Several factors can influence the differentiation pathway of CD4⁺ Th cells, specially the cytokines prevailing within the microenvironment where these cells encounter antigens (Constant & Bottomly 1997). IL-12 and IL-4 are known to be the major Th1- and Th2-inducing cytokines, respectively (Abbas et al. 1996). The Th1/Th2 balance is extremely important and may determine whether the immune response is appropriate or leads to severe immunopathologies. Overproduction of Th1 cytokines has been implicated in delayed-type hypersensitivity reactions and autoimmune diseases. On the other hand, it is notorious that the basis for allergic disorders remains on the dysregulation of the Th2 phenotype as previously stated here (Abbas et al. 1996).

Accumulating evidences have shown that altering cytokine-producing profile of Th2 cells by inducing Th1 responses is protective against Th2-related disorders such as asthma and allergy. It has been demonstrated that Th1 lymphocytes and cytokines such as IFN- γ and IL-12 may counteract and suppress Th2 responses of allergic diseases (Iwamoto et al. 1993, Cohn et al. 1999, Dow et al. 1999). In fact, defective IFN- γ production predisposes toward the development of allergic diseases, and patients with severe asthma present significantly reduced IFN- γ production in response to allergen when compared to control individuals (Leonard et al. 1997, Renzi et al. 1999). Moreover, resolution of allergy seems not to be related with a reduction in Th2-cytokine production, but with normalization of IFN- γ levels (Smart et al. 2002). Interestingly, it has also been reported an inverse association between dominant IFN- γ immune responses to intracellular pathogens in childhood and the incidence of asthma (Shirakawa et al. 1997). These results emphasize the inhibitory character of IFN- γ on the response against allergens.

IFN- γ is the principal Th1 effector cytokine, and it has a crucial role in Th1 differentiation. IFN- γ has the ability to act in a great number of cell types that are involved in Th differentiation. It induces IL-12 production by antigen presenting cells (APC), such as dendritic cells and macrophages (Snijders et al. 1998, Szabo et al. 2003). These APCs provide the first contact of naive CD4⁺ T cells with the antigen, therefore this IL-12 production is of great importance on the differentiation pathway towards a Th1 phenotype. In addition to its role on APC, IFN- γ exerts effects on the CD4⁺ T cells themselves. This cytokine is capable of enhancing the development of Th1 effector cells from BALB/c mice by increasing naive CD4⁺ T cells responses to IL-12 (Wenner et al. 1996). Actually, IFN- γ is responsible for inducing/maintaining the expression of the β chain of the IL-12 receptor (IL-12R β 2) through T-bet activation, stating an important role of IFN- γ on the Th1 effects mediated by IL-12 (Mullen et al. 2001, Afkarian et al. 2002). Studies on CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice have also revealed a direct role for IFN- γ as an inducer of Th1 polarization via an autocrine mechanism, independent of IL-12 (Bradley et al. 1996) (Fig. 2).

IFN- γ also exerts direct inhibitory effects on Th2 cytokines, reducing the levels of IL-4 and IL-5 production. The IFN- γ signaling pathway activates T-bet protein, the Th1-specific and Th2-suppressing transcription factor (Lighvani et al. 2001, Afkarian et al. 2002). In fact, ectopically expression of T-bet was able to repress IL-4 and IL-5 in Th2 cells (Szabo et al. 2000). In a model of atopic dermatitis, Th2 cells retrovirally transfected with a vector expressing T-bet conferred Th1-like cytokine production and migratory capacities to those cells (Lametschwandtner et al. 2004). Consistently, T-bet-deficient mice have impaired IFN- γ production and also develop spontaneous AHR similar to allergic patients (Finotto et al. 2002). Also, T-bet expression in CD4⁺ T cells is diminished in the lungs of asthmatic patients, who present sig-

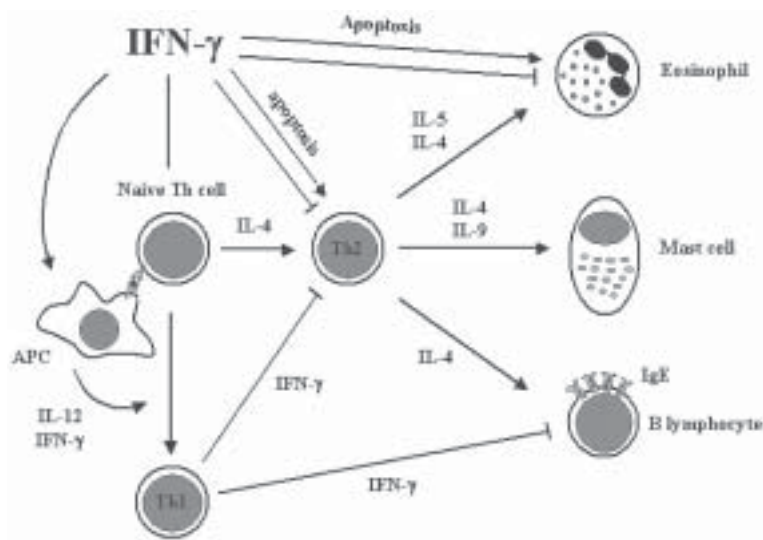


Fig. 2: interferon- γ (IFN- γ) controls Th immune and allergic responses. IFN- γ is produced by different cell sources. It may counteract Th2 immune responses (by suppressing the development of Th2 lymphocytes), induce Th1 differentiation (by enhancing IL-12 production by APC or skewing naive Th lymphocytes toward the Th1 phenotype), and control several steps of allergic responses (by inducing eosinophil apoptosis and blocking IgE isotype switch in B cells).

nificantly lower IFN- γ secretion by peripheral blood mononuclear cells when compared with healthy individuals (Nurse et al. 1997, Finotto et al. 2002). On the other hand, the Th2-induced transcription factor GATA-3 specifically controls the expression of Th2 cytokines, which are essential to induce allergic inflammation *in vivo* (Zheng & Flavell 1997). In fact, increased levels of GATA-3 mRNA expression have been reported in asthmatic airways when compared to those of control subjects and correlated with increased IL-5 expression (Nakamura et al. 1999). The expression of a dominant-negative mutant of GATA-3 led to a reduction in the levels of all Th2 cytokines and attenuated mucus production, IgE synthesis, and airway eosinophilia in the transgenic mice (Zhang et al. 1999).

IFN- γ has indeed a crucial role on inhibiting Th2 responses but not only through T-bet expression. Loss of IL-4 receptor responsiveness may be another mechanism that suppresses Th2 development in polarizing Th1 cells (Huang & Paul 1998). Other studies have shown that IFN- γ directly suppresses IL-4 gene expression through IRF-1 and 2, which bind to three distinct IL-4 promoter sites and act as transcriptional repressors (Elser et al. 2002). *In vivo*, IFN- γ -mediated Th2 repression can be shown by experiments based on models of pulmonary inflammation orchestrated by Th2 cytokines. In IFN- γ R^{-/-} mice previously sensitized with OVA and rechallenged intranasally with the same antigen, the inflammatory lung disease persisted long after it was resolved by wild type mice (Coyle et al. 1996). As discussed before, IFN- γ acts not only as a potent activator of the Th1 phenotype, but also as a suppressor of Th2 development.

