

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

CARLA CRISTINE CRUDE DOS SANTOS

**Ação de agonistas da via Wnt/ β -catenina em células T
CD4+ murinas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

SÃO PAULO

2015

CARLA CRISTINE CRUDE DOS SANTOS

**Ação de agonistas da via Wnt/ β -catenina em células T
CD4+ murinas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Carla Cristine Crude dos

Ação de agonistas da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ murinas / Carla Cristine Crude dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Edecio Cunha Neto.

Descritores: 1.Proteínas Wnt 2.beta catenina 3.Homeostase 4.Linfócitos T 5.Lítio 6.Quinase 3 da glicogênio sintase 7.Expressão gênica 8.Via de sinalização Wnt

USP/FM/DBD-134/15

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela oportunidade de realizar esta etapa tão sonhada em minha vida.

Agradeço em segundo lugar ao meu querido orientador, Edecio Cunha Neto, por me apoiar e me ajudar sempre. Ele é responsável por tudo de bom e é claro de complicado que a realização deste mestrado trouxe para minha vida e pelo grande aprendizado. Ele me ensinou e foi super paciente comigo. Muito obrigada professor! Serei eternamente grata pelo que fez por mim e pelos 4 anos de mestrado.

Agradeço à minha família por ter me mantido emocionalmente e financeiramente durante este período. Mãe e pai, vocês foram meu alicerce e se hoje cheguei até aqui vocês tem uma participação imprescindível. Irmãzinha querida obrigada pelas orações e pelo carinho. Tia Soeli, obrigada por me apoiar, você é uma das razões pela qual estou completando esta fase.

Não posso deixar de agradecer meu grande amor, Guilherme, que surgiu em minha vida em uma momento difícil, e me apoiou principalmente na fase final com muita, muita paciência.

Aos amigos do LIM60, sou extremamente grata, pela companhia ao longo destes anos, pelas noites no laboratório, pela ajuda com os experimentos intermináveis e gigantes que eu fazia. Muito obrigada pessoal! Em especial preciso deixar meu agradecimento aos meus amigos Priscilla, Lucas e Day (grupo bandeijão) que ficarão no meu coração para sempre. E é claro, ao Luizinho que me ajudou com os bichinhos que eu morria de medo.

Por último deixo meu agradecimento à todos que indiretamente participaram da realização deste projeto!

"Para a maioria, quão pequena é a porção de prazer que basta para fazer a vida agradável"

Friedrich Nietzsche

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. VIA WNT/B-CATENINA	1
1.2. VIA WNT/B-CATENINA E HOMEOSTASE DE CÉLULAS T.....	14
1.3. POLARIZAÇÃO DE CÉLULAS TCD4+.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. HIPÓTESE.....	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. GERAL	24
4.2. ESPECÍFICOS.....	24
5. DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
6. METODOLOGIA	27
6.1. INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIA WNT/B-CATENINA	27
6.1.1. <i>Cultura de esplenócitos totais</i>	27
6.1.2. <i>Cultura de linfócitos T CD4+ purificados</i>	27
6.2. INDUÇÃO <i>IN VIVO</i> DA VIA WNT/B-CATENINA	27
6.2.1. <i>Tratamento agudo</i>	27
6.2.2. <i>Tratamento crônico</i>	28
6.3. OBTENÇÃO DE ESPLENÓCITOS.....	28
6.4. OBTENÇÃO DE CÓRTEX E HIPOCAMPO	29
6.5. MEDIDA DA LITEMIA	29
6.6. PURIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+	29
6.6.1. <i>Avaliação da pureza após separação negativa de linfócitos T CD4+</i>	30
6.7. EXPRESSÃO GÊNICA	30
6.7.1. <i>Extração e quantificação de RNA</i>	30
6.7.2. <i>Transcrição reversa de RNA</i>	31
6.7.3. <i>Desenho de primers</i>	31
6.7.4. <i>Quantificação relativa por qRT-PCR</i>	32
7. RESULTADOS	33
7.1. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	33
7.1.1. <i>TRATAMENTO AGUDO COM LiCl (GAVAGEM)</i>	33
a. <i>Córtex e Hipocampo (controles positivos)</i>	33
b. <i>Esplenócitos e células T CD4+</i>	37
7.1.2. <i>TRATAMENTO CRÔNICO COM Li₂CO₃ (RAÇÃO)</i>	41
a. <i>Córtex e Hipocampo (controles positivos)</i>	41
b. <i>Esplenócitos e células T CD4+</i>	42
7.2. CORRELAÇÕES	43
7.3. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	47

7.3.1.	<i>CÉLULAS HEK293</i>	47
7.3.2.	<i>ESPLENÓCITOS</i>	47
7.3.3.	<i>CÉLULAS T CD4+</i>	52
8.	DISCUSSÃO	57
9.	CONCLUSÃO	68
10.	BIBLIOGRAFIA	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5TGM1	Linhagem celular 1 de mieloma murino
ACK	Ammonium-Chloride-Potassiumpara
AD	Doença de Alzheimer
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALL	Leucemia Linfoblástica aguda
APC	Adenomatous polyposis coli
APP	Amyloid precursor protein
AXIN1	Axis inhibition protein 1
BAEC	Células epiteliais aórticas bovina
BCL9	B-cell lymphoma 9
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BIO	2',3'E-6-bromoindirubin-3'-oxime
BPNT	Nucleotidase-3 bifosfato
BRG1	Brahma-related gene 1
C/EBPs	Ehancer binding protein
C57BL6	Camundongo C57 Black 6
CBP	Proteína ligadora do elemento de resposta Camp
cDNA	DNA complementar
CH	CHIR-99021
CHO-IR	Chinesse hamster ovary cells overexpressing insulin receptor
CK1α	Caseine kinase 1 α
CLASP-2	Cytoplasmic linker associated protein 2

COX	Ciclo-oxigenase
CREB	cAMP response element-binding protein
CRMP	Collapsin response mediator protein 1
CTBP	Proteína de ligação do C-terminal
Cx43	Conexina 43
DKK1	Dickkopf homólogo 1
DVL	Dishevelled
DSCR1	Down syndrome critical region gene 1
ECSs	Células tronco embrionárias
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
FZD	Frizzled
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GRG/TLE	Groucho/transducin-like enhancer
GSK-3β	Glicogênio sintase quinase 3 β
H4IIE	Linhagem celular de hepatoma de rato
HBx	Proteína X do vírus da hepatite B
HCC	Hepatocellular carcinoma cells
HDAC	Histona deacetilase
HDND-7	Hesperetin derivative-7
HEK293	Células embrionárias humanas de rim
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
HIG2	Gene inductor de hypoxia
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HT-22	Células neuronais do hipocampo

I.P	Injeção intrapritoneal
ICAT	Inibidor da β -catenina/TCF
IGFBP-1	Fator de crescimento semelhante a insulina ligante à proteína 1
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IMPAs	Inositol monofosfatase
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
J1mESC	Células tronco embrionárias pluripotentes J1
LEF	Fator estimulador de linfócitos
LGS	Legless
Li₂CO₃	Carbonato de lítio
LiCl	Cloreto de Lítio
LRP5/6	Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5
LTNP	Progressores lentos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MAPs	Microtubule-associated proteins
MARK	Microtubule-affinity-regulating-kinase protein

MSC80	Linhagem celular de Schwann
MSCs	Células-tronco mesenquimais
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NGF	Fator de crescimento neuronal
NGN2	Neurogenin-2
OPG	Osteoprotegerina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfatase
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PC-3	Células de câncer de próstata
PDK-1	Piruvato desidrogenase quinase
PI	Fosfatidilinositol
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PP1G	peptidylprolyl isomerase G
PYGO	Pygopus
qRT-PCR	Reação em cadeia polimerase
RMICs	Células intersticiais da medula renal
SB	SB-216763
SFRP1	Proteína secretada relacionada ao receptor Frizzled 1
SFRP5	Proteína secretada relacionada ao receptor Frizzled 5
SGZGCL	Subgranular zone-granule cell layer

SkMs	Mioblastos esqueléticos
SLE	Lúpus eritematoso sistêmico
SNC	Sistema Nervoso Central
ST	Pacientes HIV+ sob terapia antiretroviral
STATs	Transdutor de sinal e ativadores de transcrição
TA	Temperatura ambiente
TCF	Fator de célula T
Tfh	Célula T folicular helper
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Célula T helper 1
Th17	Célula T helper 17
Th2	Célula T helper 2
TM	Temperatura de melting
TNKs	Tanquirases
Treg	Célula T reguladora
VHL	Von Hippel–Lindau
WB	Western Blotting
WIF	Fator inibitório de Wnt
Wnt	Wingless
WRE	Elemento de resposta a Wnt
β-TRCP	β - transducin repeat-containing protein

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ativação da via Wnt/ β -catenina com sais de lítio.	11
Tabela 2: Efeitos Biológicos da ativação da via Wnt/ β -catenina.	12
Tabela 3: Ativação da via Wnt/ β -catenina com inibidores específicos.....	13
Tabela 4: Efeitos Biológicos da ativação da via Wnt/ β -catenina.	13
Tabela 5: Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via Wnt dependente de β -catenina/TCF.	3
Figura 2. Representação esquemática dos diferentes alvos moleculares de lítio.	7
Figura 3. PBMC de pacientes LTNP apresentam expressão aumentada de HIG2.....	15
Figura 4. Tratamento com HIG2, LiCl e TCR/CD28 ativa a via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ humanas.....	16
Figura 5. Função da via Wnt/ β -catenina durante a diferenciação de células T periféricas.	22
Figura 6. Esquema de tratamento in vitro de esplenócitos e células T CD4+ purificadas com inibidores de GSK3 β	25
Figura 7. Esquema de tratamento agudo dos camundongos com LiCl.	26
Figura 8. Esquema de tratamento crônico dos camundongos com Li ₂ CO ₃	26
Figura 9. Medida da litemia no sangue periférico de camundongos após tratamento com sais de lítio.	34
Figura 10. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Hipocampo após gavagem.....	35
Figura 11. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Córtex após gavagem..	36
Figura 12. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Esplenócitos totais após gavagem.....	38
Figura 13. Estratégia de análise de citometria para avaliação do grau de pureza da separação de células T CD4+ derivadas de esplenócitos totais.....	39
Figura 14. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Células T CD4+ purificadas, após gavagem.....	40
Figura 15. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Hipocampo e Córtex após tratamento crônico com Li ₂ CO ₃	41
Figura 16. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Esplenócitos e Células T CD4+ após tratamento crônico com Li ₂ CO ₃	42

Figura 17. Correlação entre a expressão gênica em hipocampo e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl.	43
Figura 18. Correlação entre a expressão gênica em córtex e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl.	44
Figura 19. Correlação entre a expressão gênica em esplenócitos e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl.	45
Figura 20. Correlação entre a expressão gênica em células T CD4+ putificadas e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl.	46
Figura 21. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células HEK após estímulo <i>in vitro</i> com SB e LiCl. Células HEK foram estimuladas com diferentes concentrações de SB e LiCl por 24 horas.	48
Figura 22. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo <i>in vitro</i> com LiCl.	49
Figura 23. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo <i>in vitro</i> com SB.	50
Figura 24. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo <i>in vitro</i> com CHIR.	51
Figura 25. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo <i>in vitro</i> com LiCl.	53
Figura 26. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo <i>in vitro</i> com SB.	54
Figura 27. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo <i>in vitro</i> com CHIR.	55
Figura 28. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo <i>in vitro</i> com LiCl ou antiCD3/CD28.	56

RESUMO

Santos CCC. *Ação de agonistas da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ murinas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A via canônica Wnt/ β -catenina regula várias funções em vertebrados, incluindo diferenciação de células T, bem como a proliferação, sobrevivência, morfogênese e migração de vários tipos celulares. As células T CD4+ é fundamental para a competência imunológica. Foi observado pelo nosso grupo que células T CD4+ humanas apresentam ativação da via Wnt/ β -catenina após tratamento com sais de lítio ou outros agonistas da via. A ativação desta via induziu a proliferação de células T CD4+ naive e de memória central. Em conjunto, estes dados sugerem um importante papel da via Wnt/ β -catenina na homeostase de células T CD4+ humanas. Seria importante avaliar o papel da via Wnt/ β -catenina nas células do sistema imune no modelo murino, já que pouco se sabe sobre seu efeito na homeostase de células T CD4+ murinas. A ativação da via Wnt/ β -catenina pode ser induzida com inibidores da proteína Glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), por exemplo, os sais de lítio (LiCl e Li₂CO₃) e inibidores específicos (SB, CHIR) em vários tipos celulares. Neste trabalho, avaliamos o efeito de inibidores de GSK3 β na ativação da via Wnt/ β -catenina canônica em esplenócitos e células T CD4+, através da realização de experimentos in vivo e in vitro, avaliando a expressão de seus genes alvo *HIG2*, *Bcl-xL*, *Ciclina D1* e *c-myc*. Verificou-se que o tratamento in vivo agudo (2-12 h após a administração) ou crônico (administração diária por 30 dias) de camundongos não é capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina in vivo em células esplênicas e células T CD4+, embora o mesmo tratamento induza a expressão dos genes alvo da via no tecido cerebral (córtex e hipocampo). Além disso, também não foi possível verificar ativação da via em esplenócitos e células T CD4+ após tratamento in vitro das mesmas com LiCl ou os inibidores específicos de GSK3 β testados (CHIR99021, SB-216763), embora essa ativação tenha sido observada na linhagem celular HEK293. Nossos resultados sugerem que a via Wnt/ β -catenina (canônica) não é induzível em células T CD4+ murinas maduras, com os agonistas testados. Isso pode ter implicações fisiológicas, por exemplo sobre a homeostase de células T CD4+, já que a proliferação homeostática de células T, influenciada em humanos pela via Wnt/ β -catenina, é menos importante em camundongos.

Descritores: Proteínas Wnt, beta Catenina, Homeostase, Linfócitos T, Lítio, Quinase 3 da Glicogênio Sintase, Expressão Gênica, Via de Sinalização Wnt

ABSTRACT

Santos CCC. *Role of Wnt/ β -catenin pathway in murine CD4 T cells* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

The Wnt/ β -catenin pathway regulates many functions in vertebrates, including T cell differentiation, as well as proliferation, morphogenesis and migration in different cell types. CD4⁺ T cells play a fundamental role for immunological competence. Our group has observed that human CD4⁺ T cells present activation of the Wnt/ β -catenin pathway after treatment with lithium salts or other pathway agonists. The activation of this pathway induced proliferation in naive and central memory CD4⁺ T cells. Together, these results suggest an important role for the Wnt/ β -catenin pathway in the homeostasis of human CD4⁺ T cells. It would be very important to evaluate the role of the Wnt/ β -catenin pathway in T cells in the mouse model, since little is known about its effect in mice CD4⁺ T cell homeostasis. The activation of the Wnt/ β -catenin pathway may be induced with Glycogen Synthase Kinase 3B (GSK3 β) inhibitors, i.e., lithium salts as mentioned above, and specific GSK3 β inhibitors (SB, CHIR) in different cell types. In this work, we evaluated the effect of GSK3 β inhibitors in the activation of the canonical Wnt/ β -catenin in splenocytes and CD4⁺ T cells, by conducting experiments in vivo and in vitro, evaluating the expression of its target genes *HIG2*, *Bcl-xL*, *Cyclin D1* and *c-myc*. We verified that acute (2-12 hours after administration) or chronic (daily administration for 30 days) treatment of mice with lithium salts is not able to activate the Wnt/ β -catenin pathway in splenocytes and CD4⁺ T cells, although we could observe activation in brain tissues (cortex and hypothalamus). Besides, no activation of the Wnt/ β -catenin pathway was observed in these cell types after in vitro treatment with LiCl or the specific inhibitors of GSK3 β (CHIR99021, SB-216763), while the pathway was activated by the same treatments in HEK293 cells. Our results suggest that the Wnt/ β -catenin pathway is not inducible in murine mature CD4⁺ T cells with the tested agonists. This may have physiological implications, for instance on the homeostasis of CD4⁺ T cells, where homeostatic proliferation - influenced the Wnt/ β -catenin pathway in human T cells - is less important in the maintenance of the murine peripheral T cell pool.

Descriptors: Wnt proteins, beta Catenin, Homeostasis, T-Lymphocytes, Lithium, Glycogen Synthase Kinase 3, Gene Expression, Wnt Signaling Pathway

1. INTRODUÇÃO

1.1. Via Wnt/ β -catenina

A via Wnt/ β -catenina regula várias funções em vertebrados, tendo um papel crucial a proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular, regulando a homeostase, além de um papel muito importante nos processos de desenvolvimento do organismo (1-3). Perturbações no funcionamento da via Wnt/ β -catenina já foram descritas em diversas doenças como câncer (4-6), anormalidades ósseas (7), doenças metabólicas (8), doenças neurodegenerativas como Alzheimer (9), esquizofrenia (9-11), Parkinson (12) e distúrbios psiquiátricos (13) e doenças autoimunes como, artrite reumatóide (14) e colite (15).

A ativação da via Wnt/ β -catenina já foi demonstrada extensivamente em diferentes modelos. Ensaios *in vitro* mostram que esta via pode ser induzida em várias células utilizando diferentes agonistas, dentre eles, a proteína purificada Wnt5a em células HEK293 (células 293 embrionárias humanas do rim) (16), Wnt3 em linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL) (17), LiCl em mioblastos (18), células tronco hematopoiéticas(19) BIO (inibidor específico de GSK3), em células tronco embrionárias de camundongos (20) e em linfócitos do baço (21), dentre outros.

A proteína Wnt, um dos primeiros agonistas descritos (ou agonista natural/fisiológico) da via Wnt/ β -catenina, tem o nome derivado da abreviação de dois genes homólogos, o primeiro gene descoberto, o gene *INT-1* do camundongo (22) e o gene *Wingless* da *Drosophila*, descoberto 5 anos depois (23). O processo desencadeado pela ligação das proteínas Wnt a diferentes receptores da família *Frizzled* (FZD) resulta na ativação de três vias de sinalização intracelulares distintas: a via canônica Wnt/ β -catenina, as vias Wnt não canônicas, *Planar Cell Polarity* (PCP), responsável pelo reorganização citoesquelética (24) e a Wnt/ Ca^{2+} que eleva os níveis citoplasmáticos de

Ca²⁺. Existem mais de 19 proteínas Wnt e mais de 19 receptores e co-receptores, distribuídos em sete famílias de proteínas diferentes, que combinam-se entre si para ativação destas vias. As proteínas Wnt1, 2, 3, 3A, 8A, 8B, 10A e 10B são responsáveis pela ativação da via canônica Wnt/ β -catenina; Wnt4, 5B, 6, 7A, 7B e 11 são responsáveis pela ativação da via Wnt/Ca²⁺ e as proteínas Wnt5A e 11 pelas via PCP. Além das proteínas Wnts, outros fatores, como *R-spondin*, também são capazes de regular a ativação das vias Wnt (25, 26).

Para ativação da via canônica Wnt/ β -catenina, proteínas Wnts se ligam ao receptor *frizzled* (FZD) e ao co-receptor LRP5/6 (proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5/6) resultando na ativação e recrutamento da proteína *Dishevelled* (DVL) para membrana celular, onde se acopla à FZD e LRP5/6. A proteína DVL promove a fosforilação de LRP5/6 pelas quinases CK1 (caseína quinase 1) e GSK3 β (Glicogênio sintase quinase 3), permitindo que a proteína AXIN1 (*axis inhibition protein 1*) desligue-se do complexo de destruição e ligue-se à LRP5/6. O complexo de destruição intracitoplasmático formado pelas proteínas AXIN1, APC (*Adenomatous polyposis coli*), CKI-a (Caseína quinase 1 α) e GSK3 β , que é responsável por direcionar a β -catenina para degradação no proteossoma, desmonta-se e assim a β -catenina não é fosforilada e se acumula no citoplasma da célula. Portanto, as formas de GSK3 β que são capazes de estimular a via Wnt/ β -catenina são àquelas associadas à membrana plasmática juntamente com FZD e LRPs. A β -catenina não fosforilada pode então migrar para o núcleo da célula, onde se ligará a fatores de transcrição da família TCF/LEF (fator de célula T/Fator estimulador de linfócitos), responsáveis pela transcrição, juntamente com seus co-ativadores de diferentes genes alvos resultantes da ativação da via, como HIG2, Bcl-xL, Ciclina D1 e C-myc (**Figura 1b**). Por outro lado, na ausência da ligação da proteína Wnt ao seu receptor FZD, as quinases GSK3 β e CK1

permanecem ativadas e fosforilam, dentre outros alvos, a β -catenina, criando um sítio de reconhecimento para a proteína β TRCP (*β -transducin-repeat-containing protein*). A β -catenina fosforilada é ubiquitinada e degradada pelo proteossoma, e assim a via permanece desativada. No núcleo, o fator de transcrição TCF monta um complexo repressor que inibe a expressão dos genes alvo da via (**Figura 1a**) (25-28).

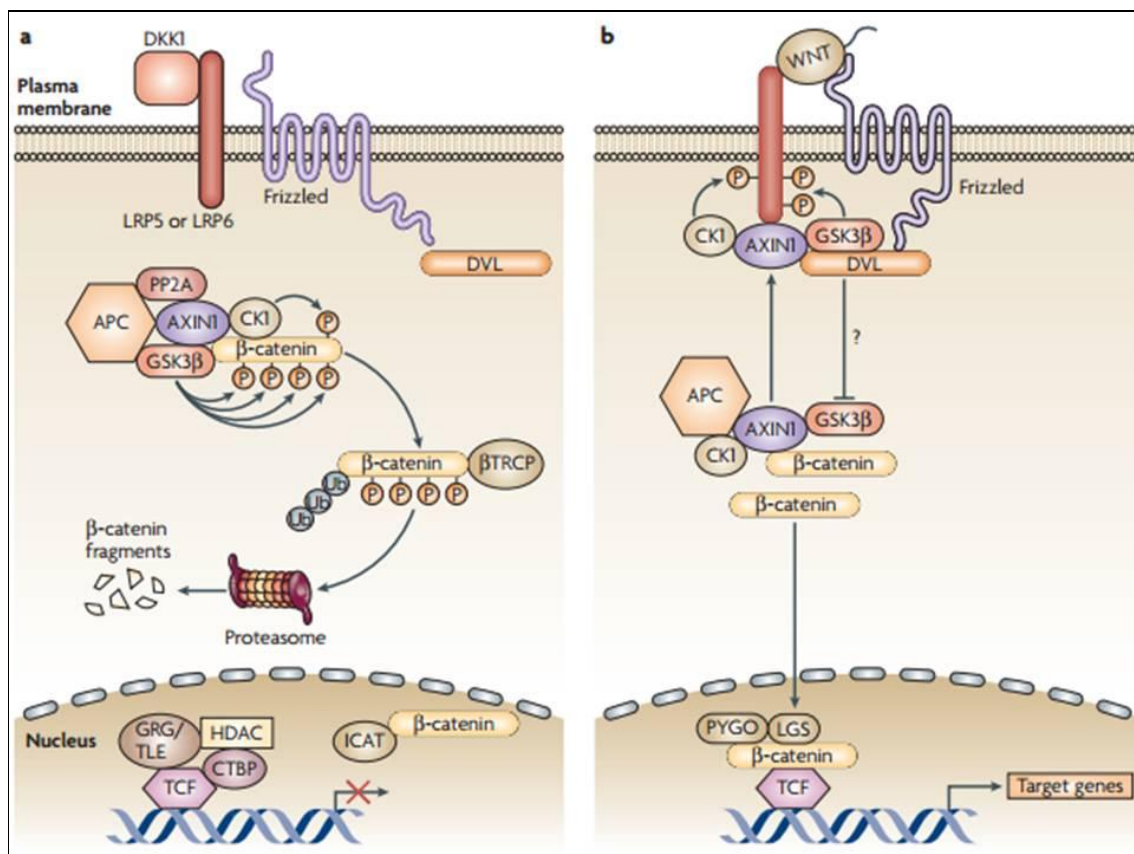


Figura 1. Via Wnt dependente de β -catenina/TCF. **a)** Na ausência de sinalização, níveis de β -catenina no citoplasma e núcleo da célula são baixos, como resultado de sua fosforilação por CK1/GSK3 β , que conduz à ligação de β TRCP, ubiquitinação e degradação pelo proteossoma. O complexo de destruição é composto de CK1 e GSK3 β , AXIN1 e APC. No núcleo, moléculas de TCF são limitadas por co-repressores, como GRG/TLE (*Groucho/transducin-like enhancer*). Outros componentes do complexo repressor incluem CTBP (proteína de ligação do C-terminal) e HDAC (histona-desacetilases). β -catenina no núcleo é inibida pela ligação de ICAT (inibidor de β -catenina/TCF). O complexo receptor FZD-LRP5/6 também pode ser inibido por inibidores solúveis ligados ao receptor, como DKK1 (*Dickkopf* homólogo 1). **b)** Após a ligação de uma proteína Wnt ao receptor, LRP é fosforilada por CK1 e GSK3 β e AXIN1 é recrutada para a membrana plasmática. As quinases do complexo de destruição são inativadas e a β -catenina transloca-se para o núcleo para formar um complexo transcricional ativo com TCF e ligar-se a co-fatores, tais como *legless* (LGS, também conhecido como BCL9) e *Pygopus* (PYGO), CBP/p300, *brahma* e MED12 para iniciar a transcrição. DVL, homólogo de mamífero de *Drosophila Dishevelled*; PP2A, proteína fosfatase 2A (26).

Com relação aos genes alvo da via Wnt/ β -catenina, o gene HIG2, um dos produtos finais da ativação da via Wnt/ β -catenina e identificado em trabalhos anteriores do grupo, é um gene induzível por hipóxia e codifica uma proteína pequena de 6,5 kDa. O aumento de HIG2 já foi detectado em vários tipos de câncer (29-31) e funciona como marcador do estado de pluripotência de células cancerígenas (32). Foi demonstrado que a expressão de HIG2 aumenta após a ativação da via Wnt/ β -catenina e que além ser secretado, ele pode se ligar ao receptor FZD e ativar a via, mantendo assim uma alça de retroalimentação positiva em células de nefrocarcinoma (33). Além disso, a presença deste gene facilita a progressão para câncer de colo-retal de forma dependente e independente de hipóxia (34).

