

FLÁVIA AFONSO LIMA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AIRE (*AUTOIMMUNE
REGULATOR*) E DOS COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO
NOTCH EM TIMOS HUMANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio

São Paulo
2010

RESUMO

Lima FA. Estudo da expressão da proteína AIRE (*autoimmune regulator*) e dos componentes da via de sinalização Notch em timos humanos. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O timo é o órgão linfóide primário responsável pelo estabelecimento inicial de um repertório funcional de células T. A via de sinalização Notch é essencial para o desenvolvimento de células T a partir de células-tronco hematopoiéticas, e a distribuição de seus receptores e ligantes no timo humano ainda é desconhecida. A expressão de AIRE é crucial para a seleção de um repertório de receptores de linfócitos T (TCR) sem autorreatividade. Neste estudo, analisamos o padrão de expressão de AIRE e a distribuição de Notch em timos pacientes com cardiopatias congênitas, parte dos quais com síndrome de Down. Descrevemos a localização intratímica e os tipos celulares capazes de expressar os diferentes receptores e ligantes Notch. A expressão de AIRE em células epiteliais medulares foi significativamente reduzida em timos de crianças com síndrome de Down, deficiência esta que pode explicar a alta incidência de doenças autoimunes nesta cromossomopatia.

Palavras-chave: Timo humano. Receptores Notch. Ligantes Notch. AIRE. Síndrome de Down. Autoimunidade.

ABSTRACT

Lima FA. Expression of AIRE (autoimmune regulator) and Notch components in human thymus. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The thymus is a primary lymphoid organ which is essential for the initial establishment of a functional repertoire of T cells. Notch signaling is crucial for T-cell lineage development from hematopoietic stem cells; however, distribution of Notch ligands and receptors in human thymus is still unknown. AIRE is crucial for the selection of a T-cell-receptor (TCR) repertoire purged of self-reactive specificities. In this study, we analyzed the expression patterns of AIRE and Notch in human thymuses from children with congenital cardiopathies that undergo heart surgery, part of whom with Down syndrome. We described the intra-thymic localization and the cell types that express Notch receptors and ligands. AIRE expression in medullary epithelial cells is significantly decreased in Down syndrome patients. This deficiency could explain higher incidence of autoimmune disease in Down syndrome.

Keywords: Human thymus. Notch receptors. Notch ligands. AIRE. Down syndrome. Autoimmunity.

INTRODUÇÃO GERAL

Os gregos antigos usavam animais jovens em seus sacrifícios e notavam uma grande massa de tecido no tórax próximo ao coração, então concluíram que este órgão, o timo, seria a sede da alma. A origem da palavra timo [*thymus*, em latim e em inglês] é incerta, mas há fortes indícios de que seja derivada da palavra do grego antigo *θυμος*, que é traduzida como alma, coração, coragem, mente, vontade ou propósito. A primeira descrição morfológica do timo foi feita por Galeno de Pergamum (130–200 a.C.), que se referiu ao timo como um “órgão misterioso”. Esta alcunha, de certa forma, permanece atual há mais de 2000 anos.

Por séculos o timo permaneceu um órgão enigmático e com funções desconhecidas. Em meados do século XX, o reconhecimento do timo como local de produção de linfócitos foi bem estabelecido (Billingham et al., 1956; Gowans et al., 1961). Entretanto, embora se soubesse que o timo era um órgão produtor de linfócitos, os imunologistas não acreditavam que este tivesse alguma função imunológica, pois as principais características de resposta imune, como a plasmocitopoiese e a formação de centros germinativos, não eram observadas no timo de animais normais após a imunização. Em 1956, os linfócitos circulantes foram divididos em células T e B, depois que Glick et al. identificaram a bursa de Fabricius como a fonte de células produtoras de anticorpos.