Besides the counteracting roles of IFN- γ in the Th2 differentiation process, IFN- γ has a role in inhibiting the proliferation of Th2 cells. In fact, over a decade ago Gajewski and Fitch (1988) have observed that IFN- γ was responsible for the inhibition of proliferation and IL-1-induced responses of some Th2 clones. Further experiments have shown that Th1 cells decreased their expression of the β chain of the IFN- γ R while Th2 cells did not, suggesting a mechanism by which IFN- γ could inhibit selectively the proliferation of Th2 clones (Pernis et al. 1995). The role of IFN- γ in promoting Th1- and inhibiting Th2-type responses has also been subject of some controversy. Recently, Bocek and colleagues (2004) have shown a quite unexpected function for IFN- γ as an IL-4-production inducer. The authors suggest that the precise amount of cytokines may be the key to whether the dominant effect of IFN- γ is to enhance or suppress Th2 priming (Bocek et al. 2004).

IFN- γ and allergic inflammation

The suppressive effects of IFN- γ on allergic diseases have been shown to be mediated by various mechanisms, such as the (1) regulation of allergen presentation to T lymphocytes, (2) differentiation of naive T cells toward Th1 phenotype and/or inhibition of Th2 cell recruitment/differentiation, (3) suppression of Th2 cytokine release from activated T cells, (4) inhibition of effector cell recruitment to the site of inflammation, (5) induction of apoptosis in T cells and eosinophils, (6) blockage of IgE isotype switch in B cells, and (7) induction of nitric oxide (NO) production. Actually, IFN- γ is known to be a pleio-

tropic cytokine that induces and modulates an array of immune responses. Therefore, in this section we have decided to focus on some of the major functions of this cytokine not discussed until here that may be implicated in allergic diseases in a certain manner.

One of the important physiologic roles of IFN- γ during the generation of immune responses is its ability to upregulate the expression of MHC class I and II proteins in several cell types. While this upregulation enhances antigen presentation in macrophages, it has been shown that IFN- γ almost completely abrogates the capacity to present antigens by mast cells, central mediators of allergic reactions (Farrar & Schreiber 1993, Frandji et al. 1995). Since Th cells can be activated in the airway mucosa, mast cells could act as APCs in the absence of IFN- γ , inducing Th2-type responses through their ability to produce substantial amounts of IL-4 (Hamid et al. 1991, Frandji et al. 1995, Constant & Bottomly 1997).

It has been demonstrated that IFN- γ is responsible for regulating the activation, differentiation and recruitment of eosinophils. In fact, IFN- γ induces a decrease in the expression of the eotaxin receptor (CCR3), which was recently showed to be an important inducer of eosinophil differentiation from hematopoietic progenitor cells (Lamkhioed et al. 2003). Lung eosinophil recruitment is one of the hallmarks of atopic asthma and IFN- γ seems to play an important inhibitory role on these cells. Through the induction of the chemokine Mig (CXCL9), IFN- γ inhibits the eotaxin-dependent recruitment of eosinophils to the lung (Fulkerson et al. 2004). *In vivo* models of allergic inflammation have also proved the properties of IFN- γ to regulate allergen-induced eosinophilic infiltration. Recombinant IFN- γ treatment before inhalation of aerosolized antigen prevented eosinophil infiltration into the trachea of sensitized mice (Iwamoto et al. 1993). Targeted disruption of the IFN- γ receptor gene has resulted in a prolonged airway eosinophilia in response to allergen, suggesting that IFN- γ signaling pathway is crucial to control eosinophil recruitment *in vivo* (Coyle et al. 1996). In human studies, nebulized IFN- γ has also reduced the number of eosinophils in the BAL of asthmatic patients (Boguniewicz et al. 1995). However, it is unlikely that this cytokine directly acts on the eosinophils during its infiltration to inflammatory tissues. In agreement, several reports have concluded that IFN- γ directly prevents allergen-induced CD4⁺ T cell infiltration into the tissue and thereby inhibits the following IL-5-dependent eosinophil recruitment.

IFN- γ also plays a role in the nitric oxide pathway, inducing iNOS, an NO synthase (Boehm et al. 1997). Through the induction of NO production, IFN- γ inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells (Eastmond et al. 1997). Moreover, NO itself is a bronchodilator, and inhalation of high concentrations of NO has resulted in a small bronchodilatory response in asthmatic patients (Högman et al. 1993). NO has also shown a role in inhibiting proliferation and DNA synthesis in airway smooth muscle cells (Patel et al. 1999). Since hyperplasia and hypertrophy of airway smooth muscle are thought to contribute to airway dysfunctions such as asthma, NO induction could be an important inhibitor of these diseases (Patel et al. 1999).

Another critical role of IFN- γ in allergic reactions is its ability to inhibit immunoglobulin class switching to IgE, which is an important mediator of allergic pathologies induced by Th2 cytokines as discussed before (Boehm et al. 1997). Besides inhibiting IgE class switch, IFN- γ induces IgG production instead. IgG may neutralize inhaled allergens, and through interactions with Fc γ receptors (Fc γ R), may promote activation of accessory cells and enable Fc γ R-mediated endocytosis of allergen-IgG complexes, thereby promoting allergen capture and presentation by APC, such as alveolar macrophages (Sehra et al. 2003). This results on the activation of specific Th subsets, specially cells from the Th1 lineage, since several studies have shown that the APC activity of macrophages is associated with Th1 cell priming (Desmedt et al. 1998). In fact, treatment with anti-allergen IgG in the airways of sensitized mice was followed by an increment of secreted IFN- γ along with a shift from a Th2-skewed response to a more balanced Th1/Th2 response. In addition, a resulting reduction in eosinophils in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of these mice has also been observed after treatment (Sehra et al. 2003). For these reasons, it has been suggested that the induction of IFN- γ may be beneficial in regulating IgE-mediated inflammation. Thus, the decreased production of IFN- γ in asthmatic patients may enable an increase in IgE levels by either permitting IgE isotype switch of B cells or by permitting more CD4⁺ T cell progenitors to differentiate into Th2 cells.

It has also been reported the involvement of IFN- γ in apoptotic events. Inflammatory responses induced by allergen exposure cause mucus cell metaplasia by differentiation of existing and proliferating epithelial cells into mucus-storing cells. IFN- γ has a role in inducing apoptosis of these cells through the induction of caspases and Bax, two proapoptotic proteins, thereby recovering the original proportions of cell types in the airway epithelium (Shi et al. 2002, Tesfaigzi et al. 2002). Accordingly, IFN- γ has shown to induce apoptosis in T cells and eosinophils through caspase and CD95/Fas-mediated mechanisms, respectively (Luttman et al. 2000, Refaeli et al. 2002). Also, it has been indicated a correlation between increased IFN- γ production and enhanced apoptosis of eosinophils and CD4⁺ T cells in allergic airway infiltrates (Kodama et al. 2003). Thus, IFN- γ -mediated apoptosis induction of CD4⁺ T cells and eosinophils may be an alternative explanation for the suppressive effects of IFN- γ directly on the local recruitment of these cells in allergic situations.