Com relação ao gene alvo Bcl-xL, verifica-se que na presença de altos níveis de β -catenina, há um aumento nos níveis de Bcl-xL (35). Ademais, em miocárdio de indivíduos doentes, verificou-se que a ativação da via Wnt/ β -catenina, bem como a expressão de Bcl-xL, é atenuada pelo aumento da expressão de 2 antagonistas endógenos da via (sFRPs 3 e 4) (36). Além disso, o ácido ursólico que tem papel importante em vários tipos de cânceres e tem o potencial de inibir a via Wnt/ β -catenina em células PC-3, suprime a expressão de Bcl-xL. Este efeito foi revertido com a utilização de inibidores de GSK3 β (37).

Outros dois genes alvo transcritos após ativação da via Wnt/ β -catenina, que foram testados neste trabalho, são os genes Ciclina D1 e c-myc. A ciclodepsipeptídeo, Destruína B, isolada do fungo *Metarhizium anisopliae* (38), inibe a via Wnt/ β -catenina em HCC, diminuindo a expressão de Ciclina D1 e c-myc (39). Na fibrose hepática, verificou-se que o HDND-7, flavonona extraída de frutas, diminui a expressão de β -catenina e conseqüentemente de Ciclina D1 e c-myc, atenuando o processo de fibrose pela ativação da via Wnt/ β -catenina (40). Ademais, o silenciamento de β -

catenina utilizando-se siRNA inibiu a expressão de c-myc em células de câncer de mama (41).

A proteína β -catenina localiza-se em junções de aderência célula-célula, no citoplasma e no núcleo. Outras vias de sinalização podem modular a β -catenina, como as vias do HGF (fator de crescimento dos hepatócitos), das prostaglandinas, da PKA (proteína quinase A), E-caderina e de hipóxia. No núcleo a β -catenina atua em conjunto com outros fatores de transcrição, além do TCF/LEF, como FOXOs e receptores nucleares como SOX e SMAD (2). Com relação ao fator de transcrição TCF, principal ligante da β -catenina, existem mais de 8 isoformas de TCF que se ligam diferentemente à β -catenina. Essas isoformas são formadas por splicing alternativo e em geral as isoformas longas se ligam a β -catenina, mas as isoformas pequenas não podem fazê-lo e funcionam como repressores da via Wnt/ β -catenina (26).

A GSK3, proteína intermediária da via Wnt/ β -catenina, inibida no processo de ativação da via, é uma serina/treonina quinase que existe em duas isoformas diferentes, GSK3 α e GSK3 β , com pesos moleculares de 51 e 46 kDa, respectivamente, sendo a GSK3 β o principal alvo terapêutico da ação do LiCl (42). A ação da proteína GSK3 não se restringe somente a via Wnt/ β -catenina, é uma proteína com papel muito importante em diferentes vias de sinalização, por exemplo a via da insulina e a via Hedgehog (43). Ademais foi demonstrado que fatores de crescimento, aminoácidos e estresse celular são capazes de inibir a GSK3, reduzindo a fosforilação dos seus substratos; já as semaforinas são capazes de ativar a GSK3 e aumentar a fosforilação dos substratos (44).

Os substratos modulados pela GSK3 estão relacionados à diferentes setores, dentre eles, a síntese de glicogênio, ações endócrinas, via da insulina, fatores de crescimento e sobrevivência, neurônios, desenvolvimento e imunidade inata/adaptativa. Alguns substratos regulados em cada um destes setores são: fatores de transcrição

CREB (*cAMP response element-binding protein*) e C/EBP (*Enhancer binding protein*) responsivos à alguns hormônios; inibidor 2, PPIG (*peptidylprolyl isomerase G*) e IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*), intermediários da via da Insulina; fatores de crescimento Bcl3, c-jun, mcl-1, mdm2, c-myc, p130, pten, HSF-1, H1F, eIF2B, PC2, VDAC, CTPS, FAK; proteínas envolvidas na formação de microtúbulos (tau, dinamina I, Ngn2 (*Neurogenin-2*), CRMP (*Collapsin response mediator protein 1*), MAPs (*microtubule-associated proteins*), VHL (*Von Hippel–Lindau*) e CLASP-2 (*Cytoplasmic linker associated protein 2*); proteínas envolvidas na doença de Alzheimer (AD), como a tau, APP (*Amyloid precursor protein*), CRMP, MARK (*microtubule-affinity-regulating-kinase protein*) e DSCR1 (*Down syndrome critical region gene 1*); proteínas das vias Wnt/ β catenina, Hedgehog e EMT (*Epithelial–mesenchymal transition*), envolvidas no processo de desenvolvimento; além de intermediários da imunidade inata e adaptativa, como IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IL-10, NFAT, C/EBP β e CREB (44).

O mal funcionamento da GSK3 tem um papel significativo em muitas doenças, como as neurológicas, psiquiátricas, inflamatórias, cardiovasculares e ósseas, além de ser importante na diabetes, AIDS e câncer (42). Ensaios clínicos com sais de lítio demonstram que a inibição de GSK3 β pode ter ações neuroprotetoras, reduzindo a progressão de déficits funcionais e cognitivos (45), além de promover a sobrevivência de neurônios (46).

Os inibidores de GSK3 β são bastante estudados como modulares da via Wnt/ β -catenina, mas existem outras substâncias que também são capazes de modular esta via, por exemplo, a proteína XAV939, que leva ao aumento dos níveis proteicos do complexo de destruição AXIN1-GSK3 β , com consequente degradação da β -catenina (47, 48). A ação dos inibidores de GSK3 β está bem caracterizada em células tumorais e

do SNC, devido ao papel desta via na proliferação celular e das fortes ações neurológicas de alguns de seus indutores (49, 50).

Os sais de lítio (LiCl e Li_2CO_3), agonistas farmacológicos clássicos da via Wnt/ β -catenina a ativam pela inibição direta de $\text{GSK3}\beta$ e consequente acúmulo de β -catenina não fosforilada no citoplasma da célula (51). Estes sais são utilizados há 40 anos na clínica para tratamento de pacientes com distúrbio bipolar, depressão e esquizofrenia a fim de prevenir o dano e perda de tecido neuronal decorrentes de defeitos na sinalização da via Wnt/ β -catenina nesses pacientes (52). O íon de lítio (Li^+) compete com íon magnésio (Mg^{2+}), pois possui um raio iônico semelhante a ele; várias enzimas dependem de magnésio como cofator para se tornarem ativas. A própria inibição da $\text{GSK3}\beta$ se dá através da competição com íons magnésio (53). Somado a isso, em modelos animais verificou-se que as ações dos sais de lítio estão relacionadas apenas parcialmente à ativação da via Wnt/ β -catenina, já que estes podem causar efeitos em outras vias de sinalização (54-56) (**Figura 2**).

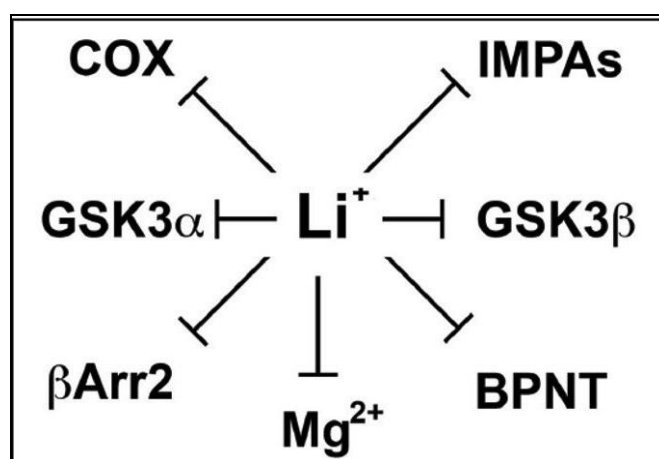


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes alvos moleculares de lítio. Inositol Monofosfatases (IMPAs), Nucleotidase-3 bifosfato (BPNT), cicloxigenase (COX), β -arrestina 2 ($\beta\text{Arr}2$) e membros da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta ($\text{GSK-3}\alpha$ e β) são alguns exemplos de alvos moleculares do lítio (56).

A ativação da via Wnt/ β -catenina com sais de lítio pode ter ação benéfica (57-60) ou maléfica (61, 62) dependendo das células estimuladas e/ou da patologia em estudo. Na **tabela 1** verificam-se os diferentes modelos de ativação da via Wnt/ β -catenina realizados até o momento. Para ensaios *in vitro* verifica-se culturas com LiCl em diferentes tipos celulares, com tempos e concentrações variadas. Nos ensaios *in vivo*, utilizaram-se LiCl e Li₂CO₃ em diferentes concentrações, sendo o LiCl administrado por gavagem ou I.P e o Li₂CO₃ por meio de ração contendo o sal. A ativação da via Wnt/ β -catenina com sais de lítio pode resultar em alguns efeitos conforme descritos na **tabela 2**.

Além dos sais de lítio, outras substâncias podem modular a via Wnt/ β -catenina *in vitro*. O tratamento de neurônios com nanopartículas de Curcumina, um agente neuroprotetor e ativador da via, induz proliferação e diferenciação de células do SNC (63). O polifenol natural *Piceatannol* com potente atividade química presente em uvas, vinhos e outras plantas pode atuar como inibidor da via Wnt/ β -catenina e indutor de apoptose celular em mieloma múltiplo (64).

Outras abordagens *in vitro* também são usadas para modulação da via Wnt/ β -catenina, como a utilização de vetores com β -catenina mutante ou vetores com β -catenina silenciada que inibem a ativação da via e são capazes de induzir a expressão de alguns fatores de transcrição da transição mesênquima-epitélio, importantes para aumentar a mobilidade *in vitro* de células de glioblastoma, um dos tumores cerebrais mais invasivos (65). Ademais, as proteínas de alguns vírus também são capazes de modular a atividade da via Wnt/ β -catenina, como por exemplo, a proteína HBx, pertencente ao vírus da hepatite B, que leva à diminuição da expressão das proteínas SFRP1 e SFRP5 (Proteína secretada relacionada ao receptor *Frizzled* 1 e 5) em células

carcinoma de fígado por meio de modificações epigenéticas com consequente ativação da via Wnt/ β -catenina (66).

Outras substâncias, além dos sais de lítio, podem modular a via Wnt/ β -catenina *in vivo*, como por exemplo, a Icarina, um flavanóide derivado de plantas, potente na cura de fraturas ósseas, que estimula a via e consequentemente a formação óssea em animais OPG^{-/-}, revertendo este quadro de deficiência (67).

Por fim, os agonistas da via Wnt/ β -catenina que são altamente específicos na inibição da proteína GSK3 β , por não possuírem aplicação clínica são menos estudados, comparado aos sais de lítio (68). Um deles é o inibidor SB-216763 (SB), uma molécula bem pequena com capacidade de competir com ATP e inibir a atividade das isoformas α e β da proteína GSK3. Sua alta seletividade para proteína GSK3 foi testada contra um painel de 24 proteínas quinase, incluindo PKB (proteína quinase B) e PDK-1 (Piruvato desidrogenase quinase 1), sendo que nenhuma destas quinases foi inibida pelo SB nas concentrações que causaram inibição da proteína GSK3 β . Este inibidor é capaz de aumentar os níveis de β -catenina citoplasmática, ativando a via canônica Wnt/ β -catenina. Outro agonista desta via é o inibidor CHIR-99021 (CHIR), uma molécula derivada do sal amino-pirimidina que também tem a capacidade de inibir as isoformas α e β da proteína GSK3 (68, 69).

A **tabela 3** mostra diferentes linhagens celulares cultivadas em diferentes tempos e concentrações de SB e CHIR para ativação da via Wnt/ β -catenina e a **tabela 4** algumas atividades biológicas importantes desencadeadas por estes inibidores ao ativar a via Wnt/ β -catenina.

Nas **tabelas 1 e 3** podemos verificar também as diferentes abordagens utilizadas até o momento para avaliação da ativação da via Wnt/ β -catenina sob ação de diferentes agonistas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. As técnicas mais utilizadas são: qRT-PCR,

Western Blotting (WB), Imunofluorescência confocal e ensaios de luciferase. Cada uma destas técnicas é utilizada para avaliar diferentes intermediários ou alvos da via Wnt/ β -catenina. Em resumo, a ativação da via Wnt/ β -catenina pode ocorrer por meio de diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se inibidores da proteína GSK3 β , como os sais de lítio ou os inibidores farmacológicos específicos de GSK3 β .

Tabela 1: Ativação da via Wnt/ β -catenina com sais de lítio.

Inibidor	Método	Concentração	Tempo	Tecido/Célula	Genes alvo	Técnica	Referências
LiCl	<i>In vitro</i> (cultura)	30mM	8 horas	Células intersticiais da medula renal (RMICs)	GSK-3 β	WB	Rao, 2005 (62)
		3mM	7 dias	Linhagem celular HT22 do hipocampo	GSK-3 β	WB	Yazlovitskaya, 2006 (58)
					β -catenina		
					Ciclina D1		
		5 e 10mM	24 horas	Mioblastos esqueléticos (SkMs)	GSK-3 β	WB	Du, 2008 (59) / Du, 2009 (60)
					β -catenina	Imuno F.	
		10mM	24 horas	Células de Mieloma 5TGM1	Axina 2	qRT-PCR	Edward, 2008 (112)
					β -catenina	WB	
					c-myc		
		10mM	48 horas	Células de Schwann (MSC80)	β -catenina	WB Imuno F.	Makoukji, 2012 (57)
		15mM	1 hora	Células foliculares ovarianas	β -catenina	WB Imuno F.	Li L, 2014 (61)
					Ciclina D1	qRT-PCR	
	Axina 2						
	<i>In vivo</i> (Gavagem)	350mg/kg	4 semanas	Cérebro	GSK-3 β	WB	Leroy, 2010 (114)
					β -catenina		
		300mg/kg	4 semanas	Medula óssea	Axina 2	qRT-PCR	Edwards, 2008 (112)
					β -catenina	Imuno F.	
		200mg/kg	4 semanas	Osteoblastos	Axina 2	qRT-PCR	Clément-Lacroix, 2005 (113)
<i>In vivo</i> (I.P)		40mg/kg	16 dias	Rim	GSK-3 β	WB	Rao, 2005 (62)
	40 ou 80mg/kg	7 dias	Efeito protetor de lítio na apoptose induzida por irradiação			Yazlovitskaya, 2006 (58)	
	50mg/kg	4 dias	Avaliação de movimentos			Makoukji, 2011 (57)	
Li₂CO₃	<i>In vivo</i> (ração)	0,40%	7 meses	Células endoteliais	Sem verificação da ativação da via		Kim, 2013 (34)
		0,40%	7 meses	SNC			Dixon, 1998 (120)
		0,20%	1 mês		GSK-3 β	WB	Watase, 2007 (110)
		0,30%	21 dias		GSK-3 β	WB	Liu, 2012 (38)

Tabela 2: Efeitos Biológicos da ativação da via Wnt/ β -catenina.

Método	Agonista	Células / Tecido	Efeitos Biológicos	Referência
<i>In vitro</i> (cultura)	LiCl	Folicular ovarianas	Aumenta apoptose celular e diminui desenvolvimento folicular	Li L, 2014 (61)
		SNC	Melhora o processo de remielinização periférica em células de <i>Schwann</i>	Makoukji, 2011 (57)
			Previne apoptose de neurônios (linhagem celular HT-22) irradiados	Yazlovitskaya, 2006 (58)
		Cancerígenas	Estimula funções protetoras de mioblastos esqueléticos (SkMs) em cardiomiopatia	Du, 2008 (59) / Du, 2009 (60)
			Previne o desenvolvimento de mieloma múltiplo	Edward, 2008 (112)
	Curcumim	SNC	Induz proliferação e diferenciação de células do SNC	Tiwari, 2014 (63)
	Piceatannol	Câncerígenas	Inibe via Wnt/ β -catenina e induz apoptose de células de mieloma múltiplo	Schmeel, 2014 (64)
	β -catenina silenciada	Câncerígenas	Inibe via Wnt/ β -catenina e induz células de Glioblastoma	Kahlert, 2012 (65)
Proteína HBx	Câncerígenas	Inibe via Wnt/ β -catenina e promove câncer de fígado	Xie, 2013 (66)	
<i>In vivo</i> (Gavagem)	LiCl	Osteoblastos	Aumento da formação óssea do esqueleto	Clément-Lacroix (113)
		Medula óssea	Melhora do quadro clínico em modelos para mieloma múltiplo	Edwards, 2008 (112)
		SNC	Inibe desenvolvimento de amarrinhados neurofibrilares na patologia neurofibrilar	Leroy, 2010 (114)
<i>In vivo</i> (I.P)	LiCl	SNC	Acelera movimentos de camundongos adultos após rompimento do nervo facial	Makoukji, 2012 (57)
		Rim	Inibe a atividade da proteína GSK-3 β renal, promovendo poliúria dependente de COX2	Rao, 2005 (62)
<i>In vivo</i>	Li2CO3 (ração)	Células endoteliais	Aumenta a sobrevivência de células endoteliais e da autofagia em um modelo	Kim, 2013 (34)
		SNC	Aumenta e estabiliza a captação de glutamato pelas terminações pré-sinápticas	Dixon, 1998 (120)
			Melhora as funções neurológicas da ataxia espinocerebelar	Watase, 2007 (110)
		SNC	Melhora os déficits fenotípicos em modelo animal para síndrome do X frágil	Liu, 2012 (38)
	Icarina	Osteoblastos	Estimula formação óssea em animais OPG ^{-/-} revertendo este quadro de deficiência	Li, 2014 (61)

Tabela 3: Ativação da via Wnt/ β -catenina com inibidores específicos.

Inibidor	Método	Conc.	Tempo	Tecido/Célula	Genes alvo	Técnica	Observações	Referências
CHIR99021	<i>In vitro</i>	10 μ M	24 h	Células de hepatoma (H4IIE)	β -catenina	Luciferase	SB não ativou a via	Finlay, 2004 (119)
				Células tronco embrionárias pluripotentes (J1 mESC)	β -catenina	Luciferase		Kirby, 2012 (117)
				Células embrionárias do rim (HEK293)	β -catenina	Luciferase		
SB216763	<i>In vitro</i>	6 μ M	6 dias	Células musculares lisas do brônquio	GSK-3 β	WB	SB não teve efeito	Deng, 2008 (70)
		20 μ M	24 h	Células tronco embrionárias pluripotentes (J1 mESC)	β -catenina	Luciferase		Kirby, 2012 (117)
				Células embrionárias do rim (HEK293)	β -catenina	Luciferase		
		30 μ M	48 h	Células cromafim adrenal	β -catenina	WB		Nemoto, 2008 (119)
		30 μ M	1 h	Células de fígado	GSK-3 β	Atividade		Coghlan, 2000 (69)
		5 μ M	90 min	Células embrionárias do rim (HEK293)	GSK-3 β	Atividade		

Tabela 4: Efeitos Biológicos da ativação da via Wnt/ β -catenina.

Método	Agonista	Células/Tecido	Efeitos Biológicos	Referência
<i>In vitro</i>	CHIR99021	Células de hepatoma (H4IIE)	Uso potencial de inibidores de GSK-3 no tratamento de doenças que apresentam resistência à insulina, como Diabetes do tipo II	Finlay, 2004 (119)
		Células tronco embrionárias pluripotentes (J1 mESC)	Promove pluripotência em Células tronco embrionárias de camundongos	Kirby, 2012 (117)
		Células embrionárias do rim (HEK293)		
<i>In vitro</i>	SB216763	Células musculares lisas do brônquio	Hipertrofia do músculo liso das vias aéreas	Deng, 2008 (70)
		Células tronco embrionárias pluripotentes (J1 mESC)	Promove pluripotência em Células tronco embrionárias de camundongos	Kirby, 2012 (117)
		Células embrionárias do rim (HEK293)		
		Células cromafim adrenal	Inibição da via de sinalização Akt	Nemoto, 2008 (119)
		Células de fígado	SB em combinação com insulina aumenta síntese de gliogênio	Coghlan, 2000 (69)
		Células embrionárias do rim (HEK293)	Induz expressão de β -catenina, TCF-LEF	

1.2. Via Wnt/ β -catenina e homeostase de células T

O gene HIG2 é um gene alvo e também ativador da via Wnt/ β -catenina, que está envolvida na regulação da proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular em vertebrados (71). Em modelos animais geneticamente modificados verificou-se que intermediários e fatores de transcrição da via Wnt/ β -catenina podem modular a diferenciação das células T CD4⁺ (72). Apesar da importância da Wnt/ β -catenina, o uso de agonistas farmacológicos, como os sais de lítio, tem sido pouco explorado como moduladores da função de células T CD4⁺ (73, 74). Com relação às estas células, em indivíduos saudáveis a manutenção de um número relativamente constante do subtipo *naïve* de células T CD4⁺ ao longo da vida ocorre pelo processo de homeostase (75).

Algumas doenças humanas resultam em um profundo comprometimento da homeostase de linfócitos T CD4⁺, como por exemplo, a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), causada pela infecção do vírus HIV-1. Pacientes infectados com este vírus apresentam perda progressiva de linfócitos T CD4⁺ no sangue, gerando um quadro clínico de imunodeficiência profunda. Entretanto, um pequeno grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 se mantém imunocompetentes, com contagens de células T CD4⁺ >500 células/mm³ por 7-10 anos ou mais, além de viremia baixa ou indetectável (< 10.000 cópias RNA viral/ml), na ausência de terapia antirretroviral. Estes pacientes são considerados progressores lentos (LTNP) (76-78).

Considerando que a homeostase de células T CD4⁺ é um evento central na patogênese da infecção pelo HIV, nosso grupo avaliou o perfil de expressão gênica global, por *microarray*, em PBMC de pacientes LTNP; visando encontrar nestas células fatores relacionados com a sua homeostase. Dos diversos genes diferencialmente expressos, o gene HIG2 foi o que apresentou a maior diferença de expressão em LTNP em comparação com os pacientes HIV⁺ progressores sob tratamento com

antirretrovirais (ST). Posteriormente, para validação destes dados, verificou-se por qRT-PCR, que em PBMC dos pacientes LTNP há maior expressão de HIG2, comparado aos pacientes ST ou recentemente infectados (RI) (**figura 3**) (79).

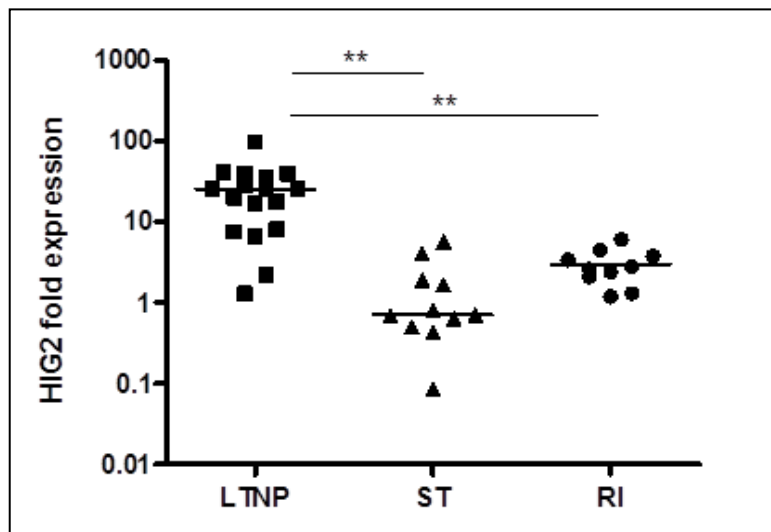


Figura 3. PBMC de pacientes LTNP apresentam expressão aumentada de HIG2. Comparado aos pacientes sob tratamento antiretroviral (ST) e os recentemente infectados (RI), pacientes LTNP apresentam expressão aumentada de HIG2. A expressão relativa de HIG2 foi avaliada por qRT-PCR em amostras de PBMC de pacientes infectados com HIV-1-1 LTNP e ST (sob tratamento antiretroviral, com $CD4^+ > 500$ células/mm³) e pacientes recentemente infectados sem tratamento (RI), comparado à doadores saudáveis. Amostras de RNA foram submetidas a uma reação *single step SYBR-green* RT-PCR; *fold expression* foi calculado com método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando GAPDH como controle endógeno. Análise estatística: teste T não pareado, Mann Whitney, $**p < 0.01$ (79).

Somado a isso, ensaios funcionais para o gene HIG2 demonstraram seu possível papel na homeostase de células T CD4⁺ em indivíduos saudáveis. As células T CD4⁺, principalmente do subtipo *naïve*, destes indivíduos, expressaram constitutivamente níveis aumentados do gene HIG2. Além disso, o tratamento *in vitro* de PBMC de indivíduos saudáveis com LiCl ou peptídeo HIG2 foi capaz de ativar a Wnt/ β -catenina; tal ativação foi detectada pela análise proteica dos níveis de GSK3 β fosforilada bem como de β -catenina não fosforilada, além da expressão dos genes alvo da via, como HIG2 e Ciclina D1 (**Figura 4**) (79, 80).

Com base nestes resultados, sugere-se que a via Wnt/ β -catenina e seu gene alvo HIG2 possam desempenhar um papel na manutenção da homeostase de células T CD4+, através da manutenção da proliferação homeostática de células T CD4+ *naïve*.