Muitas questões a respeito da embriologia, anatomia, fisiologia, patologia e significado clínico do timo persistiram até 1961, quando a competência imunológica do timo e o seu papel fundamental para o estabelecimento e desenvolvimento do sistema imune normal foi demonstrado inequivocamente por e Muller (1961). O timo foi o último dos principais órgãos do corpo a ter as suas funções desvendadas. Entretanto, muitos dos seus segredos continuam por serem esclarecidos. Alguns dos mais recentes avanços nas diversas áreas da biologia do timo, especialmente nos últimos 10 anos, incluem a organogênese do timo, a regulação transcricional que induz à escolha/decisão do tipo celular que se desenvolverá no ambiente

intratímico, e a migração regulada por quimiocinas de precursores de células T através dos diferentes microambientes tímicos.

1.1 Histogênese do timo

O timo é o primeiro órgão linfoide a se desenvolver durante a ontogênese. No ser humano, os primórdios de tecido tímico surgem no final da quinta semana da vida embrionária. O par de rudimentos epiteliais se origina bilateralmente a partir do endoderma do terceiro par de bolsas faríngeas, na porção anterior do tubo digestivo; penetra no mesoderma e é cercado por células mesenquimais residentes, derivadas da crista neural (Nishino et al., 2006; Rodewald, 2008). O mesênquima dá origem a estruturas tímicas como cápsula, septos e células perivasculares. A interação entre as células epiteliais e o mesênquima é essencial para o sucesso do desenvolvimento e função do timo (Owen et al., 2000).

Durante a oitava semana de vida intrauterina, o par de tecidos tímicos perde a conexão com a faringe e migra para o local definitivo, a região ântero–superior do mediastino, onde se funde para formar um único órgão bilobado. Cada lobo tem, individualizados, o suprimento sanguíneo, a drenagem linfática e a inervação. Por volta da décima semana de desenvolvimento embrionário, quando a vascularização do timo já está formada, o interstício entre as células epiteliais se torna colonizado por células–tronco hematopoiéticas precursoras dos timócitos (linfócitos T intratímicos). Estas células indiferenciadas migram do saco vitelino e fígado do embrião, e alcançam o timo, através da corrente sanguínea, como resultado de sinais quimiotáticos induzidos continuamente pelo estroma tímico. Na décima segunda semana, os numerosos lóbulos tímicos, medindo entre 0,5 e 2,0 mm de diâmetro, já apresentam as regiões cortical e medular bem definidas. Após a colonização inicial por células–tronco, o timo cresce rapidamente e pode atingir o maior tamanho (entre 15,0 e 20,0 g em média), em relação à massa total do corpo, antes do nascimento ou nos primeiros meses de vida (Nishino et al., 2006).

1.2 Estrutura e função do timo

O timo está localizado no tórax, imediatamente atrás da extremidade superior do osso esterno, sobre o coração e grandes vasos; possui dois lobos envolvidos por uma cápsula delgada, que penetra no órgão através de prolongamentos ou septos e, ao se unirem, dividem o órgão em pequenos lóbulos. A parte periférica de cada lóbulo, denominada córtex, é formada por tecido linfoide denso e contém a maioria dos timócitos relativamente imaturos, enquanto a porção central, ou medula, é constituída por tecido linfoide frouxo e contém timócitos maduros (**Figura 1**). Na medula estão localizadas estruturas típicas do timo, os corpúsculos de Hassall, cuja origem, natureza e funções são ainda pouco conhecidas. A região entre o córtex e a medula (córtico-medular) é caracterizada pela abundância de vasos sanguíneos (Nishino et al., 2006; Razzani et al., 2008).