The adoptive transfer of IFN- γ -producing cells into allergen-sensitized recipients has also protected from airway eosinophilia after antigen challenge. Indeed, when transferred into recipient mice, CD4⁺ Th1 cells have inhibited Th2-induced eosinophilia and mucus secretion through the production of IFN- γ , since IFN- γ R^{-/-} mice had prolonged eosinophilia (Cohn et al. 1999). However, other studies have suggested that adoptively transferred Th1 cells might induce an inflammatory response encountered in asthma due to the proinflammatory properties of IFN- γ . It really seems that an inflammatory response is necessary to activate lung macrophages to produce reactive oxygen species, which are important to airway remodeling. Lung macrophages are also able to selectively

promote Th1 responses during secondary exposure to inhaled allergen, thereby suppressing Th2-mediated allergic airway inflammation (Tang et al. 2001). Finally, IFN- γ secretion by transferred CD8⁺ T cells has also controlled airway eosinophilia in a model of allergen-challenged rats (Suzuki et al. 2002). Although increasing evidences suggest a protective role for IFN- γ against allergic diseases, conflicting results still regard its involvement in these responses (Hansen et al. 1999). Therefore, strengthening Th1 responses of allergic patients either by the adoptive transfer of activated antigen-specific T cells or by the administration of recombinant IFN- γ may only be considered as a potential immunotherapy intervention after further intensive investigations.

Concluding remarks

Several experimental findings have strongly supported the idea that the pathogenesis of allergic diseases is related to a misbalance between Th1/Th2 immune responses. For the past few years, it has been demonstrated that allergic inflammation is associated to an enhanced Th2 immune response. However, we now know that the absence of competent Th1 immune responses, specially the downregulation of IFN- γ , accounts for the establishment of these diseases. We reviewed here the recent data that demonstrate the importance of this cytokine in the modulation of allergic diseases. The development of novel therapeutic strategies has been designed to inhibit the development of Th2 cells (or the effect of their cytokines) and shift the immune response into a Th1 phenotype. In fact, the potent inhibitory property of IFN- γ on Th2 responses and allergic inflammation has suggested that it might be a possible treatment approach for such diseases. However, initial studies have shown unexpectedly high toxicity and several side effects related to IFN- γ administration to allergic patients. Even so, based on all findings related to IFN- γ modulation of Th immune response and allergy, any new possible immunotherapy approach developed for allergic inflammation will need to take into account the potent immunoregulatory properties of this cytokine.

REFERENCES

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 3: 549-557.
- Bach EA, Aguet M, Scheiber RD 1997. The IFN- γ : a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15: 563-591.
- Bocek P, Foucras G, Paul WE 2004. Interferon- γ enhances both in vitro and in vivo priming of CD4⁺ T cells for IL-4 production. *J Exp Med* 199: 1619-1630.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.
- Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, Leung DY 1995. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 95: 133-135.

- Bradley LM, Dalton DK, Croft M 1996. A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 157: 1350-1358.
- Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K 1999. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 190: 1309-1318.
- Constant SL, Bottomly K 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322.
- Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS, Anderson GP 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 156: 2680-2685.
- Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
- Desmedt M, Rottiers P, Dooms H, Fiers W, Grooten J 1998. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol* 160: 5300-5308.
- Dow SW, Schwarze J, Heath TD, Potter TA, Gelfand EW 1999. Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum Gene Ther* 10: 1905-1914.
- Eastmond NC, Banks EMS, Coleman JW 1997. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN- γ -induced suppression of exocytosis. *J Immunol* 159: 1444-1450.
- Elser B, Lohoff M, Kock S, Giaisi M, Kirchhoff S, Krammer PH, Li-Weber M 2002. IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17: 703-712.
- Farrar MA, Schreiber RD 1993. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11: 571-611.
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FHY, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336-338.
- Frandji P, Tkaczyk C, Oskéritzian C, Lapeyre J, Peronet R, David B, Guillet J-G, Mécheri S 1995. Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by IFN- γ . *Cell Immunol* 163: 37-46.
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S 2001. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 22: 556-560.
- Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doepker MP, Kavanaugh JL, Mishra A, Witte DP, Zhang H, Farber JM, Yang M, Foster PS, Rothenberg ME 2004. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1987-1992.
- Gajewski TF, Fitch FW 1988. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140: 4245-4252.
- Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR, Virgin HW, Schreiber RD 2001. Biologic consequences of STAT1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6680-6685.
- Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2: 677-687.
- Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK 1991. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 87: 1541-1546.
- Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103: 175-183.
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell Jr JE 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267: 1347-1349.
- Högman M, Frostell CG, Hedenström H, Hedenstierna G 1993. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 148: 1474-1478.
- Huang H, Paul WE 1998. Impaired interleukin 4 signaling in T helper type 1 cells. *J Exp Med* 187: 1305-1313.
- Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Larner AC, Finbloom DS 1994. Interferon-induces tyrosine phosphorylation of interferon-g receptor and regulated association of protein kinases, JAK1 and JAK2, with its receptor. *J Biol Chem* 269: 14333-14336.
- Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S 1993. Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 177: 573-576.
- Kodama T, Kuribayashi K, Nakamura H, Fujita M, Fujita T, Takeda K, Dakhama A, Gelfand EW, Matsuyama T, Kitada O 2003. Role of interleukin-12 in the regulation of CD4⁺ T cell apoptosis in a mouse model of asthma. *Clin Exp Immunol* 131: 199-205.
- Lametschwandtner G, Biedermann T, Schwärzler C, Günther C, Kund J, Fassel S, Hinteregger S, Carballido-Perrig N, Szabo SJ, Glimcher LH, Carballido JM 2004. Sustained T-bet expression confers polarized human Th2 cells with Th1-like cytokine production and migratory capacities. *J Allergy Clin Immunol* 113: 987-994.
- Lamkhioed B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Delespesse, Renzi PM 2003. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34⁺ progenitor cells. *J Immunol* 170: 537-547.
- Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 368-375.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15137-15142.
- Luttmann W, Dauer E, Schmidt S, Marx O, Hossfeld M, Matthys H, Virchow Jr JC 2000. Effects of interferon-g and tumor necrosis factor-a on CD95/Fas ligand-mediated