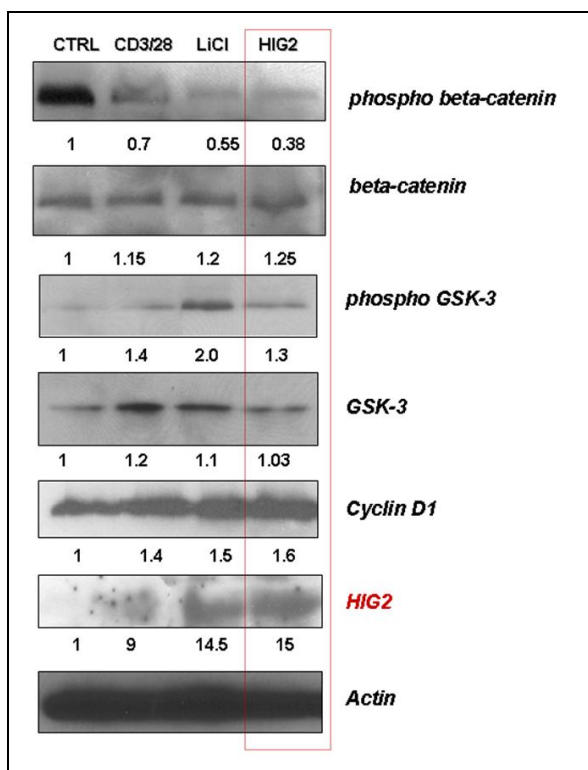


Figura 4. Tratamento com HIG2, LiCl e TCR/CD28 ativa a via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ humanas. Células T CD4+ de indivíduos saudáveis foram purificadas por seleção negativa e incubadas com 1 μ g/ml de anti-CD3/28, 10mM de LiCl ou 10 μ g/ml de peptídeo HIG2 por 24h. O estado de fosforilação das proteínas β -catenina e GSK3 β foram analisados, juntamente com os níveis de expressão proteica dos produtos HIG2 e Ciclina D1. A actina foi utilizada como normalizador endógeno. CTRL: controle (79, 80).

Adicionalmente, avaliando o perfil de expressão gênica de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV-1, Wu *et. al.*, observaram que a via Wnt/ β -catenina se mostrou mais ativa em pacientes controladores de elite que apresentam níveis aumentados de células T CD4+ (81). Ademais, a via Wnt/ β -catenina foi associada com sobrevivência de células T de memória em pacientes HIV+ controladores de elite (82).

Em conjunto, estes dados são consistentes com a hipótese de que ocorre ativação da via Wnt/ β -catenina, com consequente expressão aumentada de HIG2 e outros genes alvos da via, em células T CD4⁺ humanas, criando perspectivas para avaliação do papel desta via em células murinas.

O termo homeostase se refere à tendência do corpo em preservar sua estabilidade após alguma perturbação. Em indivíduos saudáveis a manutenção de um número relativamente constante de células T CD4⁺ *naïve* ao longo da vida ocorre por este mecanismo, mantendo o repertório de linfócitos T ao longo do tempo (75). Quando o repertório de células T é gravemente comprometido em um indivíduo, gerando um quadro linfopênico, dois mecanismos para o reestabelecimento do compartimento de células T CD4⁺ *naïve* são propostas: *output* tímico - o timo se torna uma fonte de células T, mantendo a homeostase do organismo (83) ou proliferação homeostática periférica - as células T remanescentes na periferia após um quadro linfopênico se proliferam, reestabelecendo a homeostase de células T no organismo (84).

O *output* tímico é caracterizado pela saída de células emigrantes recentes do timo, as RTE (*recent thymic emigrants*), que se deslocam para periferia a fim de repor o repertório de células perdidas após alguma perturbação que altera o balanço homeostático normal do organismo (85).

A proliferação homeostática periférica de células T CD4⁺ *naïve* é responsável pela substituição das células T da periferia que foram perdidas por morte ou que se tornaram células de memória ou efetoras (84). O tamanho e composição do pool de células T está sob estrita regulação homeostática. A homeostase é obtida através do controle entre a sobrevivência das células T e a divisão celular. O compartimento de células T *naïve* é gerado no início do desenvolvimento pela saída do timo, e sua manutenção em adultos está sobretudo dependente de proliferação homeostática de

células T na periférica (86). Foi estimado que cerca de 90% do conjunto de células T *naïve* em seres humanos adultos saudáveis vem da proliferação homeostática periférica, em vez da saída do timo (87). O início do processo de divisão de célula T *naïve* ocorre em resposta a sinais fornecidos por IL-7 e TCR em resposta a auto-complexos MHC-peptídeo, enquanto a proliferação homeostática de células T de memória centrais depende apenas de IL-7 e IL-15 sinais (88).

Existem controvérsias sobre qual destes dois mecanismos é responsável pela recomposição do compartimento de células T CD4+ *naïve*. Um estudo recente demonstrou que em camundongos o *output* tímico é o mecanismo mais importante para manutenção da homeostase das células T *naïve* na periferia. Já em seres humanos adultos a maioria das células *naïve* são produzidas por proliferação homeostática periférica que é responsável pela substituição das células T da periferia que foram perdidas por morte ou que se tornaram células de memória ou efectoras (89).

1.3. Polarização de células TCD4+

A via Wnt/ β -catenina tem um papel muito importante no desenvolvimento das células, tanto no timo, quanto da periferia, locais onde a modulação de suas proteínas intermediárias, β -catenina e GSK3 β , bem como a de seu fator de transcrição TCF-1 tem sido amplamente estudada.

No timo, foi demonstrado que receptores FZD solúveis, capazes de inibir a via Wnt/ β -catenina, inibem o desenvolvimento de células T, por regular negativamente a proliferação dos timócitos (90). Verificou-se também que camundongos deficientes em Wnt1 e 4 apresentam poucas células no timo (91). Ademais, a deficiência da proteína β -catenina inibe o desenvolvimento intratímico das células T (92) e a deleção de β -catenina ou a utilização de um de seus inibidores, o ICAT, limita o desenvolvimento

dos timócitos nos estágios DN para DP (93) e diminui a sobrevivência dos timócitos DP (94). Adicionalmente, a ausência do fator de transcrição TCF-1 leva ao comprometimento no desenvolvimento dos timócitos (95), especialmente na transição do estágio DN1 para DN2 e DN4 para DP no timo (96). Contudo, não se pode afirmar que a participação do TCF-1 esteja sempre ligada à ativação da via Wnt/ β -catenina já que o TCF-1 não é um fator de transcrição exclusivo da via Wnt/ β -catenina.

Em menor escala, a via Wnt/ β -catenina também regula os processos de seleção positiva e negativa no timo (transição DP para SP) (26). A expressão do gene CD4 é regulada pela sinalização β -catenina/TCF em timócitos SP (97). Além disso, a estabilização da β -catenina durante a seleção positiva aumenta sinalização via IL-7R e promove o desenvolvimento de células T CD8⁺ (98).

Na periferia, fatores presentes na sinalização da Wnt/ β -catenina tem sido estudados no processo de diferenciação de células T CD4⁺ em subpopulações CD4⁺ T *helper* (Th) distintas (99). Em linha geral, observações em modelos animais mostraram que a proteína β -catenina, e os fatores de transcrição TCF-1 e LEF-1 podem controlar vários aspectos do desenvolvimento das células T CD4⁺ na periferia (72, 100).

Células T CD4⁺ *naïve* CD45RA⁺ tem níveis mais altos de TCF-1 e LEF-1 do que células T de memória (101). Além disso, em células T ativadas há maior expressão de receptores FZD, o que aumenta a suscetibilidade à via Wnt (102). Existe indicação de que a ativação da via Wnt/ β -catenina com inibidor de GSK3 β pode manter as células T CD8⁺ em um estado mais indiferenciado (26).

Com relação às células Th2, inicialmente, verificou-se que a via Wnt/ β -catenina pode ser importante no processo de polarização destas células (103). Ademais, outro trabalho demonstrou a influência de TCF-1 e β -catenina, via TCR, sem o envolvimento da via Wnt/ β -catenina. Neste trabalho, o TCF-1 e a β -catenina são necessários para a

expressão inicial de GATA-3, induzindo a polarização para células Th2 (104). Por outro lado, foi demonstrado que o fator de transcrição LEF-1 apresenta afinidade de ligação ao sítio de regulação negativa de IL-4, reduzindo diretamente a expressão de IL-4, sugerindo possível diminuição do perfil Th2 (105).

Durante o processo de polarização para Th1, verificou-se que o fator de transcrição T-bet se associa à Bcl-6, formando um complexo repressor que atua sobre TCF-1, induzindo a polarização para Th1 (106). Outro estudo demonstrou que o TCF-1 regula negativamente a expressão de IFN- γ reprimindo a diferenciação para Th1 (104). Contudo, estes efeitos sobre são independentes da via Wnt/ β -catenina.

Com relação às células Th17, células de camundongos TCF-1^{-/-} mostraram aumento na diferenciação de células Th17, com aumento da produção das citocinas IL-17 e IL-23 (107). Lee *et.al.*, demonstraram que a utilização de inibidores da via Wnt/ β -catenina induz o processo de polarização para células Th17 em células T CD4+ humanas (108). Adicionalmente, verificou-se a influência do TCF-1 neste processo, de forma independente da via Wnt/ β -catenina, onde camundongos TCF^{-/-} mostraram expressão aumentada de IL-17 no timo e na periferia, mesmo na ausência do fator de transcrição ROR γ t. Em um animal TCF^{-/-} com EAE, verificou-se resposta antígeno específica aumentada, por meio da identificação de secreção elevada de IL-17 em linfonodo e baço destes camundongos comparado aos animais TCF^{+/+} (109). Por fim, foi demonstrado que o TCF-1 regula a diferenciação de Th17 durante o desenvolvimento de células T, mas não em células T maduras, o que pode ser independente da via Wnt/ β -catenina (107). Ademais, a inibição de GSK3 β , além de ativar a via Wnt/ β -catenina, participa de outros processos de sinalização. Ensaios *in vivo* utilizando camundongos tratados com Li₂CO₃ por 4 semanas indicaram que a inibição de GSK3 β causou diminuição significativa da produção de IL-6, com consequente ativação de STAT3,

diminuindo a polarização para Th17. Neste caso o efeito de inibição de GSK3 β não resultou na ativação da via Wnt/ β -catenina, mas sim da via de STATs (73).

Por fim, as células T CD4⁺ reguladoras são essenciais para manutenção da tolerância imunológica. Nelas a ativação da Wnt/ β -catenina leva ao aumento da sobrevivência das Tregs, já que a expressão da forma estabilizada da β -catenina permite a regulação positiva do fator anti-apoptótico Bcl-xL e a supressão de c-Myc (110). Além disso, a inibição de GSK3 β aumenta a atividade supressora das Tregs, bem como a expressão de Foxp3, β -catenina e Bcl-xL (111). Até o momento, entretanto, não foi demonstrado como a modulação da via Wnt/ β -catenina pode influenciar no processo de polarização das Tregs.

Baseado nestes estudos podemos afirmar que a via Wnt/ β -catenina está ligada ao desenvolvimento de células T CD4⁺, sendo que a influência do TCF-1 e da β -catenina sob a polarização destas células foram bastante estudados até o momento (**Figura 5**).

Por fim, é muito importante ressaltar que em células T CD4⁺, não foi demonstrada ativação da via Wnt/ β -catenina através da administração de sais de lítio em nenhum estudo. Sendo assim, ainda existem muitos questionamentos quanto aos efeitos do tratamento com sais de lítio em células T CD4⁺.

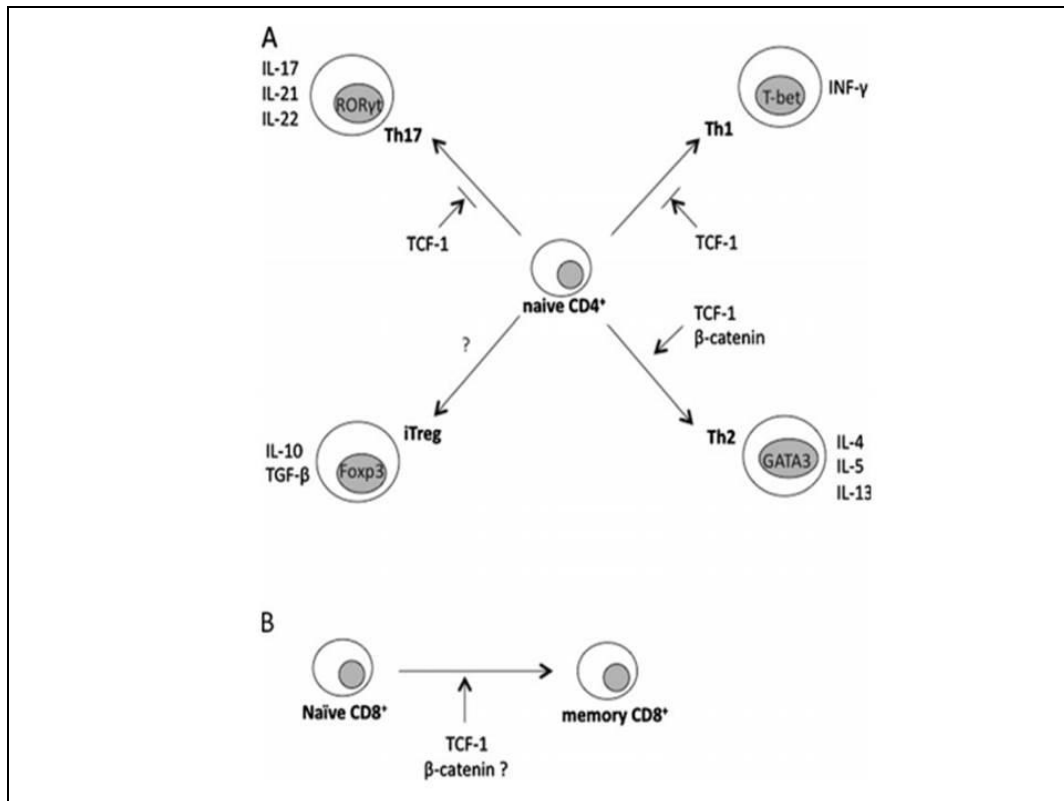


Figura 5. Função da via Wnt/β-catenina durante a diferenciação de células T periféricas. Função potencialmente positiva ou negativa de β-catenina/TCF-1 durante a diferenciação de células T naïve em subtipos Th1, Th2, Th17, Treg e T CD8 de memória. Citocinas produzidas por diferentes tipos de células T helper também estão mostradas (99).

2. JUSTIFICATIVA

O mecanismo de homeostase das células T CD4⁺ é fundamental para a manutenção do número destas células e é importante para a imunocompetência. Foi observado que a via Wnt/ β -catenina é ativa e participa nos processos de proliferação homeostática e sobrevivência de células T CD4⁺ humanas. Por outro lado, em camundongos pouco se sabe se a via Wnt/ β -catenina participa na homeostase das células T CD4⁺. Um primeiro passo para esse estudo é avaliar o potencial de ativação desta via em células T CD4⁺ murinas, utilizando inibidores da proteína GSK3 β .

3. HIPÓTESE

O tratamento com sais de lítio e outros inibidores da GSK3 β *in vitro* ou *in vivo* induz a via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ murinas.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar a ativação da via canônica Wnt/ β -catenina em células T CD4+ murinas.

4.2. Específicos

- a) Avaliação da indução da via Wnt/ β -catenina *in vitro*.
- b) Avaliação da indução da via Wnt/ β -catenina *in vivo*.

5. DESENHO EXPERIMENTAL

A ativação da via Wnt/ β -catenina será analisada em diferentes tipos celulares e tecidos cerebrais, sob a ação de diversos estímulos em tempos e concentrações variados. A ativação da via será testada em dois blocos experimentais: *in vitro* e *in vivo*. No teste *in vitro* serão utilizados os inibidores de GSK3 β , SB, CHIR e LiCl e nos testes *in vivo* serão utilizados LiCl (tratamento agudo) e Li₂CO₃ (tratamento crônico). As **figuras 6, 7** e **8** mostram os desenhos experimentos de cada um destes testes.

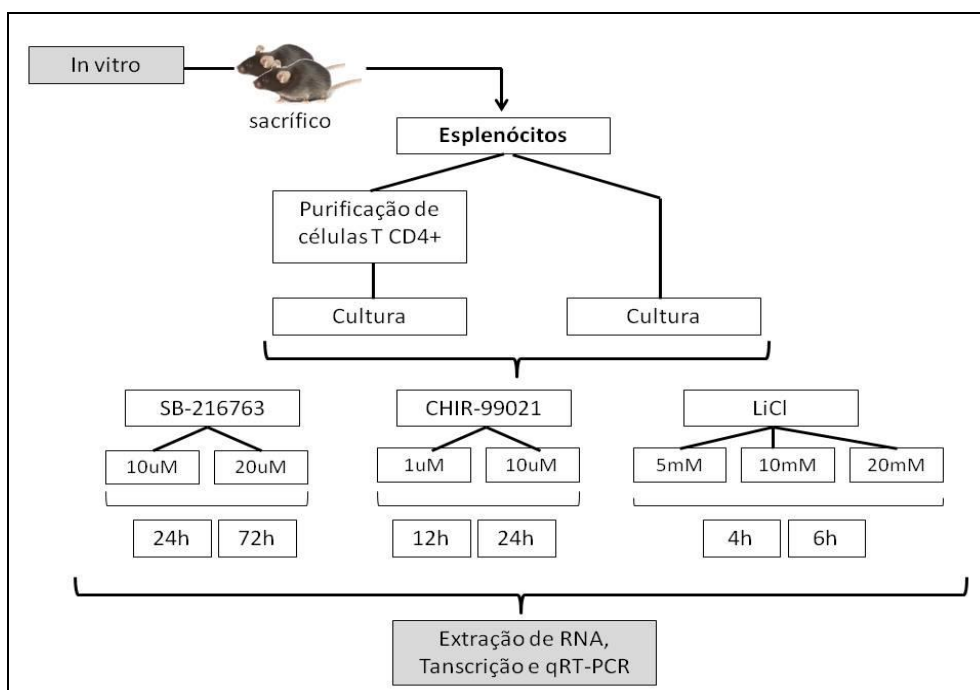


Figura 6. Esquema de tratamento *in vitro* de esplenócitos e células T CD4+ purificadas com inibidores de GSK3 β .

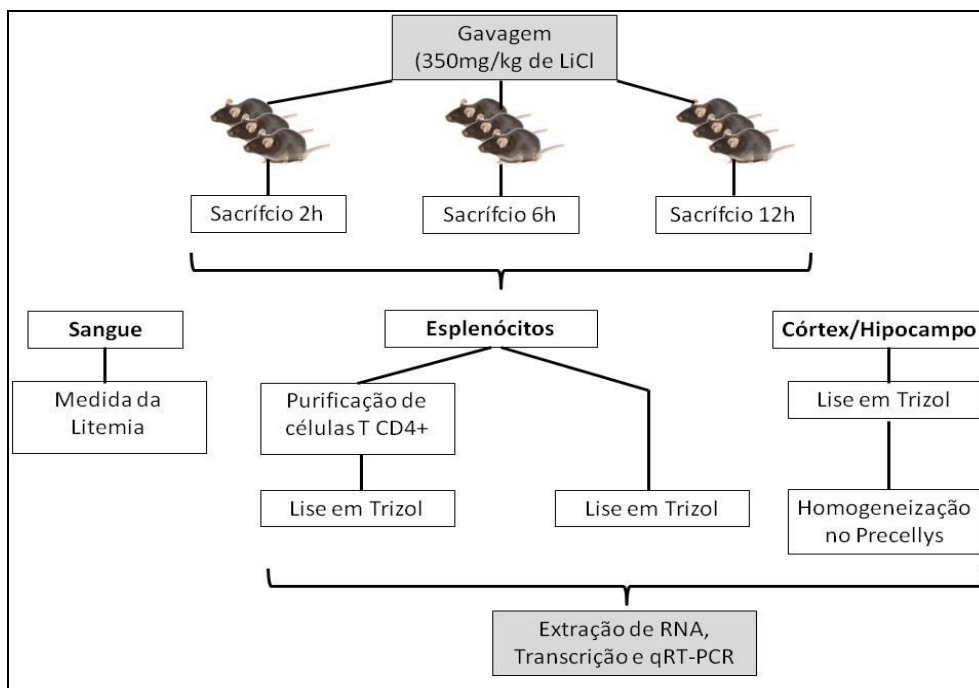


Figura 7. Esquema de tratamento agudo dos camundongos com LiCl.

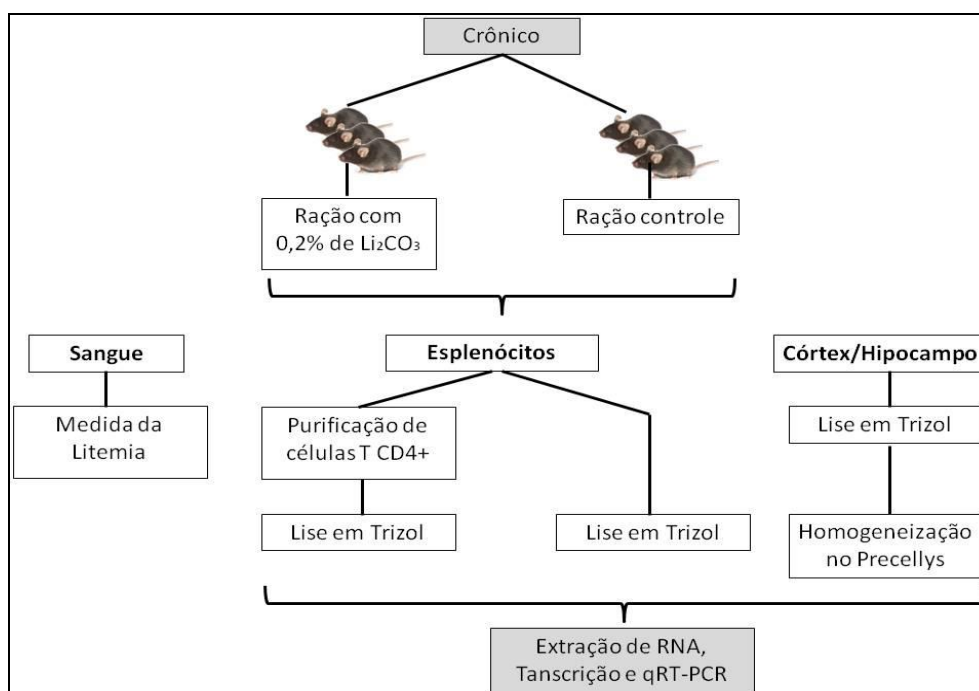


Figura 8. Esquema de tratamento crônico dos camundongos com Li₂CO₃.

6. METODOLOGIA

6.1. Indução *in vitro* da via Wnt/ β -catenina

6.1.1. Cultura de esplenócitos totais

No primeiro bloco de experimentos 1×10^6 esplenócitos de camundongos C57BL/6 machos foram separados e estimulados em cultura com LiCl (Merck) nas concentrações de 5, 10 ou 20mM durante 4 ou 6 horas. Posteriormente, a mesma quantidade de esplenócitos foi cultivada com dois diferentes inibidores farmacológicos específicos da proteína GSK3 β , CHIR-99021 utilizado nas concentrações de 1 ou 10 μ M, durante 12 ou 24h ou SB-216763 utilizado nas concentrações de 10 ou 20 μ M, durante 24 ou 72h (**Figura 6**).

6.1.2. Cultura de linfócitos T CD4⁺ purificados

Esplenócitos de camundongos C57BL/6 machos foram separados e purificados por seleção negativa, através do *Kit Dynal[®] Mouse CD4 Negative Isolation Kit*. Após purificação, 1×10^6 linfócitos T CD4⁺ foram cultivados com LiCl, SB-216763 ou CHIR-99021 nas mesmas concentrações e tempos citados acima (**Figura 6**).

6.2. Indução *in vivo* da via Wnt/ β -catenina

6.2.1. Tratamento agudo

Nove Camundongos C57BL/6, divididos igualmente em 3 grupos de acordo com o tempo (2, 6 e 12 horas) após administração do LiCl, foram submetidos ao tratamento com dose única de 300 μ l de solução de LiCl (350mg/kg), administrado por gavagem no tempo 0. Como controles foram utilizados 9 camundongos, também divididos em três grupos para cada tempo, os quais receberam solução salina por gavagem no tempo 0.

Após cada período foram retirados 500µl de sangue de cada animal que foi processado para obtenção de 100µl de plasma e utilizados para medida da litemia (valor de referência: 0,5 a 1,5mEq/L) em fotômetro de chama. Em seguida os animais foram sacrificados para obtenção de esplenócitos. A **figura 7** representa a esquema de tratamento agudo dos camundongs com LiCl. O mesmo foi aplicado para o grupo controle, mas com salina ao invés de LiCl.

6.2.2. Tratamento crônico

Camundongos C57BL/6 foram separados em dois grupos, cada um com 3 animais. O grupo controle recebeu ração sem Li₂CO₃ e o grupo tratado recebeu ração suplementada com 0,2% de Li₂CO₃, ambos durante 30 dias. Os animais tinham água e NaCl 0,9% *ad libitum* para hidratação e diminuição da toxicidade do lítio, respectivamente. Ao término do tratamento foram obtidos 500µl de sangue de cada animal para medida da litemia e então os animais foram sacrificados (**figura 8**).

6.3. Obtenção de esplenócitos

Para obtenção de esplenócitos para cultura *in vitro* e após indução da via Wnt/β-catenina *in vivo*, os animais foram sacrificados e o baço foi retirado e posteriormente macerado em 5mL de meio RPMI. O homogeneizado resultante foi centrifugado em temperatura ambiente (TA) a 1.700 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado com 1mL de tampão de lise de hemácias ACK (*Ammonium-Chloride-Potassiumpara*) - Gibco®, em TA por 2 minutos. Foram adicionados 8mL de RPMI, seguido de centrifugação a 1.700 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet bem homogeneizado com 10mL de meio RPMI para lavar o ACK

remanescente e centrifugado mais uma vez a 1.700 rpm por 6 minutos. O pellet final foi ressuspenso em meio RPMI e as células contadas em câmara de *Neubauer*.

6.4. Obtenção de córtex e hipocampo

Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao tratamento com LiCl por gavagem ou Li₂CO₃ através da ração. Após o período de tratamento, estes camundongos foram sacrificados e procedemos para obtenção do hipocampo e córtex dos animais. O hipocampo e córtex foram extraídos integralmente e armazenados separadamente em 1mL de Trizol a -80° C. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em *Precellys*[®]24 e submetidas à extração de RNA, transcrição em cDNA e posterior análise por qRT-PCR.

6.5. Medida da Litemia

Após tratamentos *in vivo*, 500ul de sangue foram retirados dos animais pelo plexo orbital, os quais foram centrifugados a 2300 rpm para obtenção da fração plasmática (em torno de 100ul), utilizada para medida da litemia. A litemia foi medida no Instituto de Psiquiatria da USP, através de espectrofotometria de chama (112, 113).