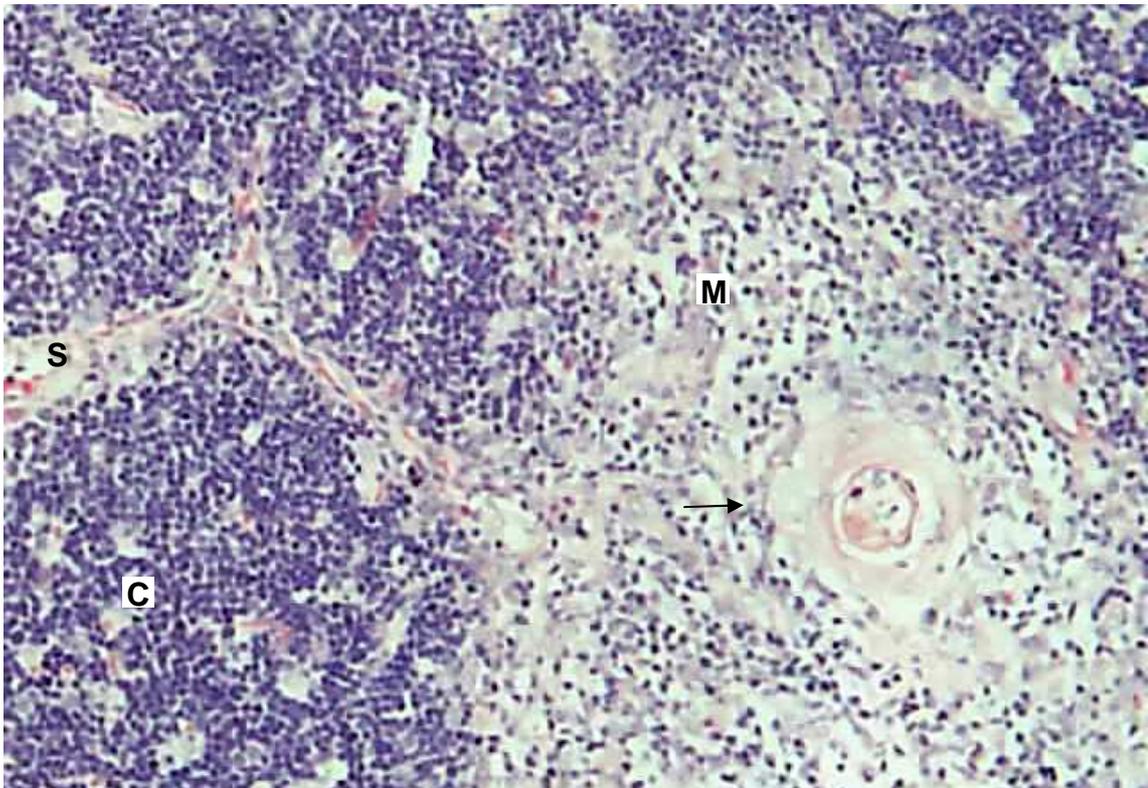


Figura 1. Corte histológico de timo humano corado pelo método Hematoxilina–Eosina. A região cortical (C) apresenta maior densidade de células do que a região medular (M) tímica, onde estão localizados os corpúsculos de Hassall (seta). Septo (S). Aumento de 100x.

O timo oferece o ambiente adequado para a timopoiese, caracterizada pelos processos de comprometimento, migração, proliferação, diferenciação e seleção de linfócitos T a partir de CTH precursoras. A timopoiese é um processo complexo e altamente dinâmico, que necessita de interações recíprocas (*crosstalk*) entre timócitos e células do estoma tímico, como células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos. Assim, as CTH pluripotentes, oriundas da medula óssea, entram no timo através de vênulas pós-capilares localizadas na junção córtico-medular, se deslocam em direção à região subcapsular, externa ao córtex, onde recebem sinais, não antigênicos, e dão início à primeira proliferação. O desenvolvimento dos timócitos avança concomitantemente com a migração destas células através de diferentes microambientes intratímicos, desde a região subcapsular, atravessando o córtex, até chegarem à medula tímica como linfócitos T maduros. No decorrer desta jornada, os timócitos expressam as moléculas que compõem o TCR e são submetidos a vários processos de verificação (*checkpoint*) e seleção, que levam grande parte dessas células à morte por apoptose (morte celular pré-programada por ativação de endonucleases endógenas, que determinam a fragmentação do DNA).