- apoptosis in human blood eosinophils. *Scand J Immunol* 51: 54-59.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-1910.
- Mullen AC, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Sykes KJ, Chodosh LA, Reiner SL 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable Th1 gene induction. *Nat Immunol* 3: 652-658.
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18: 451-494.
- Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103: 215-222.
- Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR 2001. Roles of phosphatidylinositol-3'-kinase in IFN- γ -dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 276: 33361-33368.
- Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG, Potter PC 1997. Reduced interferon-gamma but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 100: 662-668.
- Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA 1999. Constitutive expression of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J* 13: 1810-1816.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao C-a, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor *Eomesodermin*. *Science* 302: 1041-1043.
- Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P 1995. Lack of interferon- γ receptor b chain and the prevention of interferon g signaling in Th1 cells. *Science* 269: 245-247.
- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR 2002. STAT1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol* 23: 96-101.
- Refaeli Y, Parijs LV, Alexander SI, Abbas AK 2002. Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196: 999-1005.
- Renauld J-C 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 54: 577-589.
- Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, Drblik SP, Bérubé D, Gagnon MF, Spier S 1999. Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1417-1422.
- Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, Haegeman A, Matthys P, Tagawa Y, Pauwels R, Grooten J 2003. Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on Fc γ R and IFN- γ . *J Immunol* 171: 2080-2089.
- Shi ZO-Q, Fischer MJ, De Sanctis GT, Schuyler MR, Tesfaigzi Y 2002. IFN- γ , but not Fas, mediates reduction of allergen-induced mucous cell metaplasia by inducing apoptosis. *J Immunol* 168: 4764-4771.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275: 77-79.
- Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA 1997. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J Biol Chem* 272: 30412-30420.
- Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, Tang ML 2002. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *J Allergy Clin Immunol* 110: 450-456.
- Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 10: 1593-1598.
- Suzuki M, Maghni K, Molet S, Shimbara A, Hamid QA, Martin JG 2002. IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J Allergy Clin Immunol* 109: 803-809.
- Sweetser MT, Hoey T, Sun YL, Weaver WM, Price GA, Wilson CB 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J Biol Chem* 273: 34775-34783.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21: 713-758.
- Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM 2001. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN- γ -dependent mechanism. *J Immunol* 166: 1471-1481.
- Tau G, Rothman P 1999. Biologic function of the IFN- γ receptor. *Allergy* 54: 1233-1251.
- Tesfaigzi Y, Fischer MJ, Daheshia M, Green FHY, De Sanctis GT, Wilder JA 2002. Bax is crucial for IFN- γ -induced resolution of allergen-induced mucus cell metaplasia. *J Immunol* 169: 5919-5925.
- Wenner CA, Güler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM 1996. Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156: 1442-1447.
- Wills-Karp M 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17: 255-281.
- Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A 1999. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11: 473-482.
- Zheng W, Flavell RA 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-596.

7.3 Anexo III

VIOLA J.P.B., CARVALHO L.D.S., FONSECA, B.P.F., TEIXEIRA L.K. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Research* 38: 335-344. 2005.

NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development

J.P.B. Viola,
L.D.S. Carvalho,
B.P.F. Fonseca
and L.K. Teixeira

Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

The nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors has been primarily identified in immune cells; however, these proteins have been recently found to be functionally active in several other non-immune cell types. NFAT proteins are activated upon different stimuli that lead to increased intracellular calcium levels. Regardless of their widely known cytokine gene expression properties, NFATs have been shown to regulate other genes related to cell cycle progression, cell differentiation and apoptosis, revealing a broader role for these proteins in normal cell physiology. Several reports have addressed the participation of NFATs in many aspects of malignant cell transformation and tumorigenic processes. In this review, we will discuss the involvement of the different NFAT family members in the regulation of cell cycling, differentiation and tumor formation, and also its implications on oncogenesis. Better understanding the mechanisms by which NFATs regulate cell cycle and tumor-related events should be relevant for the development of rational anti-cancer therapies.

Key words

- NFAT
- Cell cycle
- Cancer
- Cell differentiation
- Gene expression

Correspondence

J.P.B. Viola
Divisão de Biologia Celular
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Rua André Cavalcanti, 37, 5º andar
20231-050 Rio de Janeiro, RJ
Brasil
Fax: +55-21-3233-1470
E-mail: jpvioa@inca.gov.br

Presented at the XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Campinas, SP, Brazil, July 15-18, 2004.

Research supported by INCA/FAF, FURNAS Centrais Elétricas S.A., and CNPq. L.K. Teixeira and B.P.F. Fonseca were supported by an INCA/FAF fellowship.

Received July 16, 2004
Accepted November 12, 2004

Introduction

Cell activation is regulated by an interacting network of transcription factors that determine the expression of different genes. It has been shown that several transcription factors, including the nuclear factor of activated T cells (NFAT) family, play an important role in the control of gene expression during cell activation and differentiation. Most of the work on NFAT proteins has been related to immune cell activation and its mediators, such as cytokines (1). However, accumulating evidence has been demonstrat-

ing that NFAT transcription factors are present in a wide range of cell types and tissues that are not related to the immune system, and implicated in the regulation of genes that control cell cycle progression, cell development and differentiation, angiogenesis, and possibly tumorigenesis (2-7). Given the importance of these processes in different stages of cell physiology, it is of considerable interest to understand the mechanisms by which NFAT transcription factors affect cell activation and function. Thus, in this review we will focus on the involvement of the NFAT family of transcription factors in cell cycle

regulation, cell differentiation and oncogenesis.

The NFAT family of transcription factors

NFAT was first identified in T cells as a rapidly inducible nuclear factor able to bind to the distal antigen receptor responsive element of the human IL-2 promoter (8). Over the past few years, studies from several laboratories have indicated that NFAT proteins regulate the expression of different genes, including signaling proteins, cytokines, cell surface receptors, and cell cycle and apoptosis related proteins. The NFAT family of transcription factors encodes four distinct proteins that are regulated by the calcium/calcineurin signaling pathway, known as NFAT1 (also called NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), and NFAT4 (NFATx, NFATc3), and another protein named NFAT5 (TonE-BP), which is regulated by hyperosmotic stress (1,9). NFAT1, the first identified member of the family, was cloned from murine (Ar-5) and human (Jurkat) T cell cDNA libraries (10,11). A distinct protein, NFAT2, was also cloned from a Jurkat T cell cDNA library (12). cDNA clones encoding two other NFAT proteins, NFAT3 and NFAT4, were isolated from Jurkat T cell, human peripheral blood lymphocyte and human thymus cDNA libraries (13,14).

Despite their name, NFAT proteins are expressed not only in T cells, but also in other classes of immune and non-immune cells. NFAT1, NFAT2 and NFAT4 are expressed at the protein level in peripheral T and B cells; NFAT1 is also expressed in mast cells, NK cells, and in certain monocytes and macrophages (1,9,15). NFAT1 and NFAT2 mRNAs are expressed in peripheral lymphoid tissues, and NFAT2 mRNA is upregulated in activated T cells and NK cells (12,14). NFAT4 mRNA is expressed at high levels in the thymus and at low levels in peripheral

lymphoid tissues (13,14). However, several data have demonstrated that NFAT proteins are also present in different non-related immune cell lines and tissues, such as neuronal cell line and nervous system tissues, endothelial cell line, skeletal and heart muscle, chondrocytes, keratinocytes, and adipocytes among others (1,5,16).