6.6. Purificação de linfócitos T CD4+

Para purificação de linfócitos T CD4+ foi utilizado o Kit *Dynal*[®] *Mouse CD4 Negative Isolation Kit*. O rendimento do kit varia em torno de 12 a 16%. Linfócitos T CD4+ separados foram obtidos a partir de esplenócitos totais de camundongo saudável para cultura *in vitro* com inibidores de GSK3β ou foram purificados a partir de esplenócitos totais de camundongos submetidos a tratamento *in vivo* agudo com LiCl ou crônico com Li₂CO₃. A pureza da separação foi medida por citometria de fluxo.

6.6.1. Avaliação da pureza após separação negativa de linfócitos T CD4+

Após purificação dos linfócitos T CD4+, 300×10^5 células foram separadas e marcadas com anticorpos monoclonais para avaliação de marcadores de superfície por citometria. Primeiramente, as células foram lavadas com tampão salina fosfatada (PBS 1x) pH 7,2 (GIBCO™) e centrifugadas a 1.700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 170µL de Tampão MACS, composto por: 498 mL de PBS 1x, 2 mL de EDTA [500mM], 2,5 g de albumina de soro bovino (SIGMA®) (BSA). Após nova centrifugação a 1.700 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células marcadas com os anticorpos específicos conjugados (CD3-APC, CD4-PE, CD8-APC.Cy7) durante 30 minutos, protegidos da luz. Após incubação as células foram centrifugadas mais uma vez, o sobrenadante foi desprezado e as mesmas lavadas 2 vezes com 170µL de Tampão MACS. Para fixação, foi adicionado 100µL de paraformaldeído (SIGMA®) a 1% (PFA 1%). As células foram transferidas para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) e adquiridas em Citômetro de Fluxo. Eventos adquiridos no citômetro foram analisados através do *Software Flowjo*.

6.7. Expressão gênica

6.7.1. Extração e quantificação de RNA

Após tratamento *in vitro* ou *in vivo* 1×10^6 esplenócitos totais ou linfócitos T CD4+ purificados foram lisados em Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Durante o processo de extração, as amostras foram incubadas em TA por 5 minutos, e 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados. Após agitação no *vortex*, as amostras foram incubadas por 3 minutos em TA, seguido de centrifugação durante 15 minutos a 13.000 rpm (4°C). Após centrifugação a fase aquosa foi recolhida e foi adicionado 0,5mL de álcool isopropílico. Posteriormente a solução foi homogeneizada por inversão do tubo seguido

de 10 minutos de incubação em TA e centrifugação a 13.000 rpm por 15 min (4°C). O pellet resultante foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos. Após secagem em TA, o pellet de RNA foi ressuscitado em 10µl de água DEPC. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% corado com *SYBR*[®] *Safe* (1:10.000). A quantificação e a verificação da pureza do RNA foram avaliadas através da leitura em *NanoDrop* ND-1000 *Spectrophotometer* nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. Contaminações por DNA genômico foram eliminadas pelo tratamento da amostra de RNA com DNase I (Ambion Inc., Austin, TX, USA).

6.7.2. *Transcrição reversa de RNA*

1µg do RNA total extraído, tratado com DNase I foi utilizado como molde para a síntese de cDNA na presença de 0,5µl de iniciadores randômicos (0,1µg/µl), 0,5µl de Oligo-dT (0,5 µg/µl), 1µl de dNTPs (10Mm), 4µl de tampão *Superscript* II (5x), 2µl de DTT (0,1M), 1µl de de *RNAse Out* (40 U) e 1µl de *Superscript* II. O ciclo usado na reação foi de 5 minutos a 65°C, 2 minutos a 42°C, 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C e 10 minutos a 4°C.

6.7.3. *Desenho de primers*

Os *primers* desenhados para identificação dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina foram desenhados pelo programa *AlleleID* (*Premier Biosoft, USA*). Os parâmetros utilizados foram: tamanho dos *primers* (de 18 a 25 pares de bases), TM (temperatura de *melting*) de 59-61°C e o conteúdo de CG de 40-60% (**Tabela 5**). A especificidade dos *primers* desenhados foi avaliada pela curva de dissociação.

HIG2 (F)	CTTCTGAGGATCTAGCAGCAGA
HIG2 (R)	CAACATGATGCCAGCACAT
Ciclina D1 (F)	CTGCTGCAAATGGAACTGCTTC
Ciclina D1 (R)	CTCATCCGCCTCTGGCATT
Bcl-xL (F)	GGCTGGGACACTTTTGTGGAT
Bcl-xL (R)	AAGAGTGAGCCCAGCAGAACC
C-myc (F)	CTGAGCCCCTAGTGCTGCAT
C-myc (R)	TTGCCTCTTCTCCACAGACACC

Tabela 5: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR.

6.7.4. Quantificação relativa por qRT-PCR

As análises por PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando os reagentes “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, USA) e *primers* específicos para o transcrito de interesse. O gene endógeno GAPDH foi utilizado como normalizador da reação. A fórmula utilizada para calcular a expressão relativa dos genes foi: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ *estimulado* / $2^{-\Delta C_t}$ *não estimulado*).

7. RESULTADOS

Após a ativação da via Wnt/ β -catenina por meio da utilização de vários inibidores da proteína GSK3 β , a expressão de alguns de seus genes alvo, como HIG2, Ciclina D1, Bcl-xL e c-myc foi medida através da técnica por qRT-PCR. Como gene endógeno, controle da reação, utilizamos o GAPDH e o método de análise foi o $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.1. Experimentos *in vivo*

7.1.1. Tratamento agudo com LiCl (Gavagem)

a. Córtex e Hipocampo (controles positivos)

Primeiramente, a expressão destes genes foi avaliada em hipocampo e córtex de camundongos após tratamento agudo e crônico. Estes resultados foram utilizados como controle positivo dos experimentos, já que a ativação da via Wnt/ β -catenina em tecidos nervosos foi bastante abordada na literatura até o momento.

O primeiro protocolo *in vivo* testado foi o de gavagem, no qual utilizou-se camundongos C57BL/6 tratados com LiCl 350mg/kg e analisados por 2, 6 ou 12 horas. A concentração e tempo de tratamento foram definidos de acordo com dados prévios da literatura (114-116). A fim de verificar a efetividade do tratamento com LiCl, a concentração de lítio no plasma dos animais foi medida e verificou-se que a mesma estava adequada, apresentando valores entre 0,5 e 1,5mEq/L, que é a medida de referência para atividade terapêutica (117, 118) (**figura 9**).

Nas **figuras 10 e 11** verifica-se aumento significativo na expressão dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina em hipocampo e córtex de camundongos que foram submetidos à gavagem com LiCl, com relação aos animais controles tratados com

salina. Este resultado sugere que o tratamento agudo dos camundongos com LiCl é capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina em tecidos cerebrais.

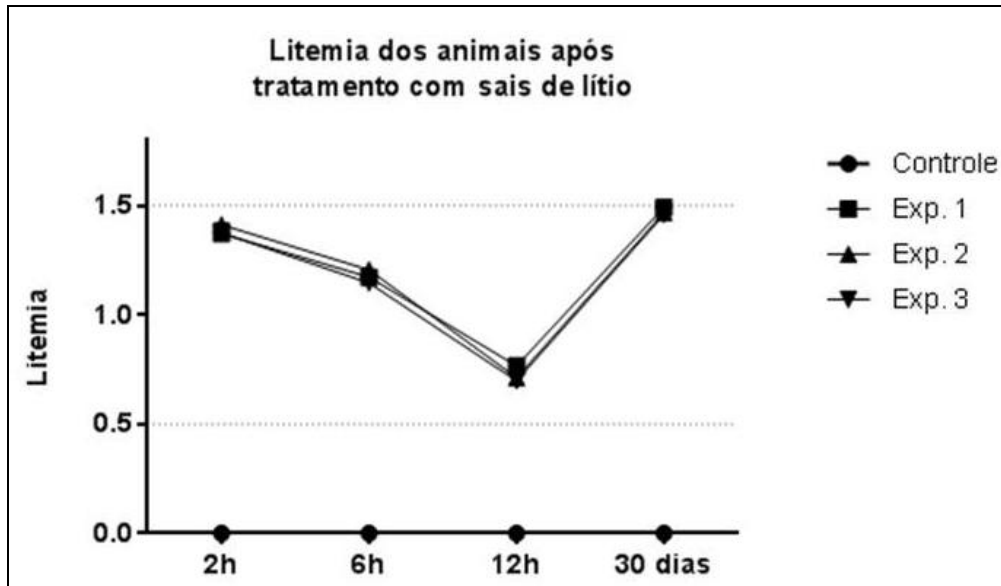


Figura 9. Medida da litemia no sangue periférico de camundongos após tratamento com sais de lítio. Litemia dos animais após gavagem com 300 μ l de solução de LiCl 350mg/kg ou 300 μ l de salina (controles) nos tempos de 2, 6 e 12 horas. Litemia dos animais submetidos ao tratamento crônico com ração sem Li₂CO₃ (controles) ou com 2g/kg de Li₂CO₃ por 30 dias. A litemia dos animais controles foi igual a 0 em todos os tempos e tratamentos e o restante apresentou-se dentro da faixa terapêutica de LiCl no sangue (0,5 a 1,5mEq/L). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 3 animais em cada experimento realizado (n=3).

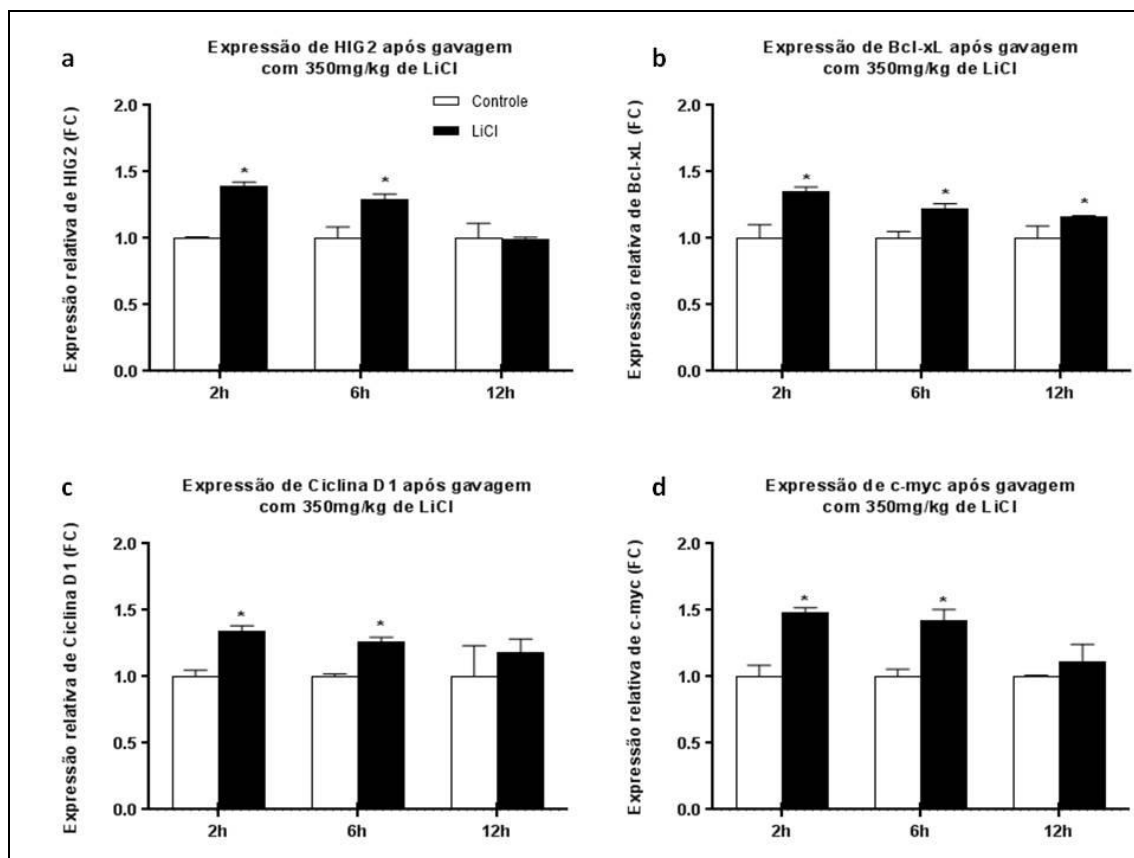


Figura 10. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Hipocampo após gavagem. Para cada tempo testado, dois grupos (n=3) de camundongos C57BL/6 machos receberam 300 μ l de solução de LiCl 350mg/kg ou 300 μ l de salina por gavagem. Após sacrifício, o hipocampo destes animais foi extraído e processado para avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

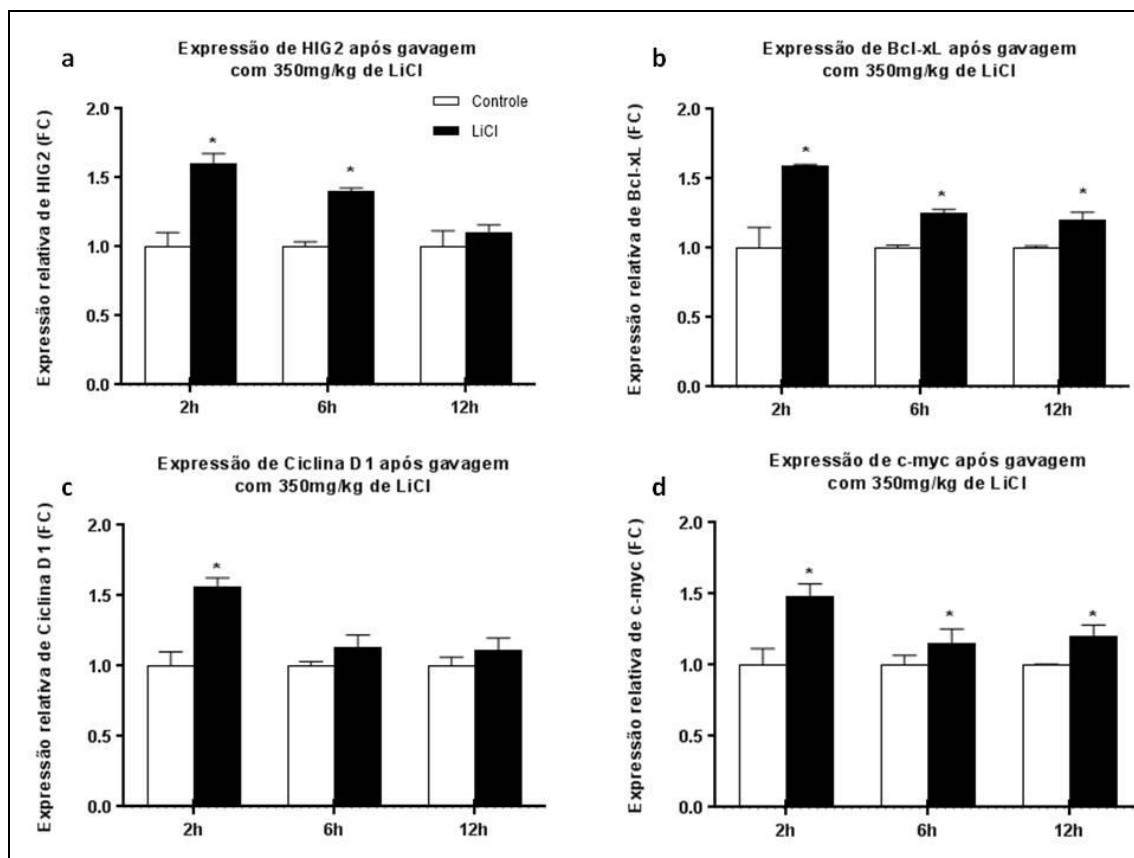


Figura 11. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Córtex após gavagem. Para cada tempo testado, dois grupos ($n=3$) de camundongos C57BL/6 machos receberam por gavagem 300 μ l de solução de LiCl 350mg/kg ou 300 μ l de salina. Após sacrifício, o córtex destes animais foi extraído e processado para avaliação da expressão gênica dos alvo da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/- erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p<0,01$. 1 experimento representativo de 3.

b. Esplenócitos e células T CD4+

A expressão dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina foi avaliada em esplenócitos e células T CD4+ do baço de camundongos após tratamento agudo, com objetivo de verificar se a utilização de inibidores de GSK3 β é capaz de ativar a via em células do sistema imune, o que ainda foi pouco descrito na literatura até o momento.

Na **figura 12** verificamos que não houve aumento na expressão de nenhum dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos de camundongos que foram submetidos à gavagem com LiCl comparado aos animais submetidos ao tratamento com salina. Ao contrário, é possível verificar uma tendência de inibição da via nestas células.

O principal objetivo do trabalho é avaliar a ativação em células T CD4+, portanto as mesmas foram purificadas a partir de esplenócitos e submetidos ao tratamento com inibidores de GSK3 β . A avaliação do processo de purificação de células T CD4+, após a utilização de kit de separação magnética, foi realizada por citometria de fluxo. Verificou-se no pool de esplenócitos totais, sem separação, frequência de 14,6% de células T CD4+ que após enriquecimento foi de 75,1% (**Figura 13**).

Na **figura 14** verificamos que não houve aumento na expressão dos genes alvo analisados em células T CD4+ de camundongos que foram submetidos à gavagem. Tais resultados sugerem que o tratamento agudo com LiCl não é capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina em células TCD4+ e células esplênicas em nenhuma concentração ou tempo analisados.

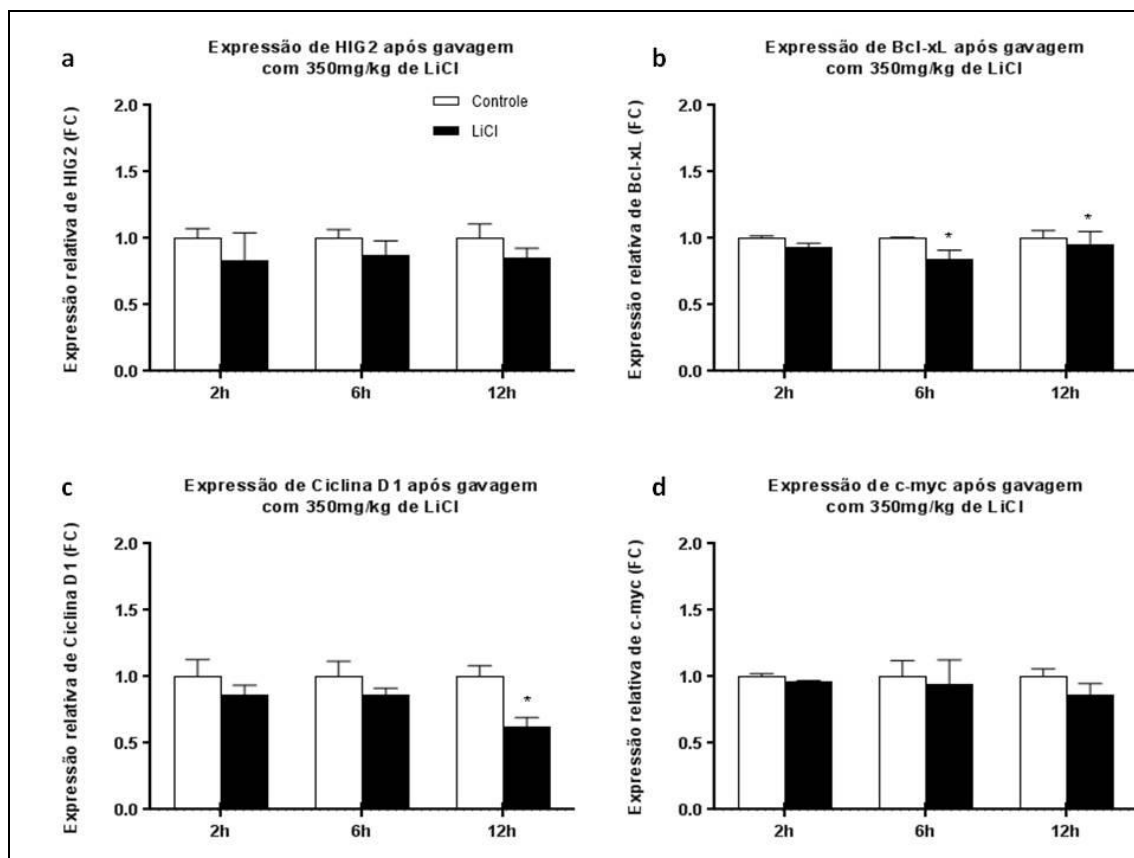


Figura 12. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Esplenócitos totais após gavagem. Para cada tempo testado, dois grupos (n=3) de camundongos C57BL/6 machos receberam por gavagem 300 μ l de solução de LiCl 350mg/kg ou 300 μ l de salina. Após sacrifício, o baço destes animais foi extraído e processado para obtenção de esplenócitos totais. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

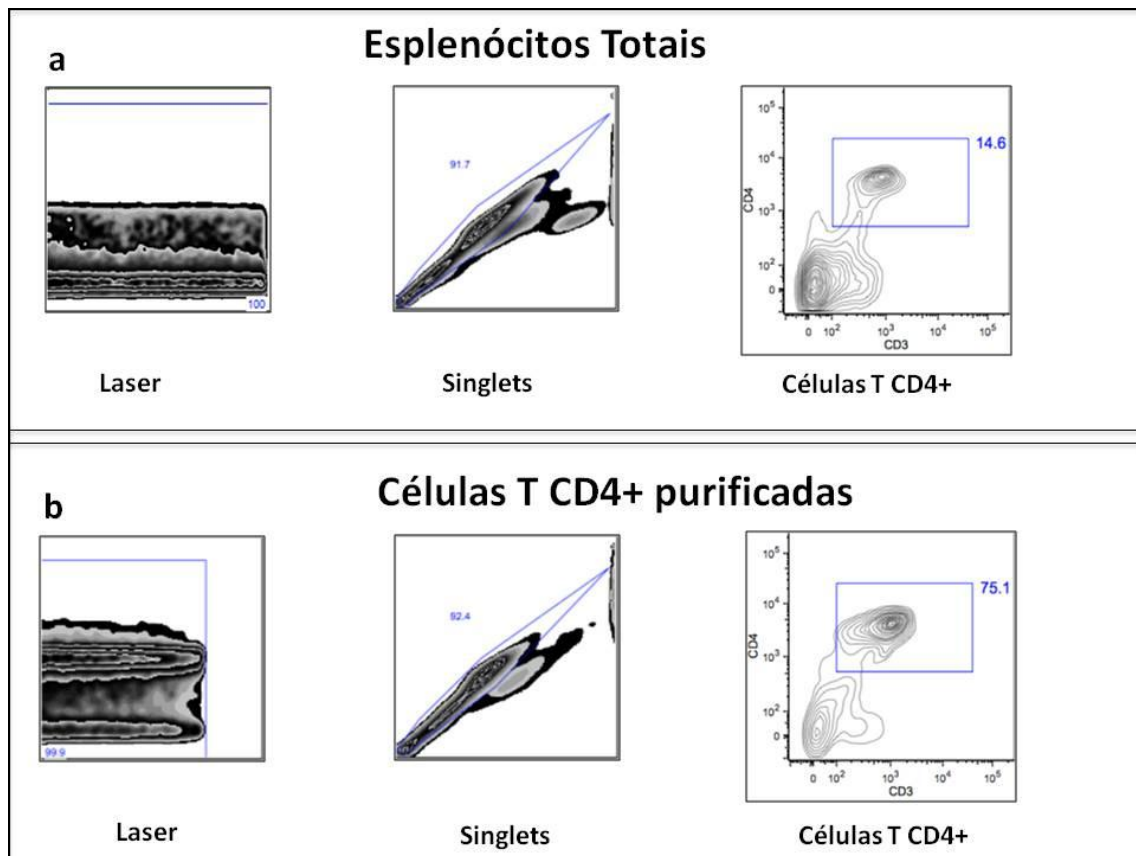


Figura 13. Estratégia de análise de citometria para avaliação do grau de pureza da separação de células T CD4+ derivadas de esplenócitos totais. a) esplenócitos totais, b) células T CD4+ purificadas. Foram utilizados os seguintes parâmetros de qualidade: *Time x PE* – verificação do status do laser; *Singlets* – exclusão de células duplicadas. A população de células T CD4+ foi separada utilizando os marcadores CD4 (PE-Cy7) e CD3 (PE-A). Análise realizada em *Software Flowjo* (versão 9.4.3, TreeStar).