Durante a ontogenia dos linfócitos T, ocorrem modificações sequenciais intensas das moléculas expressas na superfície celular, como: CD117, CD44, CD25, CD4 e CD8 (Godfrey et al., 1993). De acordo com estas alterações fenotípicas, os timócitos podem ser classificados em 6 estágios de diferenciação. Nos estágios mais precoces, os timócitos não expressam CD4 e CD8, sendo denominados duplo-negativos (DN): DN1 (CD117⁺CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD117⁺CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD117⁻CD44⁻CD25⁺) e DN4 (CD117⁻CD44⁻CD25⁻). No quinto estágio, os timócitos são CD4⁺ CD8⁺ duplo-positivos (DP) (Ciofani et al., 2006); e no último estágio, simples-positivos (SP), expressam apenas uma destas moléculas. Esta classificação pode auxiliar no estudo das populações de timócitos em desenvolvimento.

1.3 Diversidade e seleção de linfócitos T

Há aproximadamente 500 milhões de anos, nos primórdios da evolução dos vertebrados mandibulados, o timo surgiu junto com o aparecimento de linfócitos capazes de expressar uma grande diversidade de receptores para reconhecimento de antígenos, baseados na recombinação de DNA (recombinação somática) (Litman et al., 2005; Cooper e Alder, 2006).

No timo, um extraordinário repertório de clones de linfócitos T é gerado através de rearranjos aleatórios dos segmentos gênicos V (*variable*), D (*diversity*) e J (*joining*), dando origem ao polimorfismo das moléculas heterodiméricas de TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, expressas na superfície de cada célula T. As recombinações dos segmentos gênicos são mediadas e altamente reguladas pelas proteínas RAG (*recombinase-activating gene*) 1 e 2, com objetivo de maximizar a heterogeneidade das moléculas de TCR (Oettinger et al., 1990). Esta diversidade garante que qualquer antígeno estranho seja reconhecido por algum linfócito T efetor, assegurando o início uma resposta imune específica.

O desenvolvimento dos timócitos é altamente regulado para garantir a geração de células T contendo o TCR funcional e incapaz de reconhecer, como estranhas, proteínas do próprio organismo (autoantígenos). O primeiro processo de verificação, chamado de **seleção β** , acontece com timócitos corticais DN3 e 4 após a expressão do complexo pré-TCR (cadeia de TCR β ligada covalentemente a uma cadeia de pré-TCR α invariante e CD3) (Levelt et al., 1993a, b). Assim, as células contendo arranjos produtivos de TCR β (ou TCR γ e δ) se livram da apoptose, seguem a diferenciação para DP CD4⁺CD8⁺ e proliferam. A **seleção positiva** acontece logo em seguida, ainda no córtex tímico, e assegura o desenvolvimento dos timócitos DP que expressam a molécula completa de TCR útil, capaz de se ligar adequadamente às moléculas de classe I ou II do MHC (*major histocompatibility complex*), presentes na membrana de células epiteliais intratímicas. Em paralelo com a seleção positiva, acontece o comprometimento alternativo em linhagens SP CD4 (célula T auxiliar) ou CD8 (célula T citotóxica) (Takahama, 2006; Husebye et al., 2008). No último processo de verificação, denominado de **seleção negativa** ou tolerância central, os timócitos SP são avaliados quanto à capacidade de reconhecimento a peptídeos do

próprio organismo apresentados por algumas células epiteliais e células dendríticas medulares. Assim, os timócitos que reagem com alta afinidade contra autoantígenos, sofrem apoptose; e aqueles que reagem com afinidade adequada, sobrevivem e migram para a periferia, através das vênulas córtico–medulares, como linfócitos T maduros hábeis a exercer suas funções efetoras (Mathis e Benoist, 2009). Mais de 95% dos timócitos sofrem apoptose antes de chegar à fase madura, devido principalmente aos arranjos mal sucedidos das cadeias de TCR e aos processos de seleção positiva e negativa (Gill et al., 2003; Takahama, 2006; Rezzani et al., 2008).