Several isoforms have been described for NFAT1, NFAT2 and NFAT4. Sequence homology represented in all the isoforms suggests two different domains, comprising the DNA-binding domain and the NFAT homology region (11,17). The DNA-binding domain, which is located between amino acid residues 400 and 700, is highly conserved within the NFAT family, and shows moderate sequence similarity to the DNA-binding domains of Rel-family proteins (17). Based on comparisons of binding site sequences, the NFAT binding site is determined to be a 9-bp element, possessing the consensus nucleotide sequence (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N (1,9). In addition, NFAT transcription factors cooperate with AP-1 proteins in DNA binding and transactivation, and this association results in stabilization of the NFAT-DNA interaction (1,9). The NFAT homology region is located in the N-terminal region, comprising 300 amino acids, and shows a strong conservation of several sequence motifs characteristic of the NFAT family (11,13,14).

Further on, NFAT transcription factors have been characterized as cytosolic proteins constitutively expressed in resting cells (1). Upon stimulation of receptors coupled to calcium mobilization, NFAT proteins are activated by calcineurin, the calcium/calmodulin-activated serine-threonine phosphatase (1,9). Activation of NFAT by calcineurin is sensitive to calcineurin inhibitors and immunosuppressive agents, such as cyclosporin A and FK506 (1,15). Three different steps of activation have been defined for NFAT proteins: dephosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding (Figure 1). In resting cells, NFAT proteins

are phosphorylated and cytoplasmic, and show a low affinity for DNA (18). Stimuli that trigger calcium mobilization result in rapid dephosphorylation of NFAT proteins and their translocation to the nucleus, where dephosphorylated proteins show increased affinity for DNA (18,19). Binding sites for NFAT proteins are present in the promoter/enhancer regions of several inducible genes, including the cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , and TNF- α ; the cell surface proteins CD40L, CTLA-4 and FasL; the enzyme cyclooxygenase-2, and the cell cycle regulator CDK4 (1,4,15,20,21). Thus, a large number of inducible genes that regulate cell proliferation, differentiation, survival, and apoptosis are under the control of NFAT proteins.

NFAT and cell cycle regulation

The cell cycle is controlled by a set of protein complexes composed by two basic components: cyclin-dependent kinases (CDK) and their activation partners, the cyclins. Cyclin-CDK activity is regulated in response to appropriate stimuli and plays a key role in controlling cell cycle progression. The expression of specific cyclins is regulated at the transcription level, and dictates the formation of distinct cyclin/CDK complexes at different points of the cell cycle. CDK activity is usually influenced by several mechanisms, such as cyclin degradation (22) and phosphorylation of CDKs by inhibitory proteins, known as CDK inhibitors. CDK inhibitors are composed by two families of proteins: INK4 proteins, which specifically inhibit the catalytic subunit of CDK4 and CDK6, and Cip/Kip proteins, which affect the activity of cyclin D-, E-, and A-dependent kinases (23).

Different classes of cyclins are defined by the cell cycle phase at which they bind to CDKs and exert their function. During G0/G1 transition phase, cyclin C stimulates CDK3-mediated phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRB), exiting cells from

quiescence (24). In G1 phase, cyclin D-CDK4/6 complex phosphorylates pRB and leads to E2F transcription factor release, which transactivates genes related to S phase entry (23,25,26). During late G1, cyclin E-CDK2 phosphorylates additional sites of the pRB subsequent to cyclin D-CDK4/6 phosphorylation sites, regulating G1/S transition. Cyclin A has been implicated in the control of S phase entry, as well as in the G2/M transition by binding to CDK2 and CDK1, respectively. Mitosis phase events are quite dependent on specific cyclin B-CDK1 complex activity (23,26).

Increase of intracellular free calcium is central for cellular activation. Several observations have demonstrated that calcium signal stimulates gene transcription associated with cell cycle progression, and also promotes G1/S phase transition (27-29). Furthermore, accumulating evidence suggests that the phosphatase calcineurin plays a major role in the regulation of cell cycle progression by acting during the early stages of G1 phase (20,30,31). Taken together, these results suggest that NFAT proteins, which are activated in consequence of calcium stimulus and calcineurin activity, are central regulators of the cell cycle machinery.

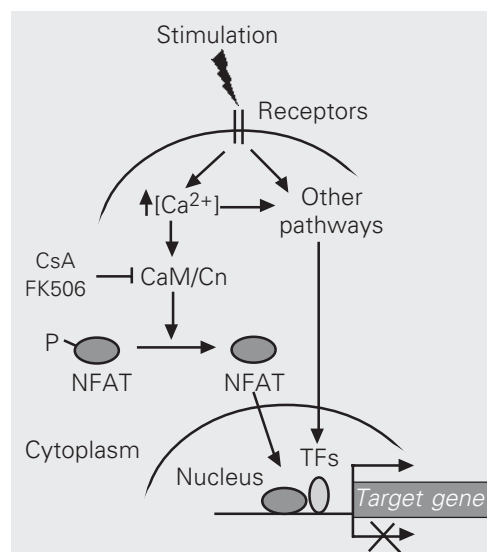


Figure 1. Schematic view of NFAT transcription factor signaling pathway in gene expression regulation. NFAT proteins are activated upon different stimuli that lead to increased intracellular calcium levels. When dephosphorylated by calcineurin, NFAT rapidly translocates to the nucleus where it regulates the expression of several target genes. NFATs may function as transcriptional activators or repressors and cooperate with several other transcription factors. Ca^{2+} = calcium; CaM = calmodulin; Cn = calcineurin; CsA = cyclosporin A; NFAT = nuclear factor of activated T cells; P = phosphorylation; TFs = transcription factors.

Recently, it has been demonstrated that the promoter of CDK4 presents a consensus-binding site for NFAT proteins and is negatively regulated by NFAT1 without AP-1 cooperation (4). This finding demonstrates that NFAT1 directly controls the expression of CDK4 at the transcription level. Furthermore, NFAT1 has been implicated in the control of some cyclin genes, acting as a negative regulator of cyclins A2, E and B1 during lymphocyte activation (3). These results support the idea that the hyperproliferative phenotype observed in NFAT1^{-/-} lymphocytes is related to a deregulated cell cycle progression, suggesting that NFAT1 transcription factor plays a central role in controlling cell cycle during T cell activation (3). Several other data also support this evidence. It has been shown that cyclosporin A and FK506 inhibit the expression of cyclins A and E in 3T3 fibroblasts (31). Another evidence for the involvement of NFAT on cell growth has been shown in keratinocyte cells, where cyclosporin A suppressed the expression of p21^{WAF1/Cip1} and p27^{KIP1}, two CDK inhibitors (32). Moreover, transactivation of p21 promoter is upregulated by calcineurin and is dependent of Sp1/Sp3 in synergism with NFAT1 and NFAT2 (32). In addition, it has also been demonstrated that overexpression of NFAT2 in preadipocyte 3T3-L1 cells promoted cell cycle progression even under low serum concentrations and induced altered expression of cell cycle-related genes, such as cyclin D1, cyclin D2, pRB, and c-Myc (6). Finally, preliminary data from our laboratory suggest that NFAT1 directly regulates the expression of cyclin A2 gene (Carvalho LDS and Viola JPB, unpublished observations). This evidence supports the hypothesis that NFAT transcription factors control the expression of cell cycle-related genes and are central regulators of cell cycle progression.