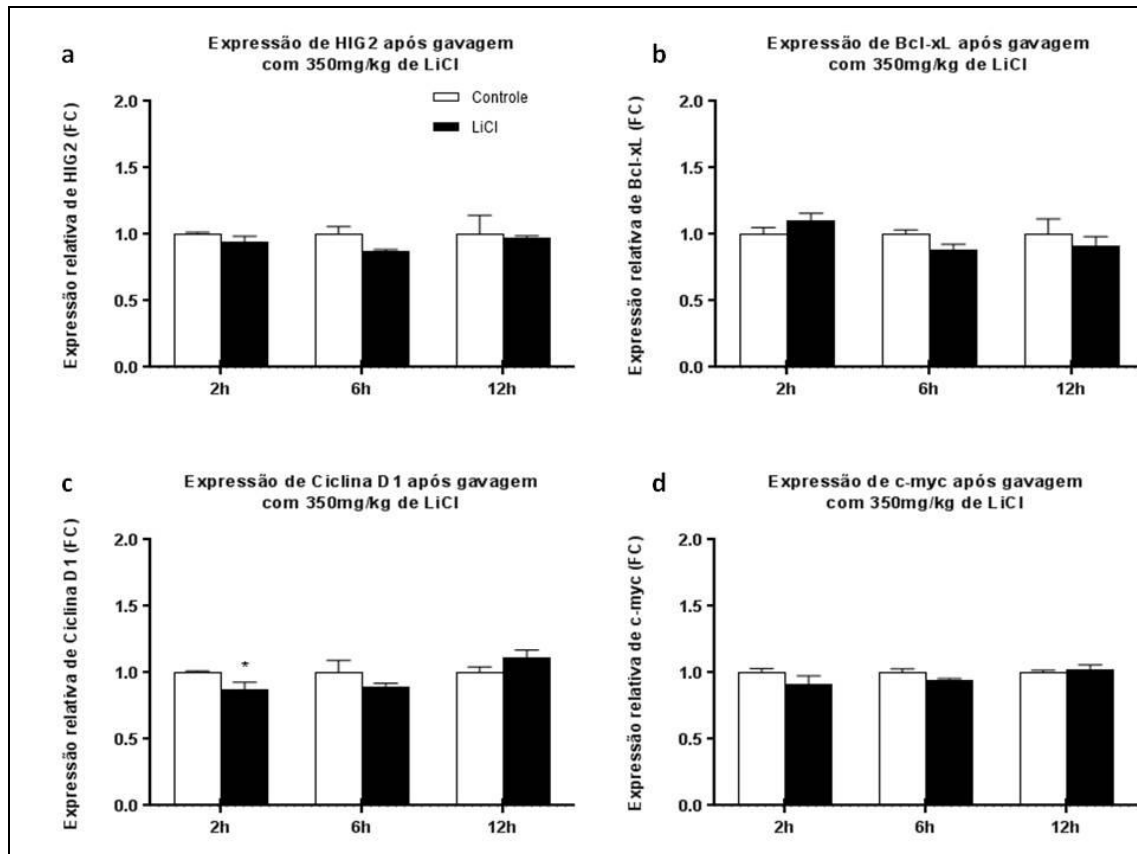


Figura 14. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Células T CD4⁺ purificadas, após gavagem. Para cada tempo testado, dois grupos (n=3) de camundongos C57BL/6 machos receberam por gavagem 300 μ l de solução de LiCl 350mg/kg ou 300 μ l de salina. Após sacrifício, o baço destes animais foi extraído e processado para obtenção de esplenócitos totais que foram purificados para separação de células T CD4⁺. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e p<0,01. 1 experimento representativo de 3.

7.1.2. Tratamento crônico com Li_2CO_3 (ração)

a. Córtex e Hipocampo (controles positivos)

Após realização do tratamento com LiCl por gavagem, o segundo protocolo *in vivo* testado foi o tratamento crônico dos camundongos com Li_2CO_3 , a fim de avaliarmos se a ativação da via Wnt/ β -catenina pode ser alterada mediante o tempo de tratamento dos animais. Os animais receberam ração sem Li_2CO_3 ou ração com 2g/kg de Li_2CO_3 por 30 dias (112). A litemia no plasma destes animais foi medida e todos àqueles tratados apresentaram valores adequados entre 0,5 a 1,5mEq/L (**Figura 9**).

Como demonstrado na **figura 15**, houve aumento significativo na expressão dos genes alvo da via em Hipocampo e Córtex dos camundongos tratados com Li_2CO_3 em relação àqueles tratados com ração sem Li_2CO_3 . (controles positivos). Este resultado sugere que o tratamento crônico de camundongos com Li_2CO_3 , bem como o tratamento agudo com LiCl demonstrado anteriormente, é capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina em Córtex e Hipocampo de animais tratados com inibidores de GSK3 β .

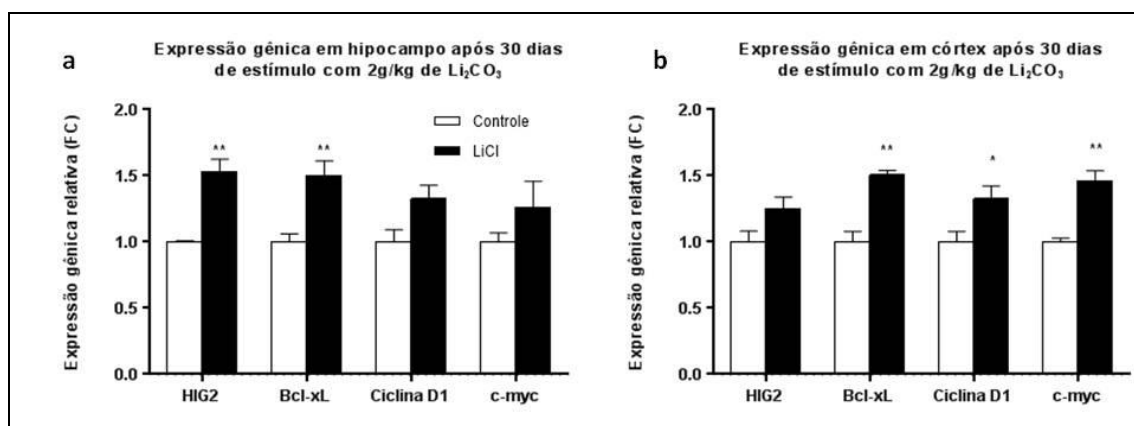


Figura 15. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em Hipocampo e Córtex após tratamento crônico com Li_2CO_3 . Dois grupos (n=5) de camundongos C57BL/6 machos receberam ração sem Li_2CO_3 ou com 2g/kg de Li_2CO_3 . Após sacrifício, a avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, HIG2, Bcl-xL, Ciclina D1 e c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. Esta análise foi feita em **a)** hipocampo e **b)** córtex dos camundongos. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ($2^{-\Delta\text{Ct}}$ tratado/ $2^{-\Delta\text{Ct}}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

b. Esplenócitos e células T CD4+

Após análise da ativação da via em animais submetidos ao tratamento agudo, verificou-se esta ativação em esplenócitos totais e células T CD4+ purificadas após tratamento crônico dos animais com Li₂CO₃. Como demonstrado na **figura 16** não houve aumento de expressão dos genes alvo da via Wnt/β-catenina em células esplênicas e T CD4+ dos camundongos tratados. Ao contrário, é possível verificar uma tendência de inibição da via nestas células, conforme foi visto para o tratamento agudo. Isto sugere que o tratamento crônico de camundongos com Li₂CO₃ não é capaz de ativar a via em células esplênicas e T CD4+ no tempo e concentração testados.

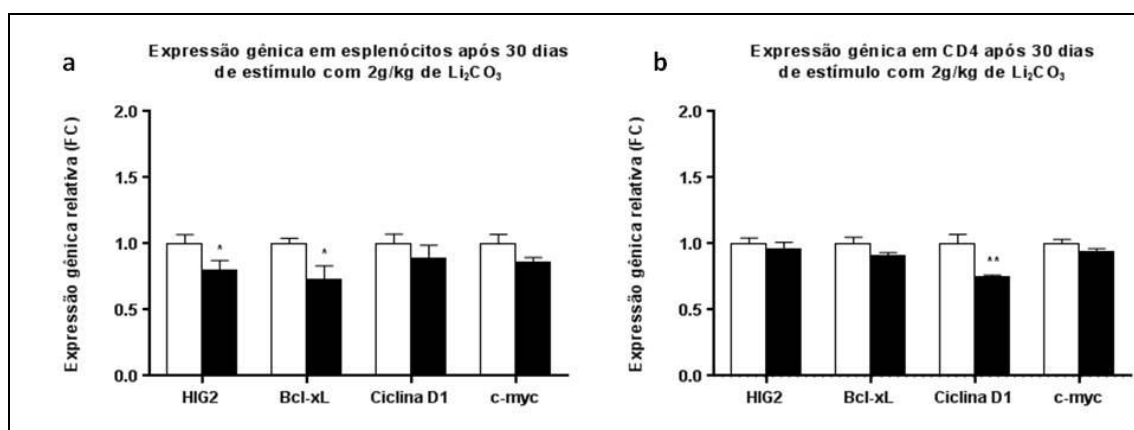


Figura 16. Expressão de genes alvo da via Wnt/β-catenina em Esplenócitos e Células T CD4+ após tratamento crônico com Li₂CO₃. Dois grupos (n=5) de camundongos C57BL/6 machos receberam ração sem Li₂CO₃ ou com 2g/kg de Li₂CO₃. Após sacrifício, a avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/β-catenina, HIG2, Bcl-xL, c-myc e Ciclina D1, foi realizada através da reação de qRT-PCR. Esta análise foi feita em **a**) esplenócitos totais e **b**) células T CD4+ dos animais. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

7.2. Correlações

Foi possível verificar aumento da expressão gênica em hipocampo e córtex de camundongos após gavagem dos animais tratados com LiCl. No hipocampo e córtex destes camundongos, verificou-se além do aumento de expressão gênica, uma correlação positiva entre a litemia dos animais e a expressão dos genes HIG2, Bcl-xL, Ciclina D1 e c-myc. Em hipocampo esta correlação foi significativa para os genes HIG2 e c-myc (**Figura 17**) e no córtex para todos os genes avaliados (**Figura 18**). Em contrapartida, a análise de correlação em esplenócitos (**Figura 19**) e células T CD4+ (**Figura 20**) purificadas não foi significativa para nenhum dos genes, exceto Ciclina D1 que apresentou uma correlação positiva em esplenócitos e negativa em células T CD4+.

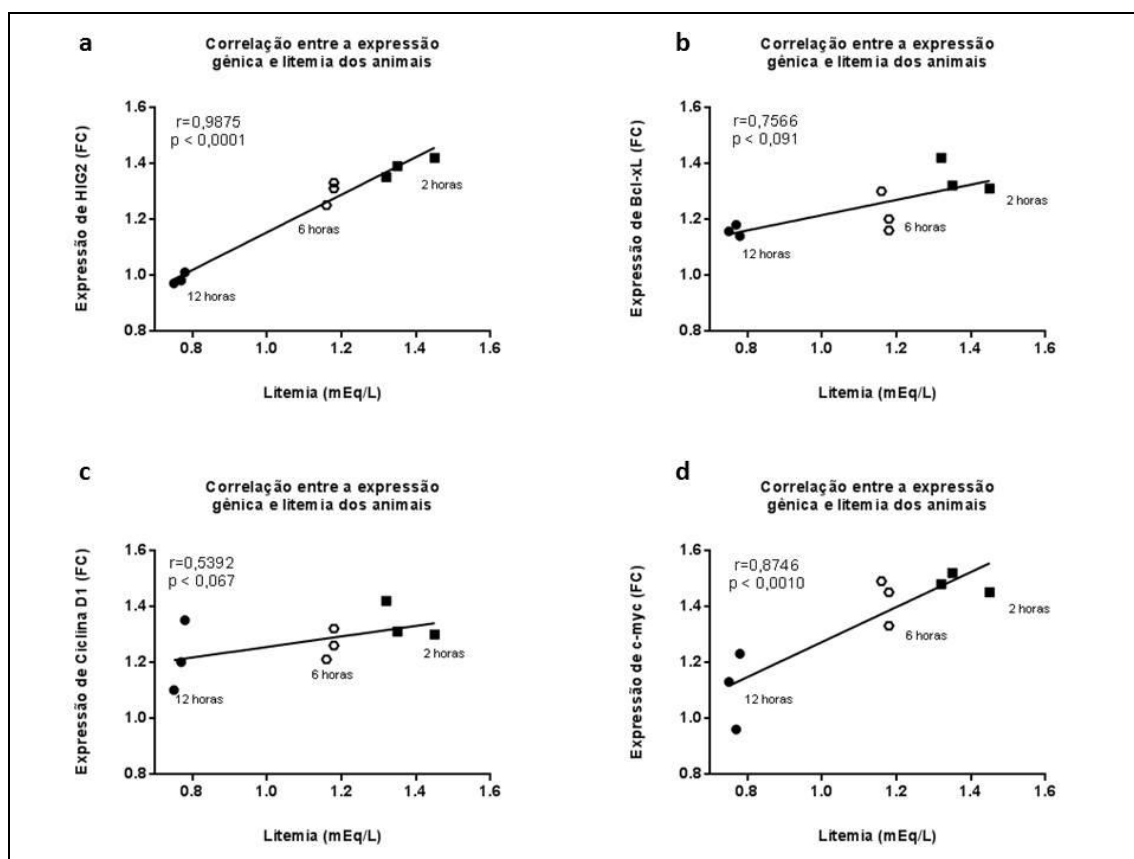


Figura 17. Correlação entre a expressão gênica em hipocampo e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl. Avaliação de existência de correlação entre a litemia no sangue dos animais submetidos à gavagem com LiCl 350mg/kg, nos tempos de 2h, 6h e 12h e a expressão gênica, no hipocampo, de alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc. Os valores de P e R foram calculados pela teste de correlação de Spearman.

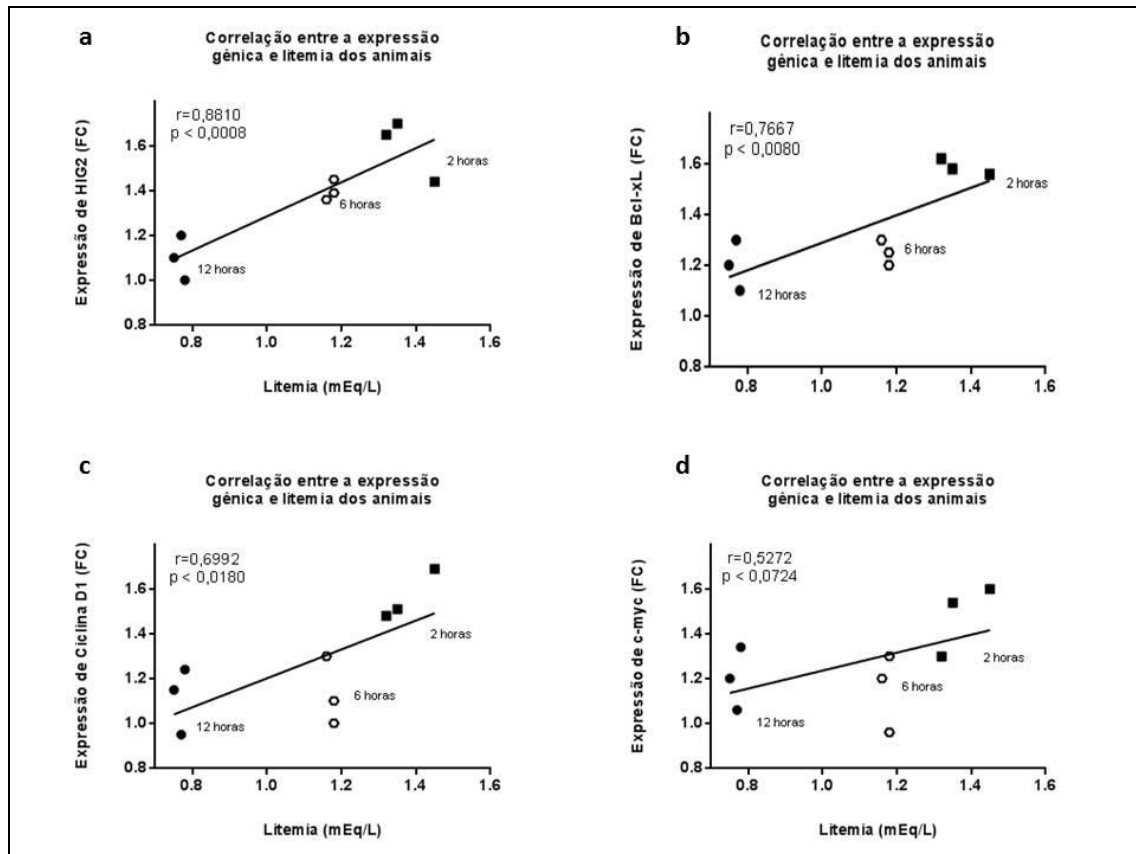


Figura 18. Correlação entre a expressão gênica em córtex e a lítemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl. Avaliação da existência de correlação entre a lítemia no sangue dos animais submetidos à gavagem com LiCl 350mg/kg, nos tempos de 2h, 6h e 12h e a expressão gênica, no córtex, de alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc. Os valores de P e R foram calculados pela teste de correlação de Spearman.

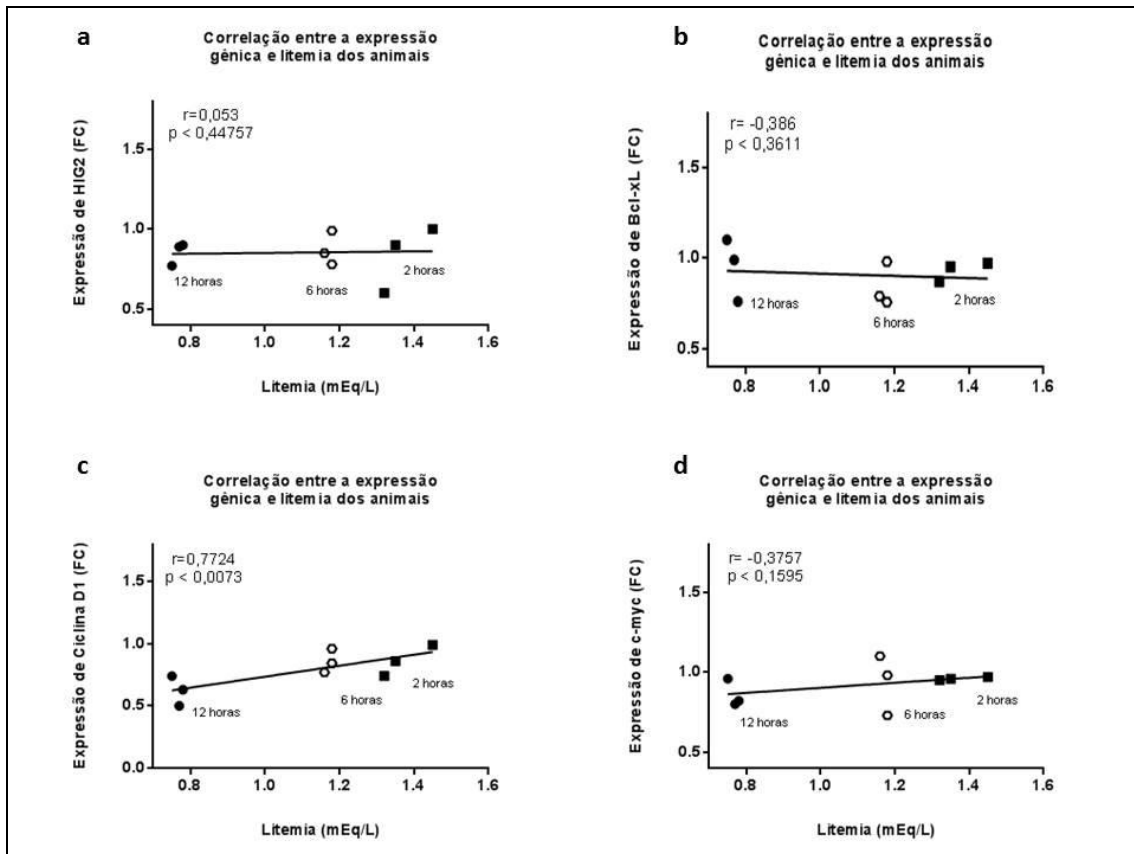


Figura 19. Correlação entre a expressão gênica em esplenócitos e a litemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl. Avaliação da existência de correlação entre a litemia no sangue dos animais submetidos à gavagem com LiCl 350mg/kg, nos tempos de 2h, 6h e 12h e a expressão gênica, em esplenócitos, de alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc. Os valores de P e R foram calculados pela teste de correlação de *Spearman*.

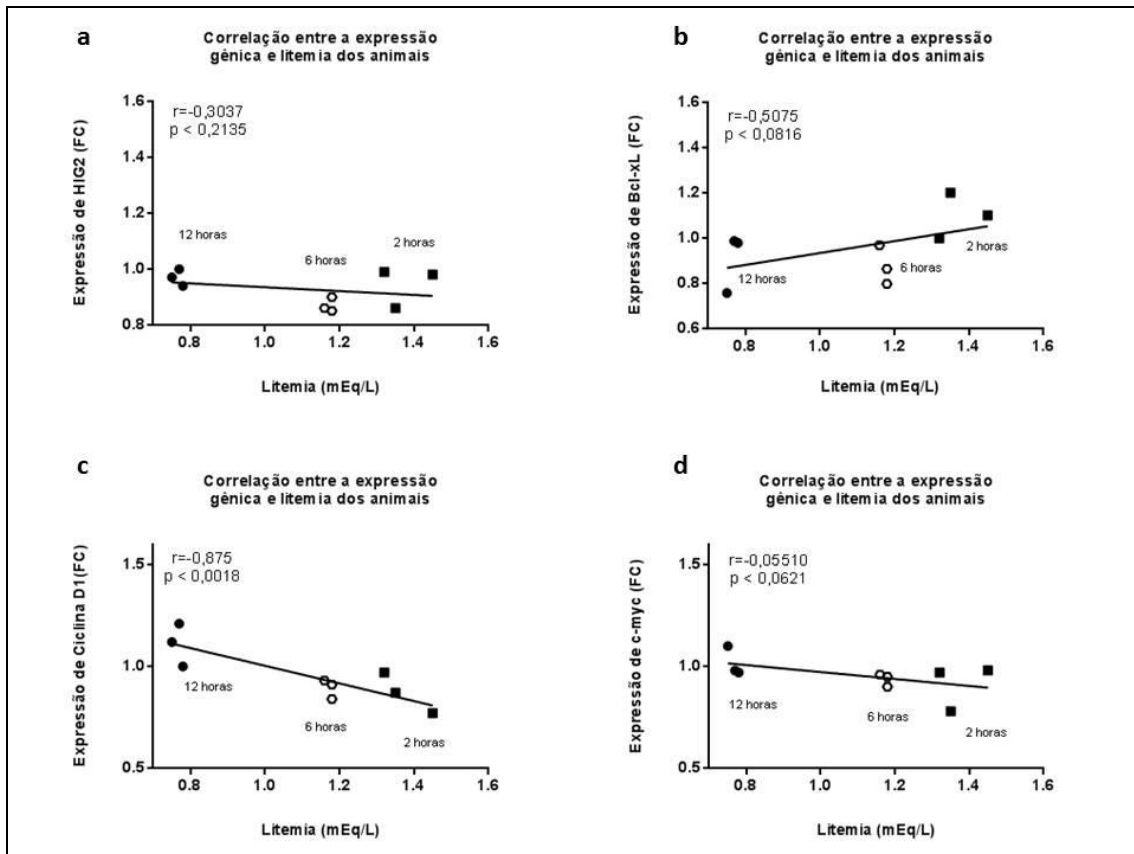


Figura 20. Correlação entre a expressão gênica em células T CD4+ purificadas e a lítemia dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl. Avaliação da existência de correlação entre a lítemia no sangue dos animais submetidos à gavagem com LiCl 350mg/kg, nos tempos de 2h, 6h e 12h e a expressão gênica, em células T CD4+, de alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc. Os valores de P e R foram calculados pela teste de correlação de *Spearman*.

7.3. Experimentos *in vitro*

7.3.1. Células HEK293

Após avaliação da via Wnt/ β -catenina *in vivo*, procedemos para avaliação *in vitro*. Utilizamos células HEK 293T como controle positivo para os ensaios *in vitro*, já que na literatura foi descrito aumento da atividade de GSK3 β sob estímulo com SB e LiCl (69) e aumento do gene *reporter* da β -catenina sob estímulo com SB e CHIR (119).

Após cultura destas células com SB ou LiCl em concentrações e tempos diferentes, verificamos que houve aumento significativo na expressão dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina em relação ao controle (**figura 21**). Isto sugere que é possível induzir esta via em células HEK 293T com inibidores de GSK3 β , como LiCl e SB.

7.3.2. Esplenócitos

Após confirmar a ativação da via Wnt/ β -catenina em células HEK 293T, testamos o poder de indução dos indutores da via (LiCl, SB e CHIR) em células esplênicas. Diferentes tempos e concentrações de estímulo foram utilizados para cada indutor e a expressão de alguns genes alvo da via Wnt/ β -catenina foi avaliada, como descrito anteriormente, por qRT-PCR.

As **Figuras 22, 23 e 24** mostram que não houve aumento na expressão gênica de alvos da via após estímulo com LiCl, SB e CHIR, respectivamente. Ao contrário, verifica-se que após tratamento com LiCl, os níveis de expressão dos alvos diminuíram significativamente com relação ao controle, sendo que para Ciclina D1 e C-myc esta diminuição foi ainda mais significativa do que para Bcl-xL e HIG2 (**Figura 22**). Este mesmo resultado se repete após cultura com SB (**Figura 23**) e CHIR (**Figura 24**), sendo

que ao utilizar o agonista CHIR, verificamos uma diminuição da expressão gênica menos significativa.

Tais resultados sugerem que não é possível ativar a via Wnt/ β -catenina em esplenócitos após indução com LiCl, SB e CHIR nas concentrações e tempos testados, ao contrário do que foi verificado em células HEK 293.

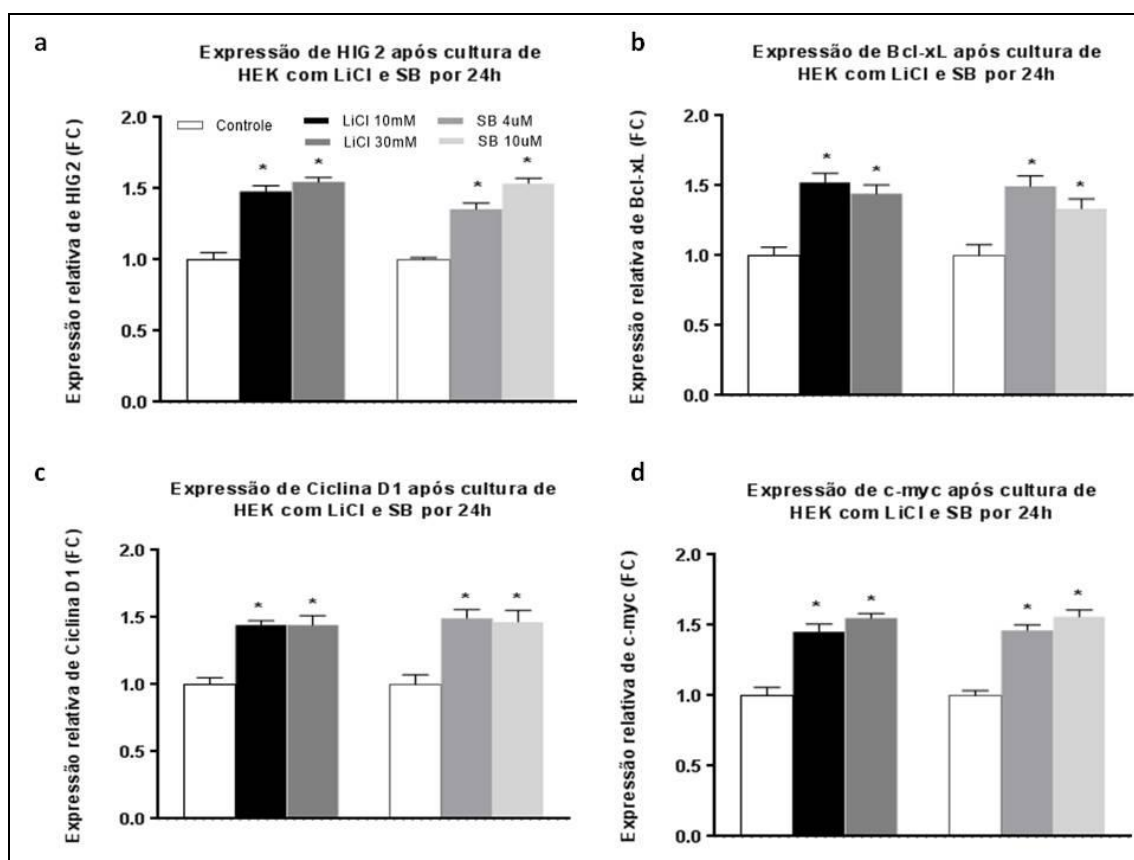


Figura 21. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células HEK após estímulo *in vitro* com SB e LiCl. Células HEK foram estimuladas com diferentes concentrações de SB e LiCl por 24 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC (fold change) +/- erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

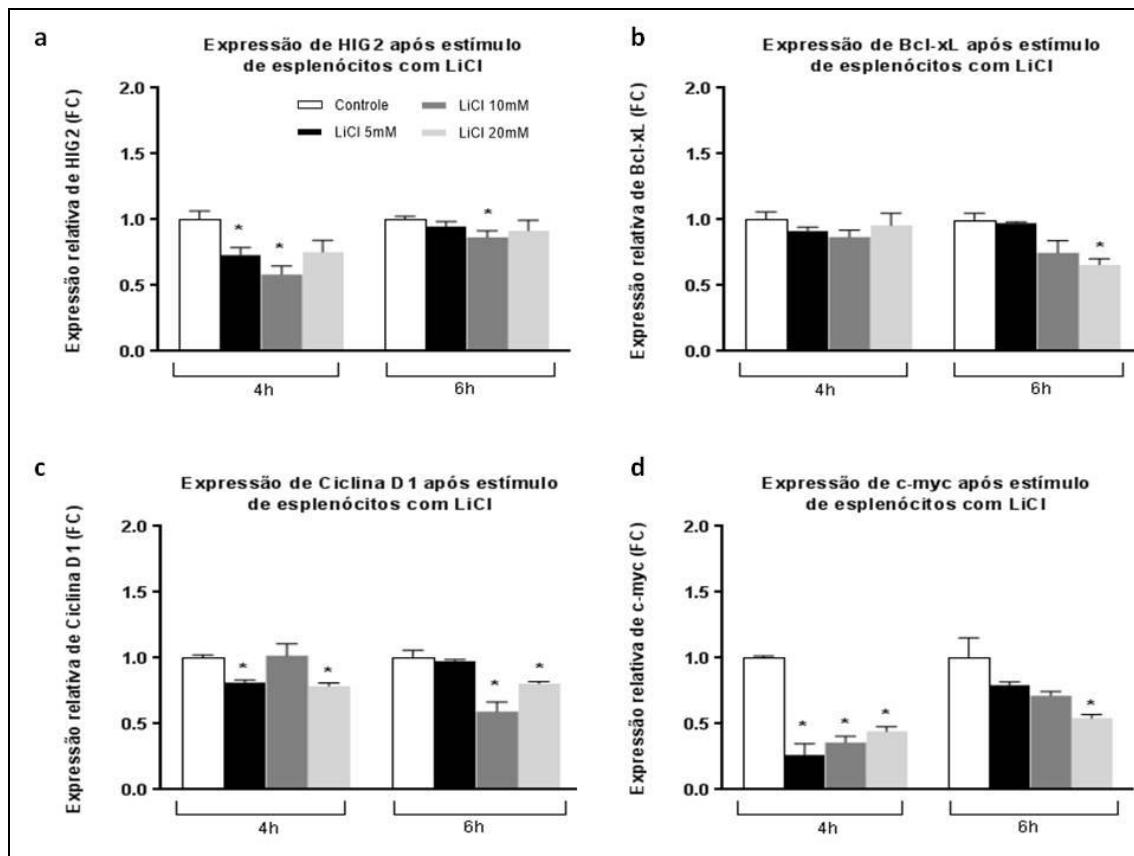


Figura 22. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo *in vitro* com LiCl. Esplenócitos foram estimulados com diferentes concentrações de LiCl por 4 ou 6 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

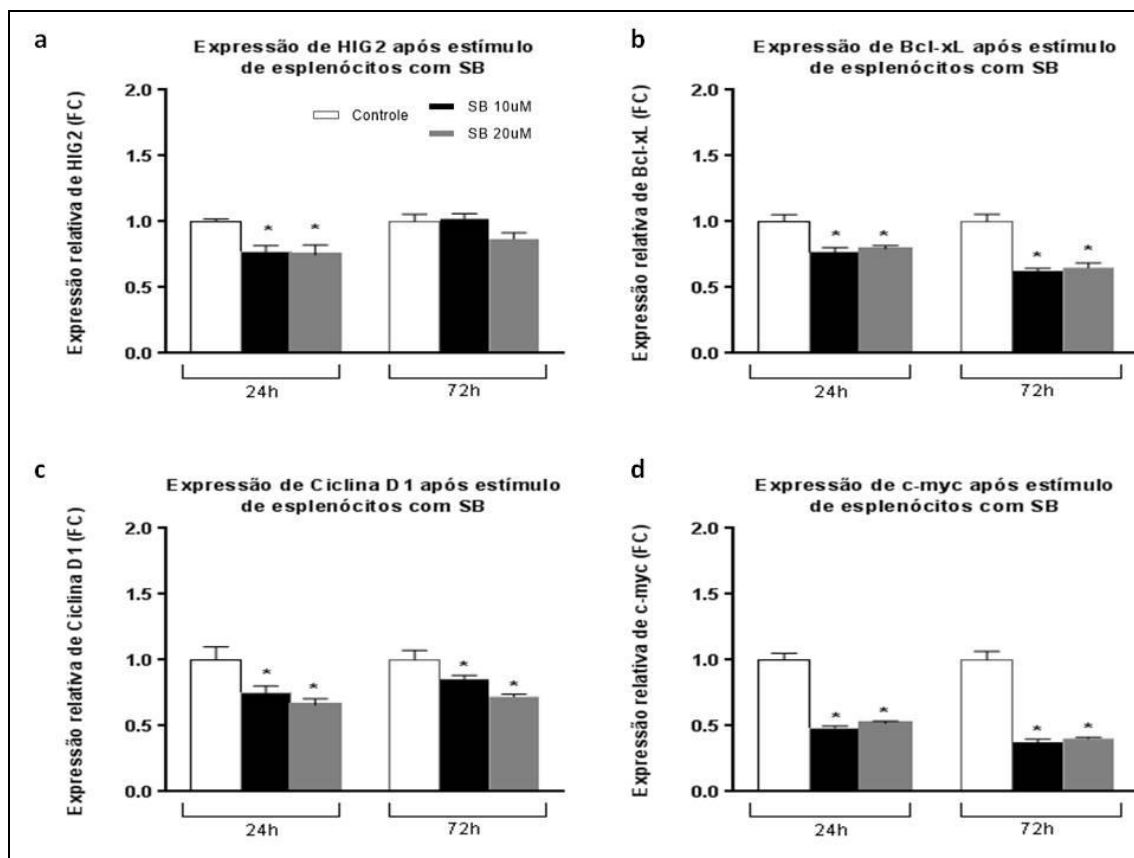


Figura 23. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo *in vitro* com SB. Esplenócitos foram estimulados com diferentes concentrações de SB por 24 ou 72 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC (*fold change*)/ \pm erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

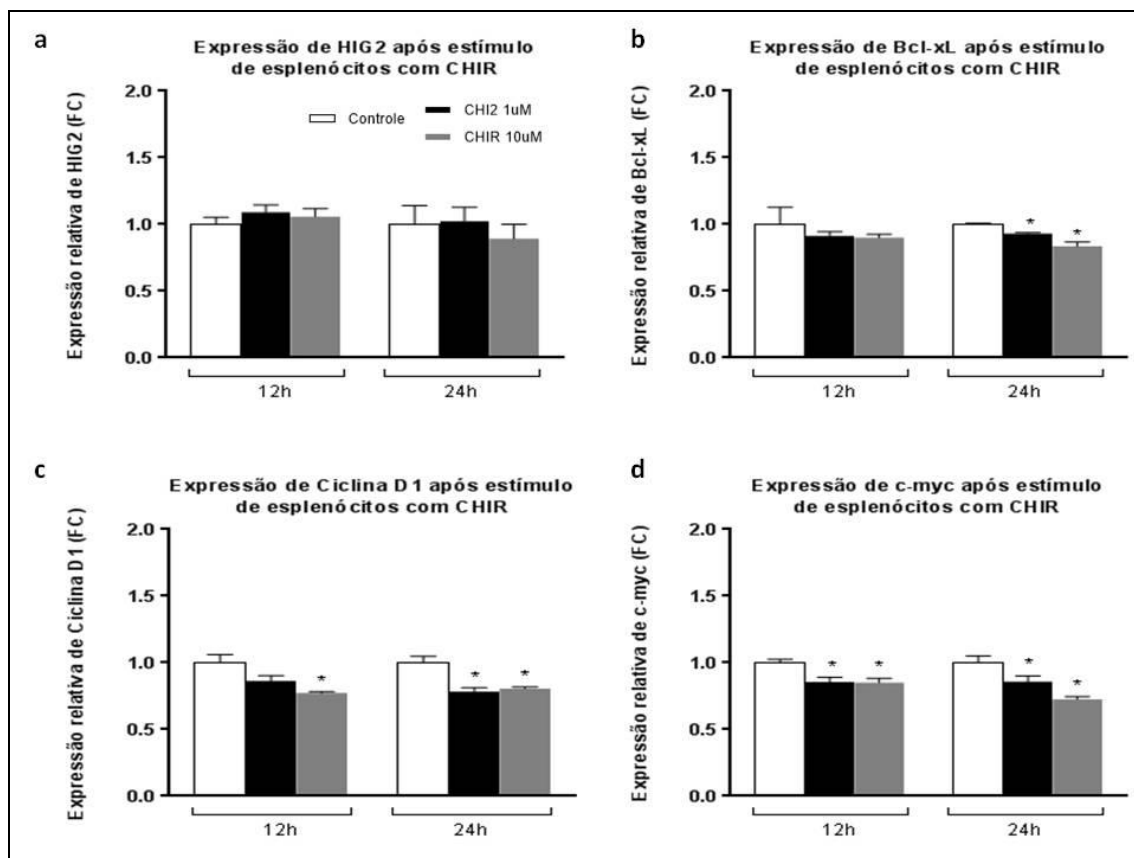


Figura 24. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos totais após estímulo *in vitro* com CHIR. Esplenócitos foram estimulados com diferentes concentrações de CHIR por 12 ou 24 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a)** HIG2, **b)** Bcl-xL, **c)** Ciclina D1 e **d)** c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

7.3.3. Células T CD4+

Por fim e como objetivo principal do trabalho, a indução da via Wnt/ β -catenina foi avaliada em células T CD4+ purificadas a partir de esplenócitos totais submetidas ao tratamento *in vitro*. Utilizou-se os inibidores de GSK3 β descritos anteriormente, nas mesmas concentrações e tempos e a expressão gênica dos alvos foi avaliada por qRT-PCR. Nas **Figuras 25, 26 e 27** verifica-se que não houve aumento na expressão gênica de alvos da via após estímulo com LiCl, SB e CHIR, respectivamente. Assim como nos esplenócitos, verifica-se diminuição significativa com relação ao controle, na expressão dos alvos após indução com os agonistas da via em alguns tempos e concentrações. Analisando separadamente, após tratamento com LiCl é possível verificar diminuição significativa na expressão de Bcl-xL, Ciclina D1 e c-myc em quase todos os tempos e concentrações (**Figura 25**). Por outro lado, após cultura com SB, verifica-se diminuição significativa da expressão de HIG2 após 72h de estímulo com SB 20uM e de c-myc após 24h de estímulo com SB 10uM (**Figura 26 a, d**). E por último, após estímulo com CHIR, verificou-se diminuição na expressão dos genes HIG2, Ciclina D1 e c-myc (**Figura 27**).

Tais resultados sugerem que não é possível ativar a via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após indução com LiCl, SB e CHIR nas concentrações e tempos testados. No entanto, a utilização deste inibidores da proteína GSK3 β demonstrou não alterar ou induzir a diminuição da ativação da via Wnt/ β -catenina.

Adicionalmente, foi realizado em células T CD4+ estímulo com ativador específico anti-CD3/CD28 por 6 horas, LiCl 10mM por 6 horas e SB 20uM por 24 horas. Não pudemos verificar aumento na expressão gênica dos alvos da via, mesmo após estímulo com anti-CD3/CD28 em nenhuma condição ou tempo testado (**figura 28**).

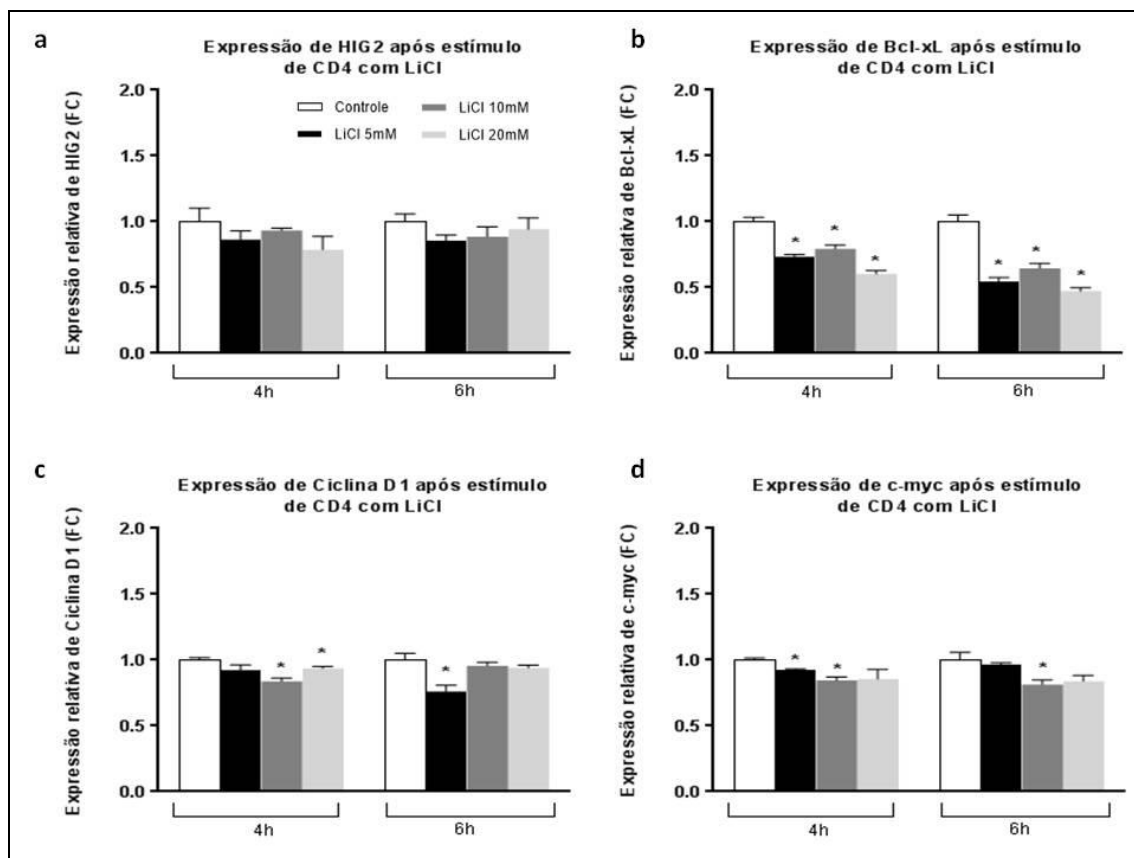


Figura 25. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo *in vitro* com LiCl. Células T CD4+ purificadas foram estimuladas com diferentes concentrações de LiCl por 4 ou 6 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(*fold change*)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

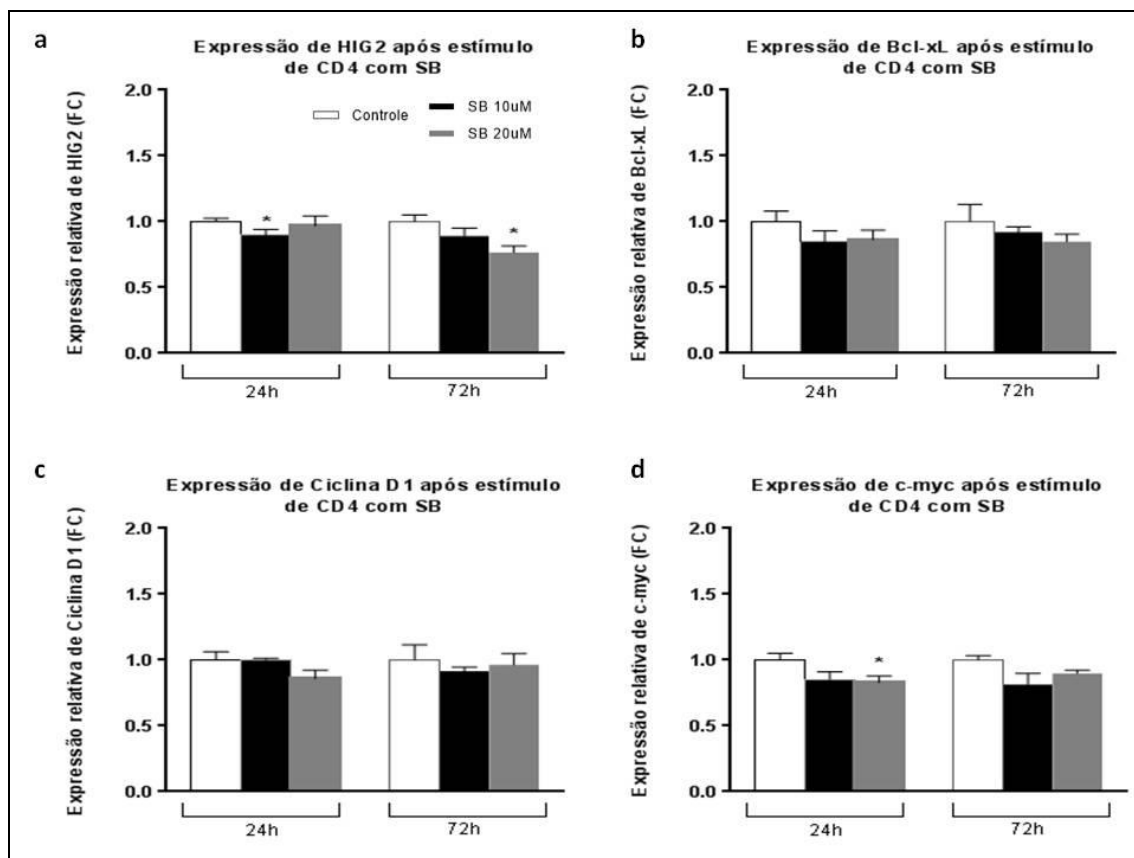


Figura 26. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo *in vitro* com SB. Células T CD4+ purificadas foram estimuladas com diferentes concentrações de SB por 24 ou 72 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(*fold change*)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

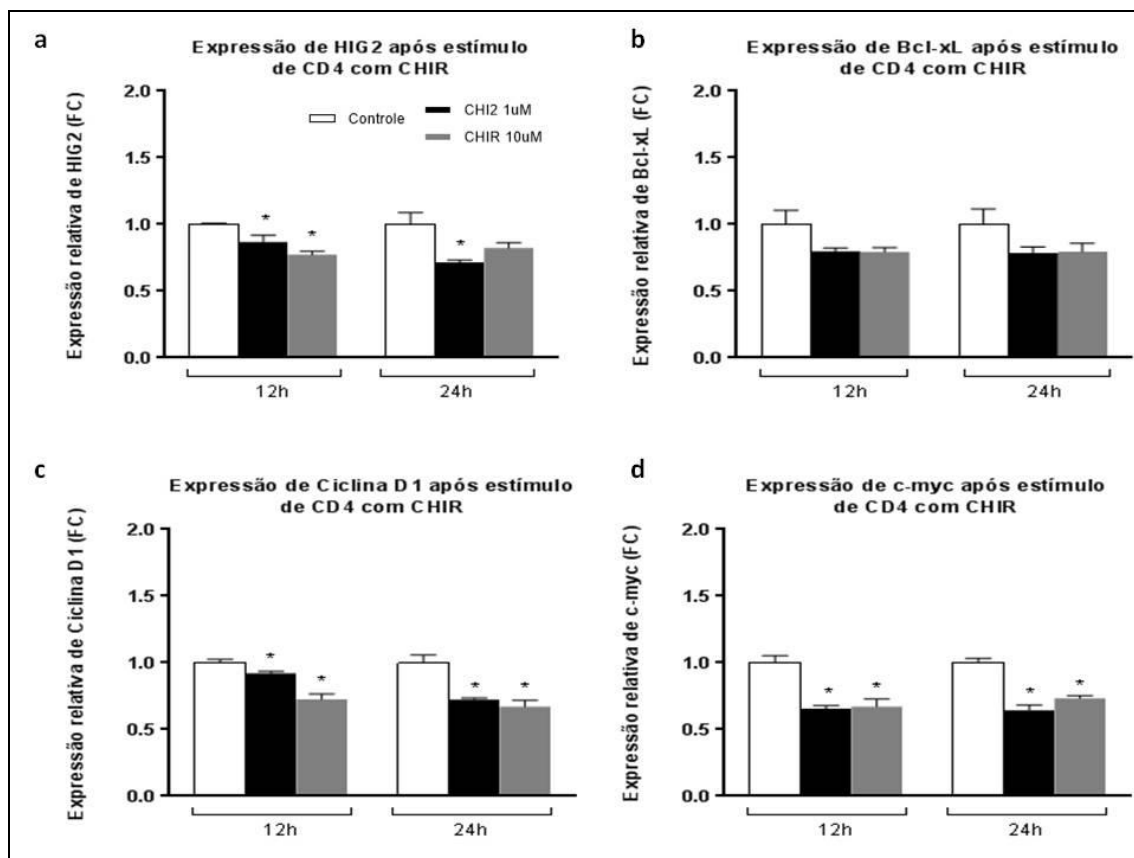


Figura 27. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4+ após estímulo *in vitro* com CHIR. Células T CD4+ purificadas foram estimuladas com diferentes concentrações de CHIR por 12 ou 24 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, **a**) HIG2, **b**) Bcl-xL, **c**) Ciclina D1 e **d**) c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$ tratado/ $2^{-\Delta Ct}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(*fold change*)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney*, *one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

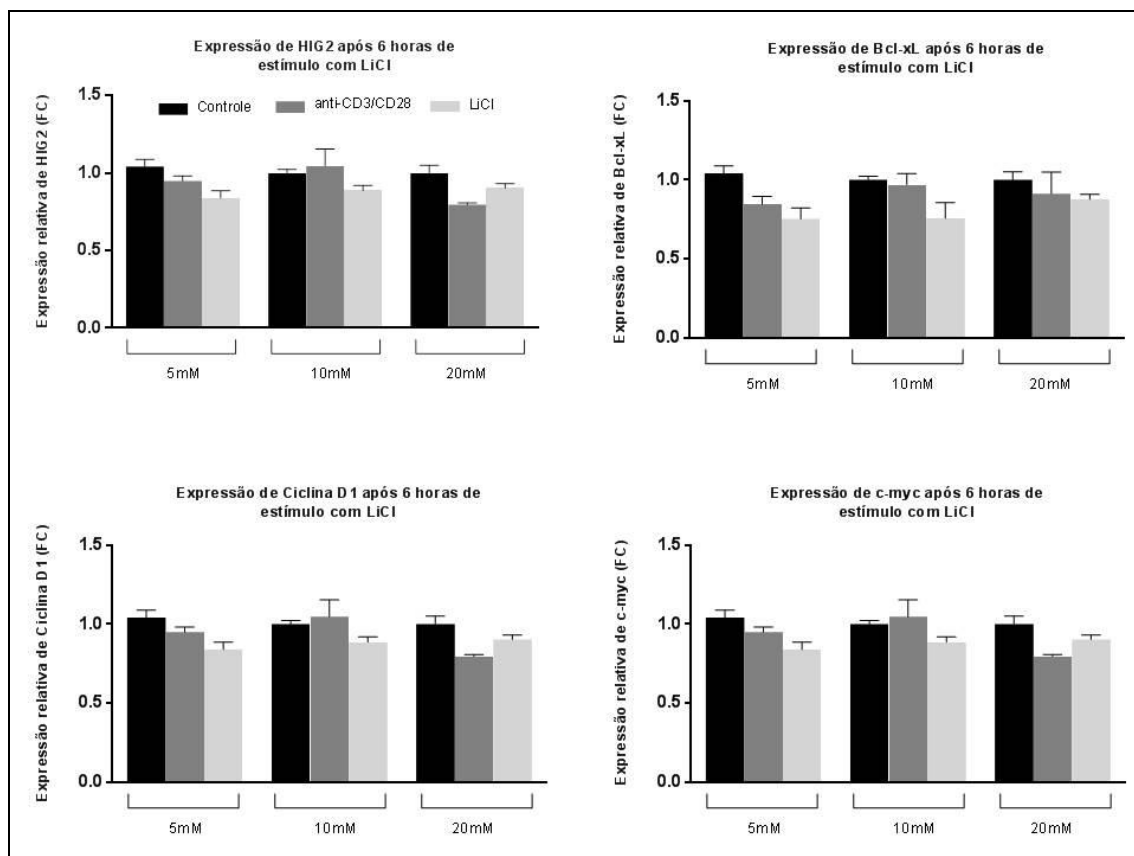


Figura 28. Expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com LiCl ou antiCD3/CD28. Células T CD4⁺ purificadas foram estimuladas com diferentes concentrações de LiCl ou antiCD3/CD28 por 6 horas. A avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, a) HIG2, b) Bcl-xL, c) Ciclina D1 e d) c-myc, foi realizada através da reação de qRT-PCR. O método de avaliação utilizado foi a análise de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($2^{-\Delta C_t}$ tratado/ $2^{-\Delta C_t}$ não tratado), sendo o resultado expresso em média de FC(fold change)+/-erro padrão da média. O gene GAPDH foi utilizado como endógeno para normalizar a reação. Para análise estatística foi aplicado o teste t, *Mann-Whitney, one-tailed* e $p < 0,01$. 1 experimento representativo de 3.

8. DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos que o tratamento *in vivo* de camundongos que apresentavam níveis de litemia farmacologicamente ativos, não foi suficiente para ativar a via Wnt/ β -catenina, avaliada pela expressão de 4 genes alvo, em esplenócitos e células T CD4+, embora tenham promovido ativação em tecidos cerebrais (hipocampo e córtex). O tratamento *in vitro* com LiCl, ou com os inibidores específicos da GSK3 β , SB ou CHIR, também não foi capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina em esplenócitos e células T CD4+, embora tenham promovido ativação da via na linhagem celular HEK293.

Mesmo utilizando-se diferentes concentrações e tempos de cultura, os tratamentos com sal de lítio (LiCl) ou com inibidores específicos da GSK3 β (SB ou CHIR) não foram capazes de ativar a via Wnt/ β -catenina *in vitro*, em esplenócitos e células T CD4+. A ativação da via Wnt/ β -catenina com sais de lítio já foi demonstrada em diferentes células, como em mioblastos (59, 60), células de Schawn (57), células foliculares de ovário (61), células intersticiais da medula renal (62), linhagem celular do hipocampo (58), e em outras linhagens celulares, como 5TGM1 (114). Estudos relatam a ativação da via Wnt/ β -catenina após estímulo *in vitro* com o inibidor específico de GSK3 β SB em linhagens celulares (J1 mESC, HEK293) e em células adrenais (119, 120); e após utilização do inibidor específico CHIR, em linhagem celulares mESC, H4IIE e HEK293 (119, 121). Contudo, nenhum dos testes de ativação da via Wnt/ β -catenina com os inibidores específicos SB ou CHIR foi realizado em esplenócitos ou células T CD4+.

Adicionalmente, nossos resultados indicam que a via Wnt/ β -catenina foi induzida em linhagem celular HEK293 após cultura com LiCl ou SB. A ativação desta via foi descrita na literatura em células HEK293 após tratamento com SB, aumentando

de forma dose-dependente a transcrição do complexo regulador da transcrição β -catenina-LEF/TCF-1 (69, 119). Somado a isso, em células HEK293 estimuladas com Wnt5, na presença de FZD4, verificou-se ativação da via Wnt/ β -catenina (16). Portanto, sugere-se que a modulação desta via *in vitro* com proteínas Wnt ou inibidores de GSK3 β , possa ocorrer de acordo com o tipo celular analisado.

Além dos ensaios *in vitro*, realizamos tratamento *in vivo* com sais de lítio para ativação da via Wnt/ β -catenina. Observamos que a gavagem de animais com LiCl e o tratamento crônico com ração contendo Li₂CO₃ não foi capaz de ativar a via em células esplênicas e linfócitos T CD4+ nos tempos e concentrações testados. Foi descrito que o tratamento de camundongos com LiCl por gavagem ativa a via Wnt/ β -catenina em osteoblastos (114, 115). Dos estudos que utilizam o tratamento com ingestão de ração contendo Li₂CO₃, a maioria avalia células do sistema nervoso central. Após tratamento com este sal pode ocorrer melhoria das funções neurológicas no córtex (112), aumento da captação de glutamato (122) e aumento de BDNF (123). Ademais foi demonstrando que o tratamento longo com sais de lítio é capaz de inibir a proteína GSK3 β (124). No entanto, com relação aos efeitos destes tratamentos crônico não podemos afirmar que estejam relacionados a ativação da via Wnt/ β -catenina.

Como mencionado anteriormente, foi possível observar ativação da via Wnt/ β -catenina em tecidos cerebrais (córtex e hipocampo). Nestes tecidos, verificamos aumento da expressão de todos os genes alvo da via analisados, tanto após tratamento agudo quanto crônico, indicando que nestes tecidos, a via pôde ser ativada sob as condições testadas. A modulação da via Wnt/ β -catenina em tecidos cerebrais foi muito descrita. Sua ativação é importante em AD (125) e sua inibição auxilia no posicionamento neuronal durante o desenvolvimento cortical (126), bem como estimula a perda neuronal no hipocampo de acordo com o aumento da idade em modelos AD

(127). Nos tecidos cerebrais, a ativação da via Wnt/ β -catenina com LiCl ocorre em células progenitoras do hipocampo (AHP), estimulando a sua proliferação e a diferenciação neuronal (128); em animais transgênicos para AD (camundongos CRND8 expressando as mutações *Swedish* e *Indiana* na proteína precursora amiloide humana), promovendo a proliferação celular, diferenciação neuronal, sobrevivência e maturação de células recém-nascidas em SGZGCL (*subgranular zone-granule cell layer*) do hipocampo (125) e protegendo contra a neurodegeneração no hipocampo (129). De forma muito semelhante ao modelo utilizado neste trabalho, Contestabile *et. al.*, demonstram que o tratamento crônico de camundongos durante 4 semanas com ração suplementada com 0,24% de Li₂CO₃, foi capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina e como consequência promover neurogênese no hipocampo (130). Outros tratamentos, além dos sais de lítio, também são capazes de ativar a via Wnt/ β -catenina em tecidos cerebrais, como curcumina, hipóxia e heparina (63, 131, 132). Com base na literatura e nos resultados após tratamento *in vivo*, podemos sugerir que a indução da via Wnt/ β -catenina se comporta diferentemente de acordo com o tipo tecido analisado.

Adicionalmente, neste trabalho foi possível verificar uma correlação positiva, entre a litemia e a expressão dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina, no hipocampo e córtex dos animais submetidos ao tratamento agudo com LiCl. Duas horas após gavagem, verificamos alta concentração de LiCl no sangue e níveis elevados na expressão dos genes alvo, já no tempo de 12 horas após gavagem verificamos baixa concentração de LiCl no sangue e menor expressão dos genes alvo. Portanto, podemos sugerir que a indução da expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina se comporta de forma dose-dependente com a concentração plasmática dos níveis do íon Li⁺. É importante assinalar que tanto no tempo de 2h como o de 12h, a litemia ainda estava na faixa tida como farmacologicamente ativa. Não foi encontrado na literatura nenhum

estudo correlacionando os níveis de lítio no sangue com a expressão de genes alvo da via Wnt/ β -catenina, em camundongos ou seres humanos.

Além dos modelos de indução da via Wnt/ β -catenina, é importante abordarmos os métodos de avaliação utilizados, para verificar se os mesmos podem interferir nas respostas encontradas. Nossos resultados mostraram que através da utilização de qRT-PCR para avaliação da expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, HIG2, Ciclina D1, Bcl-xL e c-myc, não foi possível verificarmos sua ativação em esplenócitos e células T CD4⁺ murinas. Outros trabalhos utilizam a mesma técnica e método de avaliação da expressão gênica (qRT-PCR de genes alvo da via) que foi utilizada no presente trabalho. Em alguns destes estudos, verifica-se aumento da expressão gênica de Ciclina D1 e Axina2 em células foliculares ovarianas (61) e de Axina2 em linhagem celular de mieloma 5TGM1 (114), de Ahr, Nk2d e axina2 em osteoblastos (115) e Bcl-xL e c-myc em células T regulatórias (110). Ademais, a ativação da via Wnt/ β -catenina após estímulo com LiCl *in vitro*, também pode ser avaliada por meio de técnicas de WB para as fosfoproteínas GSK3 β , β -catenina e a proteína alvo Ciclina D1 (57, 59-61, 114); além disso, a Wnt/ β -catenina pode também ser avaliada por ensaios de translocação nuclear para β -catenina por imunofluorescência (57, 59-61). A indução desta via após ativação com inibidores específicos de GSK3 β (SB e CHIR), foi avaliada por ensaios de luciferase, onde se avalia a expressão de luciferase sob o controle de um promotor de gene alvo da via Wnt/ β -catenina (69, 119), bem como outros ensaios para verificação da atividade de GSK3 β (69). Por fim, em tratamentos *in vivo*, a ativação da via foi verificada por meio de ensaios de luciferase para β -catenina, WB para GSK3 β e avaliação da expressão gênica de Axina2 por qRT-PCR (114, 115).

Outro ponto importante é que a ativação da via Wnt/ β -catenina pode não levar necessariamente à transcrição de seus genes alvo. Usongo *et al* demonstraram que

mesmo com a ativação da via Wnt/ β -catenina em células do epitélio ovariano (OSE) não foi possível observar a expressão do complexo β -catenina/TCF-1, responsável pela transcrição dos genes alvo da via. Neste caso, a despeito da inibição da enzima GSK3 β e estabilização da β -catenina no citoplasma das células, não houve indução do complexo de transcrição β -catenina/TCF (133). Somado a isso, foi demonstrado que a formação do complexo β -catenina/TCF-1 é suficiente para ativar a transcrição de genes alvo da via Wnt/ β -catenina em células Jurkat, mas não em outras células (134). Outro estudo realizado em células epiteliais aórtica bovina (BAEC) verificou que não ocorre expressão gênica dos alvos da via Wnt/ β -catenina, mesmo após estabilização da β -catenina e formação do complexo transcricional (135). Portanto, a transcrição gênica, pós indução da via Wnt/ β -catenina, ocorre diferentemente nos diversos tipos celulares. Sendo assim, podemos hipotetizar que o comportamento dos esplenócitos e células T CD4+, testados no presente trabalho, seja semelhante ao observado nas células citadas acima. Vale ressaltar que em esplenócitos não existe nenhum estudo de ativação da via Wnt/ β -catenina ou de outras vias de sinalização após estimulação com inibidores de GSK3 β . Na literatura, verificamos que a utilização do LiCl em esplenócitos não tem o objetivo de avaliar a ativação da via Wnt/ β -catenina, mas sim verificar a função do lítio como adjuvante celular (136), sua influência na imunidade mediada por células (137) ou seu papel na prevenção de doenças autoimunes (138).

Além disso, estudos sugerem que os sais de lítio não são específicos para a ativação da via Wnt/ β -catenina, pois a sua utilização já foi relacionada com ativação de outras vias de sinalização e diferentes moléculas, como a via de inositol fosfato (139), ácido araquidônico (140) e no metabolismo de fosfoadenosina fosfato (141). O lítio tem a capacidade de inibir a família de enzimas fosfodiesterases, (142-144) e diminuir os níveis de inositol da via do fosfolípídio fosfatidilinositol (PI) (56, 144), além de ativar a

via de sinalização Akt (145); Ademais, a competição do lítio com magnésio como cofator enzimático pode modular as ações do lítio em diversas vias de sinalização celular, como por exemplo, naquelas mediadas pela proteína G (ligação a GTP e produção de AMP cíclico) (53).

Para explicar nossos resultados com esplenócitos e células T CD4+ murinas, pode-se cogitar que tempos e concentrações dos inibidores da GSK3 β não avaliados neste trabalho; ou ainda que a inibição da GSK3 β , a despeito de não conseguir ativar a via Wnt/ β -catenina em esplenócitos e células T CD4+ nas condições experimentais testadas, poderia ativar outras vias de sinalização (42).

Uma vez que o lítio reconhecidamente influencia outras vias de sinalização intracelular, testamos inibidores mais específicos para proteína GSK3 β (SB e CHIR), e também não foi possível verificar expressão de genes-alvo da via Wnt/ β -catenina. Contudo, apesar da inibição da proteína GSK3 β ativar esta via, a inibição de GSK3 pode resultar em outros efeitos (42, 146) e na ativação de outras vias de sinalização (147). Quando ativada, a GSK3 fosforila diferentes alvos que em sua maioria são fatores de transcrição como STATs (transdutor de sinal e ativadores de transcrição), Nf- κ B, P53, AP-1 (148), membros da família c-Jun, HSF-1, CREB (149), FoxO3a (150) e NF-ATc (fator nuclear de células T ativadas) (151), que não estão relacionados à ativação da via Wnt/ β -catenina. GSK3 também fosforila o inibidor-2, regulador de PP1 (152), a proteína nucleoporina p62 (153), os fatores de transcrição Smad3/4 (154), e os substratos de tecido cortical do cérebro (155). A inibição da GSK3 β pode promover a ativação das vias de STAT (156) e fosforila Mcl-1 que promove a degradação de GSK3 β (157). Somado a isso, a inibição de GSK3 fosforila a proteína *gephyrin*, que diminui a transmissão GABAérgica em neurônios (158).

Alguns receptores de membrana interagem com a GSK3, como os receptores de dopamina (D2), cujo mecanismo de sinalização envolve β -arrestina-PP2A-Akt-GSK3, no qual a GSK3 pode promover sua própria ativação (159). Receptores de serotonina (5HT2B) também interagem com GSK3 e ativa Akt (160). Receptores de proteína G interagem com GSK3, ativando PI3K (161). Por fim, receptores de hormônios como os receptores de insulina, estrogênio e prolactina interagem com GSK3, (42).

Como a GSK3 β atua em outras vias de sinalização, uma futura abordagem para avaliação em células T CD4⁺ seria a eficiência de sua a ativação de genes alvo pelas outras vias já descritas com associações à fosforilação de GSK3 β na literatura (42).

Outro aspecto importante para discutirmos é a influência da via Wnt/ β -catenina em células T CD4⁺ murinas descrita na literatura, já que nosso alvo de estudo foi ativar a via Wnt/ β -catenina em células T CD4⁺. A modulação do fator de transcrição TCF-1 e da proteína β -catenina, pertencentes à via Wnt/ β -catenina e à outras vias de sinalização, tem sido amplamente estudada na regulação dos estágios iniciais do processo de polarização de células T CD4⁺ em Th1, Th2, Th17 ou Treg. Camundongos β -catenina^{-/-} ou TCF^{-/-} são modelos bastante utilizados para avaliação de suas influências na polarização de células T CD4⁺, porém poucos trabalhos utilizam sais de lítio ou inibidores específicos de GSK3 β nesta avaliação (100, 104).

O papel da via Wnt/ β -catenina durante o processo de diferenciação de células T CD4⁺ foi confirmado para células Th2 (103) e também para células Th17. Sabe-se que a utilização do inibidor da via Wnt/ β -catenina sFRP1, induz a polarização para células Th17. Em pacientes com artrite reumatoide, os altos níveis de IL-17 no fluido sinovial estão associados com alta concentração de sFRP1 (108). Por outro lado, foi demonstrado recentemente, de forma bem mais consistente que a ativação da via Wnt/ β -catenina em células T, através da utilização de camundongos CD4CreCtnnb1, no qual a

β -catenina foi estabilizada em células T, pode promover expressão de *Roryt* promovendo inflamação mediada por células Th17 em câncer de colo e colite, estimulando, portanto a polarização de Th17 após ativação da via Wnt/ β -catenina (15). Ademais, a ativação da via Wnt/ β -catenina não foi demonstrada em células T CD4+ maduras e polarizadas Th1, Th2 e Th17. No entanto, um estudo demonstra que o resultado da ativação da via em células Treg polarizadas. Neste trabalho, o tratamento de iTregs humanas com BIO (inibidor de GSK-3 β), LiCl ou SB promove o aumento nos níveis de β -catenina e sua entrada no núcleo das células e aumento da expressão gênica de Axina2, gene alvo da via Wnt/ β -catenina. Esta ativação da via resulta na diminuição da capacidade supressora das Tregs (162).

A ação da inibição da GSK3 β sobre a polarização de linfócitos T CD4+ pode estar relacionada à ativação de outras vias de sinalização, que não a via Wnt/ β -catenina. Foi descrito que a inibição de GSK3 β , utilizando-se camundongos GSK3 $\beta^{-/-}$, siRNA para GSK3 β ou tratamento com inibidores de GSK3 β (Li₂CO₃ e CHIR) bloqueou a produção de IL-6, a ativação de STAT3 e conseqüentemente a polarização para células Th17; tal efeito foi relacionado com ativação da via STAT3 e não da via Wnt/ β -catenina (73). Além disso, durante o processo de diferenciação para células Treg, verificou-se que a inibição de GSK3 β aumentou a diferenciação para iTreg, mas este efeito foi independente da via Wnt/ β -catenina, acontecendo através das vias TGF- β /sMAD3 e ERK (74). A utilização de sais de lítio ou inibidores específicos da GSK3 β em células T CD4+ murinas, como realizada neste trabalho, foi verificada somente nestes dois estudos, inibindo a polarização para Th17 – na verdade a atividade da GSK3 β é necessária para a diferenciação Th17 (73) ou aumentando a polarização para Treg (74). No entanto, nestes dois casos a utilização de sais de lítio não levou à ativação da via Wnt/ β -catenina mas sim de outras vias.

Uma série de trabalhos demonstram a influência do fator de transcrição TCF-1 no processo de polarização de células T CD4⁺. Este fator tem papel importante na via Wnt/ β -catenina, mas também em outras vias de sinalização, com a expressão de TCF-1 sendo induzida por sinalização via Notch (95, 163, 164). Durante o processo de polarização para células Th2, o fator de transcrição TCF-1, juntamente com a β -catenina promovem aumento na expressão de GATA-3, fator de transcrição importante para diferenciação de Th2, e estimula em consequência a produção de IL-4, em células T CD4⁺ ativadas. Verificou-se ainda que a expressão de β -catenina nestas células aumenta após estímulo via TCR. O efeito na polarização de células Th2 neste caso, foi via TCR, mas não está claro se este efeito foi indireto por ativar componente de outras vias que então induziriam a polarização, como a via Erk ou Wnt, ou se foi um efeito direto da sinalização via TCR (100, 104).

Por outro lado, alguns trabalhos demonstram a influência do TCF-1 em células T CD4⁺ de forma independente da β -catenina, mas não especificam qual via de sinalização poderia estar envolvida. Em geral esta modulação por TCF-1 inibe a polarização para Th17 e Th1 (104, 107). O TCF-1 possui efeito inibitório na polarização para células Th1, pois tem a capacidade de regular negativamente a expressão de IFN- γ , reprimindo a diferenciação para Th1 (104). A expressão do fator de transcrição T-bet, importante para diferenciação de células Th1, em associação o gene repressor Bcl-6, inibe a expressão de TCF-1 e de outros genes importantes para diferenciação de outros subtipos de células T e estimula a polarização para Th1 (106). Em células T CD4⁺ TCF-1^{-/-}, observou-se modificações epigenéticas no gene *IL17* que induziram aumento na expressão de IL-17 e polarização para células Th17. Além disso, o TCF-1 pode afetar a produção de IL-17 somente durante o desenvolvimento de células T, mas não em células T CD4⁺ maduras (107). Outro estudo demonstrou que o fator de

transcrição TCF-1 pode regular negativamente a expressão de IL-17. Este efeito ocorre através da ligação do TCF-1 em regiões regulatórias do gene *Il17*, o que protege o camundongo contra doenças autoimunes, como a EAE (165).

Adicionalmente, também foi demonstrado um papel importante nas células T CD4⁺ para β -catenina. A expressão de β -catenina estável nas células Treg diferenciadas promove a sobrevivência de Tregs e anergia de células T efetoras, aumentando a resposta contra doenças inflamatórias (110), mas não podemos afirmar que este efeito seja via Wnt/ β -catenina.

Em suma, o trabalho que demonstrou ativação da via Wnt/ β -catenina em células T CD4⁺ utilizou um modelo de camundongo CD4CreCtnnb1, no qual a β -catenina foi estabilizada em células T. Neste trabalho, verificou-se que a ativação da via Wnt/ β -catenina induz polarização para células Th17 (15). No entanto, esta condição pode não ser fisiológica e portanto ter menor relevância biológica que um tratamento com inibidores da GSK3 β capaz de induzir a via em tecidos alvo clássicos como o tecido cerebral. Além disso, os trabalhos que utilizaram inibidores de GSK3 β descritos na literatura, não viram a ativação da via Wnt/ β -catenina, mas sim de outras vias.

Levando em consideração nossos resultados e a literatura, podemos afirmar que nas condições testadas não foi possível observar ativação da via Wnt/ β -catenina em esplenócitos e células T CD4⁺ maduras do baço de camundongos, utilizando inibidores da GSK3 β . Isto vai de encontro aos achados do grupo com células T CD4⁺ humanas, onde foi observada indução de genes alvo da via Wnt/ β -catenina com inibidores da GSK3 β ; e aos achados de ativação da via em células Treg. No entanto nossos resultados corroboram com as observações da literatura em células OSE, BAEC, onde não foi possível verificar ativação da via Wnt/ β -catenina.

Sabe-se que em camundongos a homeostase de linfócitos T é mantida basicamente pela exportação tímica, e não pela proliferação homeostática periférica de células T *naïve*, ao contrário do que ocorre em humanos, onde a manutenção do número de células T CD4⁺ periféricas é basicamente sustentada por proliferação homeostática (87). Uma hipótese para compatibilizar nossos dados com a literatura seria que a diferença seja devida à relativa ausência de mecanismos de ativação da proliferação homeostática em camundongos, dependente da via Wnt/ β -catenina. Uma outra hipótese para explicar a diferença dos nossos resultados seria que populações especiais de linfócitos T sensíveis à ativação da via Wnt/ β -catenina estariam diluídas com outros compartimentos de células T CD4⁺ insensíveis à ativação (por exemplo células polarizadas Th1/Th2/Th17 maduras). Não podemos excluir, também, que sais de lítio ou mesmo inibidores específicos da GSK3 β , possam ter induzido a sinalização por outras vias não testadas que não a via Wnt/ β -catenina, levando em consideração o pleiotropismo dos sais de lítio, induzindo sinalização por diversas vias, e a capacidade da própria GSK-3 β de interagir com diversas outras vias, como a via de STAT3, (73) ou TGF- β /SMAD3, membros da família c-Jun, C/EBPs (proteínas de ligação CCAAT), STATs (transdutor de sinal e ativadores de transcrição), NF-ATc e ERK, como citado anteriormente (74). Por fim, nossos resultados sugerem que a ação de inibidores de GSK3 β tem efeitos diferentes de acordo com o tipo celular analisado.

9. CONCLUSÃO

Existem muitas semelhanças estruturais e fisiológicas entre modelos animais e seres humanos. No entanto, espécies que compartilham relações evolucionárias relativamente próximas não necessariamente estão submetidos aos mesmos mecanismos bioquímicos ou respostas fisiológicas, nem mesmo em nível molecular, no que diz respeito às vias de sinalização (87). Embora a via Wnt/ β -catenina seja preservada e ativa em camundongos e humanos, é possível que se comporte diferentemente nas duas espécies, o que justificaria a diferença na capacidade de inibidores da GSK3 β ativarem esta via em células T CD4⁺ humanas, mas não células T CD4⁺ murinas, avaliadas neste trabalho. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e dados na literatura concluímos que em esplenócitos e em linfócitos T CD4⁺ murinos não é possível ativar a via Wnt/ β -catenina por meio da utilização de inibidores de GSK3 β (LiCl, Li₂CO₃, SB e CHIR). Não podemos, entretanto, descartar subpopulações de células T CD4⁺ sejam suscetíveis à ativação da via, como já foi demonstrado em camundongos. Também não podemos descartar que tratamento de células T CD4⁺ com tais inibidores possa ter estimulado outras vias de sinalização, como as vias STAT3, TGF β /SMAD, membros da família c-Jun, C/EBPs (proteínas de ligação CCAAT, NF-ATc e ERK, como citado anteriormente e não investigadas neste trabalho).

10. BIBLIOGRAFIA

1. van Amerongen R., Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development, *Development* 2009; 136: 3205-3214.
2. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway?, *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13: 513-532.
3. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease, *Cell* 2006; 127: 469-480.
4. de La Coste A., Romagnolo B., Billuart P., Renard C. A., Buendia M. A., Soubrane O. et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8847-8851.
5. Peifer M., Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. , *Science* 2000; 287: 4.
6. Xi Y., Chen Y. Wnt signaling pathway: implications for therapy in lung cancer and bone metastasis, *Cancer Lett* 2014; 353: 8-16.
7. Boudin E., Fijalkowski I., Piters E., Van Hul W. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases, *Semin Arthritis Rheum* 2013; 43: 220-240.
8. Schinner S. Wnt-signalling and the metabolic syndrome, *Horm Metab Res* 2009; 41: 159-163.
9. Inestrosa N. C., Montecinos-Oliva C., Fuenzalida M. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia, *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 788-807.
10. Dees C., Distler J. H. Canonical Wnt signalling as a key regulator of fibrogenesis - implications for targeted therapies?, *Exp Dermatol* 2013; 22: 710-713.
11. Panaccione I., Napoletano F., Forte A. M., Kotzalidis G. D., Del Casale A., Rapinesi C. et al. Neurodevelopment in schizophrenia: the role of the wnt pathways, *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 535-558.
12. Berwick D. C., Harvey K. The importance of Wnt signalling for neurodegeneration in Parkinson's disease, *Biochem Soc Trans* 2012; 40: 1123-1128.
13. Okerlund N. D., Cheyette B. N. Synaptic Wnt signaling-a contributor to major psychiatric disorders?, *J Neurodev Disord* 2011; 3: 162-174.
14. Sen M., Lauterbach K., El-Gabalawy H., Firestein G. S., Corr M., Carson D. A. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2791-2796.
15. Keerthivasan S., Aghajani K., Dose M., Molinero L., Khan M. W., Venkateswaran V. et al. β -Catenin promotes colitis and colon cancer through imprinting of proinflammatory properties in T cells, *Sci Transl Med* 2014; 6: 225ra228.
16. Mikels A., Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context, *Plos Biology* 2006; 4: 570-582.