Cell cycle and CD4⁺ T cell differentiation

Upon primary stimulation, naive CD4⁺ T

lymphocytes (T helper, Th) differentiate into two classes of effector cells with distinct functional abilities (33). During Th differentiation, these cells commit to a specific and mutually exclusive pattern of cytokine secretion (33). Th1 cells are characterized by the production of IFN- γ , contributing to cellular immune responses against intracellular pathogens, while Th2 cells produce IL-4, IL-5 and IL-13, participating on the response against extracellular pathogens (33). Several factors can influence the differentiation pathway of Th cells, specially the conditions prevailing within the microenvironment where T cells encounter antigen (34). However, the molecular basis for the cell-specific and mutually exclusive expression of Th1 or Th2 cytokines is not yet completely defined. Genetic experiments have implicated several transcription factors in Th cell differentiation, including NFAT, STAT4, STAT6, T-Bet and GATA-3. The proteins T-Bet and GATA-3 have been implicated as critical lineage-specific transcription factors which are sufficient to program Th1 and Th2 cytokine expression profiles, respectively (35,36). Conversely, gene disruption of STAT4 and STAT6 indicated that these transcription factors also play major roles in Th differentiation (37,38). However, in this section we will focus on reviewing data regarding the role of NFAT family proteins in Th differentiation.

NFAT proteins are present in both Th1 and Th2 cells, and can activate cytokine promoters in both cell types (1,15). Also, NFAT transcriptional activity appeared to be similarly regulated during Th1/Th2 development, although it was enhanced in differentiated Th2 cells compared with differentiated Th1 cells (39). These similarities suggested that the activity of NFAT transcription factors were likely to overlap substantially. However, data generated by *in vivo* gene disruption of the different NFAT proteins suggest that they may have distinct roles in Th differentiation. NFAT1^{-/-} mice

developed normally, and did not exhibit any obvious behavioral deficiencies (40,41). However, NFAT1^{-/-} mice consistently showed a marked increase in their immune response. NFAT1^{-/-} mice showed an enhanced Th2 development in both *in vivo* and *in vitro* models of Th differentiation, as evidenced by increased levels of IL-4 production (40,42,43). Furthermore, cells from lymph nodes and spleen hyperproliferated in response to different antigen stimulations (41). Likewise, CD4⁺ T cells hyperproliferated *in vitro* in response to anti-CD3 (40). On the other hand, targeted disruption of NFAT2 resulted in an embryonic lethal phenotype (9,15). Complementing RAG-1- or RAG-2-deficient blastocysts with homozygous NFAT2^{-/-} mutant ES cell lines demonstrated that T and B cells from chimeric mice showed reduced proliferation of peripheral lymphocytes when compared to wild-type mice (44,45). In an *in vitro* model of Th differentiation, the chimeric mice displayed a decreased production of IL-4 but normal production of IFN- γ , demonstrating an impaired Th2 response in NFAT2^{-/-} T cells (44,45). Taken together, the results observed in NFAT-deficient mice demonstrated that these transcription factors play an important role in Th differentiation, and suggest that NFAT1 and NFAT2 have opposite roles in regulating gene expression in Th cell activation and differentiation. However, the molecular basis of these effects remains to be identified.

Cell cycle entry is one of the first events that occur during lymphocyte activation. Upon T cell receptor (TCR) activation, naive T lymphocytes, which are in a quiescent stage, proliferate, differentiate and acquire their effector functions. It has been shown that T cell differentiation is dependent on the cell cycle entry (46,47). Although proliferation and differentiation of CD4⁺ T cells occur concomitantly during cellular activation, it is still not clear whether they are effectively interconnected. Reiner and colleagues (46) have argued that cell cycle is an impor-

tant regulator of Th differentiation. IL-4 and IFN- γ production by naive CD4⁺ T cells could only be detected after one and three rounds of cellular division, respectively, being blocked by cell cycle-arresting drugs (46). Furthermore, it has been suggested that DNA synthesis is essential for the acquisition of IL-4 production competence in activated CD4⁺ T cells, since it is blocked by specific drugs that prevent cell cycle progression to S phase, but not to G2/M phase (48). In contrast, it has been proposed that cell cycling only increases the frequency of cytokine-secreting cells, showing a correlation rather than dependence between cell cycle and differentiation (47,49). In fact, non-cycling cells are capable of IFN- γ secretion, suggesting that acquisition of competence to produce IFN- γ can be achieved without entering into S phase (49). Other studies have argued that cell cycle progression is fundamental to the commitment of a Th cell with its cytokine-secreting profile, including the heritable activation/silencing of lineage-defining players (50). Actually, the reversibility of Th1 and Th2 populations is lost along the increasing number of cellular divisions and after long-term stimulation (47). Moreover, it has been shown that T cell differentiation is associated with a dynamic process of histone acetylation and chromatin remodeling at regulatory regions of IL-4 and IFN- γ genes, suggesting that cell cycle could provide a window of opportunity to rearrange genes from an inactive to an active state (47,51).

As discussed before, NFAT1^{-/-} T cells show both hyperproliferation and increase in Th2 cytokine expression (40-42). However, it is still not clear whether the overexpression of Th2 cytokines, such as IL-4, is dependent on the hyperproliferative response observed in NFAT1^{-/-} T cells or both phenomena are independent. We have hypothesized that NFAT transcription factors coordinately regulate the expression of early-inducible genes that are involved in cell

cycle control, such as cyclin genes, and in Th1/Th2 differentiation, such as IFN- γ and IL-4 cytokines (3). It has been demonstrated that NFAT1 is able to bind to IFN- γ promoter regions and to the IL-4 enhancer in T cells stimulated under Th1 or Th2 conditions, respectively (51). Since TCR stimulation activates an immediate and global chromatin derepression program in naive T cells, it has been suggested that TCR-inducible transcription factors, such as the preexisting cytoplasmic NFAT1 protein, may bind to regulatory regions of these cytokine genes, initiating localized chromatin remodeling (51). Finally, we indicate here that NFAT proteins regulate central events during lymphocyte activation, such as cell proliferation and cytokine expression, and may represent an informative model to elucidate the real correlation between cell cycle and Th differentiation.

NFAT and malignant cell transformation

As we discussed until here, NFAT proteins are involved in a variety of cellular mechanisms, and thus represent broader controllers of cell growth and development of normal cells. Several studies have already demonstrated definitive evidence for the involvement of NFAT proteins in the regulation of cell cycle progression, cell differentiation and cell death in different tissues (3,6,52,53). These findings point to NFAT activation as an essential pathway in normal cell physiology, and therefore suggest that deregulation of NFAT signaling may occur during cellular aberrations and tumorigenic processes.