17. Khan N., Bradstock K., Bendall L. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia, *British Journal of Haematology* 2007: 138: 338-348.
18. Yang Y., Yang J., Liu R., Li H., Luo X., Yang G. Accumulation of beta-catenin by lithium chloride in porcine myoblast cultures accelerates cell differentiation, *Molecular Biology Reports* 2011: 38: 2043-2049.
19. Van Den Berg D. J., Sharma A. K., Bruno E., Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis, *Blood* 1998: 92: 3189-3202.
20. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor, *Nature Medicine* 2004: 10: 55-63.
21. Jeannot G., Scheller M., Scarpellino L., Duboux S., Gardiol N., Back J. et al. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin, *Blood* 2008: 111: 142-149.
22. Nusse R., Varmus H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome, *Cell* 1982: 31: 99-109.
23. Baker N. E. Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos, *EMBO J* 1987: 6: 1765-1773.
24. Endo Y., Wolf V., Muraiso K., Kamijo K., Soon L., Uren A. et al. Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2, *J Biol Chem* 2005: 280: 777-786.
25. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012: 13: 767-779.
26. Staal F., Luis T., Tiemessen M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings, *Nature Reviews Immunology* 2008: 8: 581-593.
27. Angers S., Moon R. Proximal events in Wnt signal transduction, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009: 10: 468-477.
28. Rao T., Kuhl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways A Prelude for More, *Circulation Research* 2010: 106: 1798-1806.
29. Nishimura S., Tsuda H., Nomura H., Kataoka F., Chiyoda T., Tanaka H. et al. Expression of hypoxia-inducible 2 (HIG2) protein in uterine cancer, *Eur J Gynaecol Oncol* 2011: 32: 146-149.
30. Nishimura S., Tsuda H., Ito K., Takano M., Terai Y., Jobo T. et al. Differential expression of hypoxia-inducible protein 2 among different histological types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas, *Int J Gynecol Cancer* 2010: 20: 220-226.
31. Denko N., Schindler C., Koong A., Laderoute K., Green C., Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment, *Clin Cancer Res* 2000: 6: 480-487.

32. Abujarour R., Efe J., Ding S. Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency, *Stem Cells* 2010; 28: 1487-1497.
33. Togashi A., Katagiri T., Ashida S., Fujioka T., Maruyama O., Wakumoto Y. et al. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy, *Cancer Res* 2005; 65: 4817-4826.
34. Kim S. H., Wang D., Park Y. Y., Katoh H., Margalit O., Sheffer M. et al. HIG2 promotes colorectal cancer progression via hypoxia-dependent and independent pathways, *Cancer Lett* 2013; 341: 159-165.
35. Li W., Tong H., Huang X., Wang W., Wu H., Lin S. High levels of β -catenin promote IFN γ -induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells, *Oncol Lett* 2012; 4: 1092-1096.
36. Schumann H., Holtz J., Zerkowski H. R., Hatzfeld M. Expression of secreted frizzled related proteins 3 and 4 in human ventricular myocardium correlates with apoptosis related gene expression, *Cardiovasc Res* 2000; 45: 720-728.
37. Park J. H., Kwon H. Y., Sohn E. J., Kim K. A., Kim B., Jeong S. J. et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells, *Pharmacol Rep* 2013; 65: 1366-1374.
38. Liu B. L., Tzeng Y. M. Development and applications of destruxins: a review, *Biotechnol Adv* 2012; 30: 1242-1254.
39. Huynh T. T., Rao Y. K., Lee W. H., Chen H. A., Le T. D., Tzeng D. T. et al. Destruxin B inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition, *Toxicol In Vitro* 2014; 28: 552-561.
40. Lin X., Kong L. N., Huang C., Ma T. T., Meng X. M., He Y. et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/ β -catenin pathway, *Int Immunopharmacol* 2015; 25: 311-320.
41. Xu J., Chen Y., Huo D., Khramtsov A., Khramtsova G., Zhang C. et al. β -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells, *Mol Carcinog* 2015.
42. Beurel E., Grieco S. F., Jope R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases, *Pharmacol Ther* 2015; 148C: 114-131.
43. Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target, *Biochemical Pharmacology* 2013; 86: 191-199.
44. Sutherland C. What Are the bona fide GSK3 Substrates?, *Int J Alzheimers Dis* 2011; 2011: 505607.
45. Forlenza O. V., de Paula V. J., Machado-Vieira R., Diniz B. S., Gattaz W. F. Does lithium prevent Alzheimer's disease?, *Drugs Aging* 2012; 29: 335-342.
46. Mines M. A., Beurel E., Jope R. S. Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3, *Int J Alzheimers Dis* 2011; 2011: 861072.
47. Itokazu T., Hayano Y., Takahashi R., Yamashita T. Involvement of Wnt/ β -catenin signaling in the development of neuropathic pain, *Neurosci Res* 2013.
48. Chemical C. XAV939 - Item N $^{\circ}$.13596.

49. Gattinoni L., Ji Y., Restifo N. P. Wnt/ β -catenin signaling in T cell immunity and cancer immunotherapy *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4695–4701.
50. Patapoutian A., Reichardt L. F. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance, *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 392-399.
51. Hedgepeth C., Conrad L., Zhang J., Huang H., Lee V., Klein P. Activation of the wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action, *Developmental Biology* 1997; 185: 82-91.
52. Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Zorova L. D., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Zorov S. D. et al. Lithium salts -- simple but magic, *Biochemistry (Mosc)* 2014; 79: 740-749.
53. Mota de Freitas D., Castro M. M., Geraldes C. F. Is competition between Li⁺ and Mg²⁺ the underlying theme in the proposed mechanisms for the pharmacological action of lithium salts in bipolar disorder?, *Acc Chem Res* 2006; 39: 283-291.
54. Yan X. B., Hou H. L., Wu L. M., Liu J., Zhou J. N. Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia, *Neuropharmacology* 2007; 53: 487-495.
55. Yuan P. X., Chen G., Huang L. D., Manji H. K. Lithium stimulates gene expression through the AP-1 transcription factor pathway, *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 58: 225-230.
56. Freland L., Beaulieu J. M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks, *Front Mol Neurosci* 2012; 5: 14.
57. Makoukji J., Belle M., Meffre D., Stassart R., Grenier J., Shackelford G. et al. Lithium enhances remyelination of peripheral nerves, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3973-3978.
58. Yazlovitskaya E. M., Edwards E., Thotala D., Fu A., Osusky K. L., Whetsell W. O. et al. Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation, *Cancer Res* 2006; 66: 11179-11186.
59. Du W. J., Li J. K., Wang Q. Y., Hou J. B., Yu B. Lithium chloride regulates connexin43 in skeletal myoblasts in vitro: possible involvement in Wnt/beta-catenin signaling, *Cell Commun Adhes* 2008; 15: 261-271.
60. Du W. J., Li J. K., Wang Q. Y., Hou J. B., Yu B. Lithium chloride preconditioning optimizes skeletal myoblast functions for cellular cardiomyoplasty in vitro via glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling, *Cells Tissues Organs* 2009; 190: 11-19.
61. Li L., Ji S. Y., Yang J. L., Li X. X., Zhang J., Zhang Y. et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates follicular development by modulating the expression of Foxo3a signaling components, *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 915-925.
62. Rao R., Zhang M. Z., Zhao M., Cai H., Harris R. C., Breyer M. D. et al. Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria, *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F642-649.
63. Tiwari S. K., Agarwal S., Seth B., Yadav A., Nair S., Bhatnagar P. et al. Curcumin-Loaded Nanoparticles Potently Induce Adult Neurogenesis and Reverse Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Model via Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway, *ACS Nano* 2014; 8: 76-103.

64. Schmeel F. C., Schmeel L. C., Kim Y., Schmidt-Wolf I. G. Piceatannol exhibits selective toxicity to multiple myeloma cells and influences the Wnt/ beta-catenin pathway, *Hematol Oncol* 2014.
65. Kahlert U. D., Maciaczyk D., Doostkam S., Orr B. A., Simons B., Bogiel T. et al. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition, *Cancer Lett* 2012; 325: 42-53.
66. Xie Q., Chen L., Shan X., Shan X., Tang J., Zhou F. et al. Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through Wnt signaling pathway, *International Journal of Cancer* 2013; 00: 1-12.
67. Li X. F., Xu H., Zhao Y. J., Tang D. Z., Xu G. H., Holz J. et al. Icarin Augments Bone Formation and Reverses the Phenotypes of Osteoprotegerin-Deficient Mice through the Activation of Wnt/ β -Catenin-BMP Signaling, *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 652317.
68. Smith D. G., Buffet M., Fenwick A. E., Haigh D., Ife R. J., Saunders M. et al. 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 635-639.
69. Coghlan M. P., Culbert A. A., Cross D. A., Corcoran S. L., Yates J. W., Pearce N. J. et al. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription, *Chem Biol* 2000; 7: 793-803.
70. Deng H., Dokshin G. A., Lei J., Goldsmith A. M., Bitar K. N., Fingar D. C. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy, *J Biol Chem* 2008; 283: 10198-10207.
71. Xue B., Dunker A., Uversky V. The Roles of Intrinsic Disorder in Orchestrating the Wnt-Pathway, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 2012; 29: 843-861.
72. Xue H.-H., Zhao D.-M. Regulation of mature T cell responses by the Wnt signaling pathway, *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* 2012; xxx: 18.
73. Beurel E., Yeh W., Michalek S., Harrington L., Jope R. Glycogen Synthase Kinase-3 Is an Early Determinant in the Differentiation of Pathogenic Th17 Cells, *Journal of Immunology* 2011; 186: 1391-1398.
74. Xia Y., Zhuo H., Lu Y., Deng L., Jiang R., Zhang L. et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition promotes human iTreg differentiation and suppressive function, *Immunol Res* 2015.
75. Jameson S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis, *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 547-556.
76. Buchbinder S., Katz M., NA H., O'Malley P., Holmberg S. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression., *California, USA: AIDS*; 1994, p. 6.
77. BL S. Understanding the "lucky few": the conundrum of HIV-exposed, seronegative individuals, *Current HIV/AIDS Reports* 2006; 3: 6.
78. Deeks S., Walker B. Human immunodeficiency virus controllers: Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy, *Immunity* 2007; 27: 406-416.

79. Luque M. C., Santos C. C., Mairena E. C., Wilkinson P., Boucher G., Segurado A. C. et al. Gene expression profile in long-term non progressor HIV infected patients: in search of potential resistance factors, *Mol Immunol* 2014: 62: 63-70.
80. SANTOS C., MAIRENA E., FONSECA S., SEKALY R., WILKINSON P., BOUCHER G. et al. Gene expression profile in long-term non-progressor HIV plus patients: Identification of HIG-2 as a possible natural resistance factor, *AIDS and Human Retroviruses*, OCT2008, p. 74-74.
81. Wu J., Dwyer D., Dyer W., Yang Y., Wang B., Saksena N. Genome-wide analysis of primary CD4+and CD8+T cell transcriptomes shows evidence for a network of enriched pathways associated with HIV disease, *Retrovirology* 2011: 8.
82. Fonseca S. G., Procopio F. A., Goulet J. P., Yassine-Diab B., Ancuta P., Sékaly R. P. Unique features of memory T cells in HIV elite controllers: a systems biology perspective, *Curr Opin HIV AIDS* 2011: 6: 188-196.
83. Ribeiro R., Perelson A. Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data, *Immunological Reviews* 2007: 216: 21-34.
84. Li C., Santoso S., Lo D. Quantitative analysis of T cell homeostatic proliferation, *Cellular Immunology* 2007: 250: 40-54.
85. Haines C., Giffon T., Lu L., Lu X., Tessier-Lavigne M., Ross D. et al. Human CD4(+) T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function, *Journal of Experimental Medicine* 2009: 206: 275-285.
86. Hapuarachchi T., Lewis J., Callard R. E. A mechanistic model for naive CD4 T cell homeostasis in healthy adults and children, *Front Immunol* 2013: 4: 366.
87. den Braber I., Mugwagwa T., Vrisekoop N., Westera L., Mögling R., de Boer A. B. et al. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans, *Immunity* 2012: 36: 288-297.
88. Takada K., Jameson S. C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place, *Nat Rev Immunol* 2009: 9: 823-832.
89. den Braber I., Mugwagwa T., Vrisekoop N., Westera L., Mogling R., de Boer A. et al. Maintenance of Peripheral Naive T Cells Is Sustained by Thymus Output in Mice but Not Humans, *Immunity* 2012: 36: 288-297.
90. Staal F. J., Meeldijk J., Moerer P., Jay P., van de Weerd B. C., Vainio S. et al. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription, *Eur J Immunol* 2001: 31: 285-293.
91. Mulroy T., McMahon J. A., Burakoff S. J., McMahon A. P., Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity, *Eur J Immunol* 2002: 32: 967-971.
92. Xu Y., Banerjee D., Huelsken J., Birchmeier W., Sen J. M. Deletion of beta-catenin impairs T cell development, *Nat Immunol* 2003: 4: 1177-1182.
93. Pongracz J. E., Parnell S. M., Jones T., Anderson G., Jenkinson E. J. Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development, *Eur J Immunol* 2006: 36: 2376-2383.

94. Hossain M. Z., Yu Q., Xu M., Sen J. M. ICAT expression disrupts beta-catenin-TCF interactions and impairs survival of thymocytes and activated mature T cells, *Int Immunol* 2008; 20: 925-935.
95. Weber B. N., Chi A. W., Chavez A., Yashiro-Ohtani Y., Yang Q., Shestova O. et al. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation, *Nature* 2011; 476: 63-68.
96. Verbeek S., Izon D., Hoffhuis F., Robanus-Maandag E., te Riele H., van de Wetering M. et al. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation, *Nature* 1995; 374: 70-74.
97. Transcriptional regulation of CD4 gene expression by T cell factor-1/ β -catenin pathwa.
98. Yu Q., Xu M., Sen J. M. Beta-catenin expression enhances IL-7 receptor signaling in thymocytes during positive selection, *J Immunol* 2007; 179: 126-131.
99. Ma J., Wang R., Fang X., Sun Z. β -catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation, *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 750-762.
100. Yu Q., Sharma A., Sen J. M. TCF1 and β -catenin regulate T cell development and function, Baltimore, USA: Immunology research; 2010, p. 45–55.
101. Willinger T., Freeman T., Herbert M., Hasegawa H., McMichael A. J., Callan M. F. C. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo, *The Journal of Immunology* (2006); 176: 1439-1446. .
102. Wu B., Crampton S. P., Hughes C. C. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration, *Immunity* 2007; 26: 227-239.
103. Notani D., Gottimukkala K. P., Jayani R. S., Limaye A. S., Damle M. V., Mehta S. et al. Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner, *PLoS Biol* 2010; 8: e1000296.
104. Yu Q., Sharma A., Oh S. Y., Moon H. G., Hossain M. Z., Salay T. M. et al. T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma, *Nat Immunol* 2009; 10: 992-999.
105. Hebenstreit D., Giaisi M., Treiber M., Zhang X., Mi H., Horejs-Hoeck J. et al. LEF-1 negatively controls interleukin-4 expression through a proximal promoter regulatory element, *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 22490-22497.
106. Oestreich K., Huang A., Weinmann A. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns, *Journal of Experimental Medicine* 2011; 208: 1001-1013.
107. Ma J., Wang R., Fang X., Ding Y., Sun Z. Critical Role of TCF-1 in Repression of the IL-17 Gene, *Plos One* 2011; 6.
108. Lee Y. S., Lee K. A., Yoon H. B., Yoo S. A., Park Y. W., Chung Y. et al. The Wnt inhibitor secreted Frizzled-Related Protein 1 (sFRP1) promotes human Th17 differentiation, *Eur J Immunol* 2012; 42: 2564-2573.
109. Yu Q., Sharma A., Ghosh A., Sen J. T Cell Factor-1 Negatively Regulates Expression of IL-17 Family of Cytokines and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Journal of Immunology* 2011; 186: 3946-3952.

110. Ding Y., Shen S., Lino A., de Lafaille M., Lafaille J. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells, *Nature Medicine* 2008; 14: 162-169.
111. Graham J., Fray M., de Haseth S., Lee K., Lian M., Chase C. et al. Suppressive Regulatory T Cell Activity Is Potentiated by Glycogen Synthase Kinase 3 beta Inhibition, *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 32852-32859.
112. Watase K., Gatchel J. R., Sun Y., Emamian E., Atkinson R., Richman R. et al. Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type 1 mouse model, *PLoS Med* 2007; 4: e182.
113. Levy A. L., Katz E. M. Comparison of serum lithium determinations by flame photometry and atomic absorption spectrophotometry, *Clin Chem* 1970; 16: 840-842.
114. Edwards C. M., Edwards J. R., Lwin S. T., Esparza J., Oyajobi B. O., McCluskey B. et al. Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone in vivo, *Blood* 2008; 111: 2833-2842.
115. Clément-Lacroix P., Ai M., Morvan F., Roman-Roman S., Vayssière B., Belleville C. et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17406-17411.
116. Leroy K., Ando K., Héraud C., Yilmaz Z., Authélet M., Boeynaems J. M. et al. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology, *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 705-719.
117. Nolen W. A., Weisler R. H. The association of the effect of lithium in the maintenance treatment of bipolar disorder with lithium plasma levels: a post hoc analysis of a double-blind study comparing switching to lithium or placebo in patients who responded to quetiapine (Trial 144), *Bipolar Disord* 2013; 15: 100-109.
118. Severus W. E., Kleindienst N., Seemüller F., Frangou S., Möller H. J., Greil W. What is the optimal serum lithium level in the long-term treatment of bipolar disorder--a review?, *Bipolar Disord* 2008; 10: 231-237.
119. Kirby L. A., Schott J. T., Noble B. L., Mendez D. C., Caseley P. S., Peterson S. C. et al. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells, *PLoS One* 2012; 7: e39329.
120. Nemoto T., Kanai T., Yanagita T., Satoh S., Maruta T., Yoshikawa N. et al. Regulation of Akt mRNA and protein levels by glycogen synthase kinase-3beta in adrenal chromaffin cells: effects of LiCl and SB216763, *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 82-89.
121. Finlay D., Patel S., Dickson L., Shpiro N., Marquez R., Rhodes C. et al. Glycogen synthase kinase-3 regulates IGFBP-1 gene transcription through the thymine-rich insulin response element, *Bmc Molecular Biology* 2004; 5.
122. Dixon J. F., Hokin L. E. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8363-8368.
123. Fukumoto T., Morinobu S., Okamoto Y., Kagaya A., Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain, *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 158: 100-106.

124. Mendes C. T., Mury F. B., de Sá Moreira E., Alberto F. L., Forlenza O. V., Dias-Neto E. et al. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2009; 259: 16-22.
125. Fiorentini A., Rosi M. C., Grossi C., Luccarini I., Casamenti F. Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice, *PLoS One* 2010; 5: e14382.
126. Boitard M., Bocchi R., Egervari K., Petrenko V., Viale B., Gremaud S. et al. Wnt Signaling Regulates Multipolar-to-Bipolar Transition of Migrating Neurons in the Cerebral Cortex, *Cell Rep* 2015; 10: 1349-1361.
127. Bayod S., Felice P., Andrés P., Rosa P., Camins A., Pallàs M. et al. Downregulation of canonical Wnt signaling in hippocampus of SAMP8 mice, *Neurobiol Aging* 2015; 36: 720-729.
128. Wexler E. M., Geschwind D. H., Palmer T. D. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation, *Mol Psychiatry* 2008; 13: 285-292.
129. De Ferrari G. V., Chacón M. A., Barría M. I., Garrido J. L., Godoy J. A., Olivares G. et al. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils, *Mol Psychiatry* 2003; 8: 195-208.
130. Contestabile A., Greco B., Ghezzi D., Tucci V., Benfenati F., Gasparini L. Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice, *J Clin Invest* 2013; 123: 348-361.
131. Varela-Nallar L., Rojas-Abalos M., Abbott A. C., Moya E. A., Iturriaga R., Inestrosa N. C. Chronic hypoxia induces the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and stimulates hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}-PS1 Δ E9 transgenic mice in vivo, *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 17.
132. Colombres M., Henríquez J. P., Reig G. F., Scheu J., Calderón R., Alvarez A. et al. Heparin activates Wnt signaling for neuronal morphogenesis, *J Cell Physiol* 2008; 216: 805-815.
133. Usongo M., Li X., Farookhi R. Activation of the canonical WNT signaling pathway promotes ovarian surface epithelial proliferation without inducing β -catenin/Tcf-mediated reporter expression, *Dev Dyn* 2013; 242: 291-300.
134. PRIEVE M. G., WATERMAN M. L. Nuclear Localization and Formation of β -Catenin–Lymphoid Enhancer Factor 1 Complexes Are Not Sufficient Molecular and Cellular Biology 1999; 19: 4503–4515.
135. Mao C. D., Hoang P., DiCorleto P. E. Lithium inhibits cell cycle progression and induces stabilization of p53 in bovine aortic endothelial cells, *J Biol Chem* 2001; 276: 26180-26188.
136. Avramidis N., Pnyiotis V., Yiangou M., Hadjipetrou-Kourounakis L. adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to *Mycoplasma agalactiae* in mice, *Veterinary Microbiology* 2002; 88: 325-338.
137. Kubera M., Bubak-Satora M., Holan V., Krol W., Basta-Kaim A., Roman A. et al. Modulation of cell-mediated immunity by lithium chloride, *Z Naturforsch C* 1994; 49: 679-683.

138. De Sarno P., Axtell R. C., Raman C., Roth K. A., Alessi D. R., Jope R. S. Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 2008; 181: 338-345.
139. Berridge M. J., Downes C. P., Hanley M. R. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis, *Cell* 1989; 59: 411-419.
140. Rapoport S. I., Bosetti F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder?, *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59: 592-596.
141. Spiegelberg B. D., Dela Cruz J., Law T. H., York J. D. Alteration of lithium pharmacology through manipulation of phosphoadenosine phosphate metabolism, *J Biol Chem* 2005; 280: 5400-5405.
142. York J. D., Ponder J. W., Majerus P. W. Definition of a metal-dependent/Li(+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5149-5153.
143. Spiegelberg B. D., Xiong J. P., Smith J. J., Gu R. F., York J. D. Cloning and characterization of a mammalian lithium-sensitive bisphosphate 3'-nucleotidase inhibited by inositol 1,4-bisphosphate, *J Biol Chem* 1999; 274: 13619-13628.
144. Can A., Schulze T. G., Gould T. D. *Molecular Actions and Clinical Pharmacogenetics of Lithium Therapy*, *Pharmacol Biochem Behav* 2014.
145. Chalecka-Franaszek E., Chuang D. M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8745-8750.
146. Woodgett J. R. Judging a protein by more than its name: GSK-3, *Sci STKE* 2001; 2001: re12.
147. Beurel E., Michalek S. M., Jope R. S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3), *Trends Immunol* 2010; 31: 24-31.
148. Gao S., Brown J., Wang H., Feng X. The role of glycogen synthase kinase 3- β in immunity and cell cycle: implications in esophageal cancer, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014; 62: 131-144.
149. Gould T. D., Quiroz J. A., Singh J., Zarate C. A., Manji H. K. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers, *Mol Psychiatry* 2004; 9: 734-755.
150. Li X., Frye M. A., Shelton R. C. Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development, *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 77-101.
151. Shiojima I., Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway, *Genes Dev* 2006; 20: 3347-3365.
152. Wang Q. M., Park I. K., Fiol C. J., Roach P. J., DePaoli-Roach A. A. Isoform differences in substrate recognition by glycogen synthase kinases 3 alpha and 3 beta in the phosphorylation of phosphatase inhibitor 2, *Biochemistry* 1994; 33: 143-147.
153. Miller M. W., Caracciolo M. R., Berlin W. K., Hanover J. A. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins, *Arch Biochem Biophys* 1999; 367: 51-60.
154. Liang M. H., Chuang D. M. Differential roles of glycogen synthase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation, *J Biol Chem* 2006; 281: 30479-30484.

155. Soutar M. P., Kim W. Y., Williamson R., Peggie M., Hastie C. J., McLauchlan H. et al. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain, *J Neurochem* 2010; 115: 974-983.
156. Beurel E., Jope R. S. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3, *J Biol Chem* 2008; 283: 21934-21944.
157. Ding Q., He X., Hsu J. M., Xia W., Chen C. T., Li L. Y. et al. Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization, *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4006-4017.
158. Tyagarajan S. K., Ghosh H., Yévenes G. E., Nikonenko I., Ebeling C., Schwerdel C. et al. Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 379-384.
159. O'Brien W. T., Huang J., Buccafusca R., Garskof J., Valvezan A. J., Berry G. T. et al. Glycogen synthase kinase-3 is essential for β -arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice, *J Clin Invest* 2011; 121: 3756-3762.
160. Chen L., Salinas G. D., Li X. Regulation of serotonin 1B receptor by glycogen synthase kinase-3, *Mol Pharmacol* 2009; 76: 1150-1161.
161. Stephens L. R., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J. et al. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101, *Cell* 1997; 89: 105-114.
162. van Loosdregt J., Fleskens V., Tiemessen M. M., Mokry M., van Boxtel R., Meerding J. et al. Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function, *Immunity* 2013; 39: 298-310.
163. Germar K., Dose M., Konstantinou T., Zhang J., Wang H., Lobry C. et al. T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20060-20065.
164. Yang Q., Monticelli L. A., Saenz S. A., Chi A. W., Sonnenberg G. F., Tang J. et al. T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation, *Immunity* 2013; 38: 694-704.
165. Yu Q., Sharma A., Ghosh A., Sen J. M. T cell factor-1 negatively regulates expression of IL-17 family of cytokines and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 2011; 186: 3946-3952.