NFAT proteins have been shown to regulate cell cycle progression by modulating cyclin/CDK gene expression profile (3,4). In mouse models, deficiency of NFAT1 transcription factor caused hyperproliferative cellular responses, altered cell cycle control, and increased stage-specific cyclin expres-

sion in lymphocytes (3,40,41). NFAT1 protein also repressed the CDK4 gene in T cells, dictating cell cycle re-entry from quiescence (4). Out of the immune system, NFAT1 deficiency also led to uncontrolled cell growth and differentiation of the connective tissue and skeletal muscle cells (52,54). These results clearly implicate NFAT1 as a negative controller of early-inducible genes that regulate cell cycle progression and differentiation, and thus suggest a putative tumor suppressor role for this protein in different organ systems.

Although some members of the NFAT family are regulated in a similar way, they seem to play quite different effects during cellular responses. In contrast to NFAT1 effects, NFAT2 as well as NFAT3 and NFAT4 appear to function as inducers of cellular proliferation. NFAT2-deficient lymphocytes present a defect in B and T cell proliferation and an impaired repopulation of both thymus and peripheral lymphoid organs (44,45). Recently, Neal and Clipstone (6) have shown that NFAT2 protein controls cellular proliferation of adipocytes by regulating cell cycle-related genes. In skeletal muscle and endothelial cells, NFAT2 activation was also essential for cellular growth and cardiac morphogenesis, respectively (9,15,55). In accordance to NFAT2 data, several mouse models have elucidated the importance of NFAT3 and NFAT4 activation in smooth and skeletal muscle cell differentiation, indicating their role in blood vessels formation and angiogenesis (16,29). These results provide evidence for a positive regulatory role of NFAT2 transcription factor in cell cycle machinery and growth signal autonomy, revealing its oncogenic potential.

Another hallmark of tumorigenesis is the ability that cancer cells present to evade cell death. Programmed cell death by apoptosis occurs in virtually all cell types and is precisely regulated at the cellular and molecular levels. Many molecular players have been characterized to take part in the apoptotic

process, such as caspases, kinases and transcription factors. In fact, NFAT proteins have shown to bind to promoter regions and up-regulate the expression of some effectors of apoptosis, such as TNF- α and FasL (1). It seems that NFAT1 presents a pro-apoptotic role in T lymphocytes since cells lacking this protein showed a decreased expression of FasL and TNF- α and were resistant to apoptosis (53). Moreover, overexpression of some NFAT members in primary T cells led to increased rates of apoptosis (53). These results thus suggest that NFAT deregulation may rescue normal cells from apoptosis and enable tumor cell survival. Conversely, some reports have also indicated anti-apoptotic roles for NFAT members. Overexpression of the NFAT2 protein in adipocytes protected cells from undergoing apoptosis in response to growth factor withdrawal (6). Mice lacking NFAT4 presented impaired expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and increased thymocyte apoptosis during T cell development in the thymus (56). Also, NFAT1 showed to rescue lymphocytes from activated-induced cell death upon antigen stimulation *in vitro* (3). In spite of the controversial data discussed, NFAT proteins are known regulators of apoptotic mechanisms and may take part in tumor development by sustaining cell survival.

Besides indirect evidence, there is plenty of data demonstrating the effective participation of NFAT proteins in tumor-related processes. Several *in vitro* and also *in vivo* reports support NFAT transcription factors as essential targets for better understanding tumor progression pathways. In an elegant work, Neal and Clipstone (6) have investigated the role of NFAT2 in tumorigenesis. A constitutively active form of the NFAT2 protein expressed in the murine 3T3-L1 preadipocyte cell line was able to induce cell transformation and inhibit cell differentiation. Upregulated NFAT2 activity induced the acquisition of well-defined hallmarks of tumorigenesis, including: 1) loss of contact-

mediated growth inhibition, 2) reduced serum growth requirements, 3) protection from apoptosis, 4) formation of colonies in semi-solid media, 5) acquisition of growth autonomy, and 6) formation of tumors in athymic nude mice (6). Moreover, authors speculate that sustained NFAT2 activity *in vivo* could be achieved by the continuous presence of a soluble promitogenic/prosurvival factor, which establishes an autocrine regulatory growth loop and leads to cell autonomy. These results provide strong evidence for the oncogenic potential of NFAT2 transcription factor and elicit its participation during tumor progression *in vivo*. Still, the expression of functional NFAT2 has been also identified in proliferating glioma cells, a nervous system-derived cell line. In line with this, cyclosporin A inhibited the proliferation of these cells and induced apoptotic cell death in a dose-dependent manner (57). Thus, the correlation between the presence of NFAT proteins and the proliferative status of glioma cells might converge to the participation of NFAT transcription factors in the transformed glioma cell phenotype by regulating an autocrine growth factor stimulation.

The formation of new blood vessels, a process called angiogenesis, is also essential in tumor development, since it supplies oxygen and nutrients during late stages of tumorigenesis. NFAT proteins have been implicated in the regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by dictating the expression of cyclooxygenase-2, an enzyme that plays a pivotal role in neovascularization (2,21). A very recent data also suggest NFAT1 protein as a convergent factor during angiogenesis, since it regulates the balance between stimulatory and inhibitory angiogenic signals (7). Beyond angiogenic processes, NFAT proteins have also been related to cellular metastasis. Rao and colleagues (58) have linked the integrin-signaling pathway to the activation of NFAT1 and NFAT5 proteins, which induced carcinoma invasion of cell lines derived from

human breast and colon cancer. Integrins are extracellular matrix ligand receptors widely described as controllers of tumor invasion and migration. These results have highlighted NFAT proteins as relevant players in promoting tumor metastasis.

It is evident the involvement of NFAT transcription factors during tumorigenic processes (Figure 2). In accordance, antagonists of NFAT proteins inhibit tumor formation, supporting an oncogenic potential for these family of transcription factors (59). When binding to promoter regions and regulating gene expression, NFATs have shown to cooperate with several protooncogene products, such as c-Fos, c-Jun (AP-1), and Egr

proteins (1,60). These interactions may result in transcriptional activators or repressors in different moments (Figure 1). However, the subset of genes regulated by NFAT proteins and its importance during the different stages of tumor progression remain to be elucidated. Strong effort must focus on clarifying this still puzzling participation of NFATs during tumorigenesis.

Final remarks

NFAT transcription factors act as ubiquitous regulators of gene expression during cellular activation. NFAT proteins have diverse effects not only on cytokine expression, but also on cell cycle entry and apoptosis. Cumulative evidence has recently demonstrated that NFAT transcription factors exert important roles in the physiology of different cell types, and not only in cells related to the immune system. As such, NFAT has the potential to participate in malignant cell transformation related to cancer. As we discussed here, NFAT proteins regulate genes involved in cell cycle control, cell death and angiogenesis. Given the importance of these phenomena in the development of cell malignancies, it is of considerable interest to understand the mechanisms by which NFAT affects cell growth, differentiation and function. Finally, understanding more about the cell cycle regulation by NFAT proteins is central to precisely indicate the involvement of these transcription factors in malignant cell transformation and oncogenic processes.

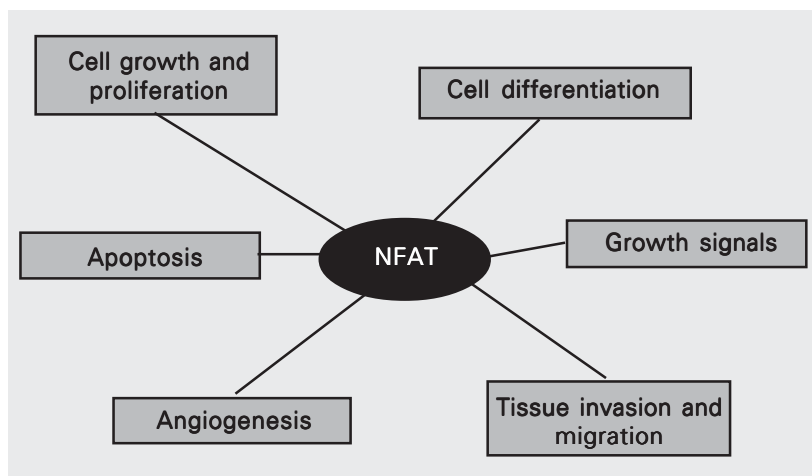


Figure 2. Tumor-related processes regulated by NFAT transcription factors. NFAT proteins have shown to directly regulate the expression of genes related to cellular proliferation (e.g., CDK4) and differentiation (e.g., cytokines and growth factors), apoptosis (e.g., FasL), angiogenesis (e.g., cyclooxygenase-2) and tissue invasion mechanisms among others. NFAT = nuclear factor of activated T cells.

References

1. Rao A, Luo C & Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology*, 15: 707-747.
2. Hernández GL, Volpert OV, Íñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M & Redondo JM (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medicine*, 193: 607-620.
3. Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA & Viola JPB (2002). NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB Journal*, 16: 1940-1942.
4. Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF & Burakoff SJ (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Molecular Cell*, 10: 1071-1081.

5. Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M & Crabtree GR (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, 113: 657-670.
6. Neal JW & Clipstone NA (2003). A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17246-17254.
7. Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T & Volpert O (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *Journal of Experimental Medicine*, 199: 1513-1522.
8. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA & Crabtree GR (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241: 202-205.
9. Macian F, Lopez-Rodriguez C & Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, 20: 2476-2489.
10. McCaffrey PG, Luo C, Kerppola TK et al. (1993). Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science*, 262: 750-754.
11. Luo C, Burgeon E, Carew JA, Badalian TM, McCaffrey PG, Lane WS, Hogan PG & Rao A (1996). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates the transcription of several cytokine genes. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 3955-3966.
12. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A & Crabtree GR (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, 369: 497-502.
13. Ho SN, Thomas DJ, Timmerman LA, Li X, Francke U & Crabtree GR (1995). NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 19898-19907.
14. Masuda E, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K-I & Arai N (1995). NFATx, a novel member of the NFAT family that is expressed predominantly in the thymus. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 2697-2706.
15. Crabtree GR & Olson EN (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 (Suppl): S-67-S-79.
16. Horsley V & Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *Journal of Cell Biology*, 156: 771-774.
17. Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG & Rao A (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 4138-4145.
18. Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A & Hogan PG (1995). Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92: 11205-11209.
19. Loh C, Shaw KTY, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA & Rao A (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 10884-10891.
20. Baksh S, DeCaprio JA & Burakoff SJ (2000). Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase. *Oncogene*, 19: 2820-2827.
21. Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM & Fresno M (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 23627-23635.
22. Koepp DM, Harper JW & Elledge SJ (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97: 431-434.
23. Sherr CJ & Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*, 13: 1501-1512.
24. Ren S & Rollins BJ (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117: 239-251.
25. Ohtani K, DeGregori J & Nevins JR (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92: 12146-12150.
26. Murray AW (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116: 221-234.
27. Anraku Y, Ohya Y & Iida H (1991). Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1093: 169-177.
28. Tomono M, Toyoshima K, Ito M & Amano H (1996). Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochemical Journal*, 317: 675-680.
29. Lipskaia L & Lompré AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the Cell*, 96: 55-68.
30. Terada N, Lucas JJ & Gelfand EW (1991). Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *Journal of Immunology*, 147: 698-704.
31. Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H & Kiss Z (1998). Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353: 374-378.
32. Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L & Dotto GP (2001). Cross talk among calcineurin Sp1/Sp3 and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98: 9575-9580.
33. Abbas AK, Murphy KM & Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.
34. Constant SL & Bottomly K (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annual Review of Immunology*, 15: 297-322.
35. Zheng W & Flavell RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89: 587-596.
36. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG & Glimcher LH (2000). A novel transcription factor T-bet directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100: 655-669.
37. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST & Grusby MJ (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4: 313-319.
38. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T & Grusby MJ (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382: 174-177.
39. Rincon M & Flavell RA (1997). T-cell subsets: transcriptional control in the Th1/Th2 decision. *Current Biology*, 7: R729-R732.
40. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ & Glimcher LH (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*, 4: 397-405.
41. Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T & Rao A (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272: 892-895.
42. Kiani A, Viola JPB, Lichtman AH & Rao A (1997). Downregulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving the transcription factor NFAT1. *Immunity*, 7: 849-860.

43. Viola JPB, Kiani A, Bozza PT & Rao A (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, 91: 2223-2230.
44. Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby M & Glimcher LH (1998). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity*, 8: 125-134.
45. Yoshida H, Nishina H, Takimoto H et al. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity*, 8: 115-124.
46. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang C-R & Reiner SL (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*, 9: 229-237.
47. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW & Locksley RM (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, 14: 205-215.
48. Richter A, Löhning M & Radbruch A (1999). Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *Journal of Experimental Medicine*, 190: 1439-1450.
49. Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J & Paul WE (2001). Cell division is not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN- γ or IL-4. *Journal of Immunology*, 166: 112-120.
50. Mullen AC, Hutchins AS, Villarino AV, Lee HW, High FA, Cereb N, Yang SY, Hua X & Reiner SL (2001). Cell cycle controlling the silencing and function of mammalian activators. *Current Biology*, 11: 1695-1699.
51. Avni O, Lee D, Macian F, Szabo S, Glimcher L & Rao A (2002). Th cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunology*, 3: 643-651.
52. Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravalles EM, Glimcher MJ & Glimcher LH (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 191: 9-22.
53. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D et al. (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity*, 16: 881-895.
54. Horsley V & Pavlath GK (2003). Prostaglandin F $_{2\alpha}$ stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *Journal of Cell Biology*, 161: 111-118.
55. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN & Rosenthal N (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*, 400: 581-585.
56. Oukka M, Ho IC, De la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ & Glimcher LH (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9: 295-304.
57. Mosieniak G, Figiel I & Kaminska B (1997). Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *Journal of Neurochemistry*, 68: 1142-1149.
58. Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A & Toker A (2002). The role of NFAT transcription factor in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology*, 4: 540-544.
59. Jiang H, Yamamoto S, Nishikawa K & Kato R (1993). Anti-tumor-promoting action of FK506 a potent immunosuppressive agent. *Carcinogenesis*, 14: 67-71.
60. Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczeck RA, Ashwell JD & Glimcher LH (2000). Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*, 12: 293-300.