1.4 Epitélio tímico

As células epiteliais do timo (CET) compõem um ambiente especial, capaz de: recrutar células progenitoras hematopoiéticas da circulação, direcionar e controlar o comprometimento e a diferenciação de timócitos, e selecionar o repertório de TCR. Baseado na localização anatômica, o epitélio tímico é comumente dividido em dois compartimentos: cortical e medular.

As origens e relações das CET durante o desenvolvimento embrionário permanecem em discussão. Sabe-se que o epitélio tímico se desenvolve a partir do terceiro par de bolsas faríngeas, mas ainda há controvérsias quanto à participação do ectoderma do terceiro par de fendas faríngeas. A hipótese da origem dupla sugere que as CET corticais são geradas do ectoderma, enquanto as CET medulares derivam do endoderma (Cordier e Heremans, 1975; Cordier e Haumont, 1980; Manley e Blackburn, 2003). Entretanto, o modelo mais aceito indica que as CET, de ambos os compartimentos, têm um progenitor comum derivado apenas do endoderma (Manley e Blackburn, 2003; Gordon et al., 2004).

Ao longo da vida, a homeostase do epitélio tímico é mantida através da contínua autorrenovação de “células–tronco epiteliais” – que ainda estão por serem identificadas no *pool* de células–tronco ou progenitoras intratímicas – e da diferenciação de novas CET. A dinâmica interação entre progenitores epiteliais e outros tipos de células intratímicas, como células mesenquimais e progenitores linfoides, é fundamental para o processo de renovação epitelial.

Análises fenotípicas e ultraestruturais têm mostrado uma diversidade de CET dentro de cada compartimento tímico, com características diferentes e funções pouco conhecidas. De acordo com as observações da morfologia ultraestrutural, as CET podem ser divididas em 6 tipos (van de Wijngaert, 1984; Schuurman et al., 1997):

a) CET tipo I – Subcapsular e perivascular:

Em essência, as CET tipo I separam o parênquima tímico do tecido conectivo do órgão. Contornam toda a região subcapsular e os septos; e cercam a túnica adventícia dos vasos sanguíneos da região córtico–medulares. As junções oclusivas entre estas células refletem sua função como uma barreira que isola os timócitos em desenvolvimento dos tecidos conectivos do órgão.

b) CET tipo II – Córtex:

Estão localizadas no córtex tímico e apresentam um grande núcleo, que cora levemente por HE (método de coloração Hematoxilina–Eosina) devido a abundância de eucromatina. Este aspecto nuclear permite que a célula seja facilmente identificada ao microscópio óptico. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) revela desmossomos, que ligam longos processos citoplasmáticos de células adjacentes. Diferente das CET tipo I, as CET tipo II expressam as moléculas de MHC I e MHC II.

c) CET tipo III – Córtex profundo e córtico–medular:

As CET III estão localizadas na fronteira entre o córtex e a medula, apresentam núcleo eletrodenso e, como as CET tipo II, expressam moléculas de MHC de classes I e II. A MET revelara junções oclusivas entre os processos citoplasmáticos de células adjacentes. Como as CET tipo I, as CET tipo III criam uma barreira funcional, mas neste caso entre o córtex e a medula.

d) CET tipo IV – Córtex profundo e córtico–medular:

Estão localizadas próximas às células do tipo III. Apresentam junções oclusivas entre os prolongamentos citoplasmáticos de células dos tipos III e IV adjacentes. Em cooperação com as células do tipo III, estas criam uma barreira na junção córtico–medular.

e) CET tipo V – Medula:

Assim como as CET corticais do tipo II, as CET medulares do tipo V apresentam desmossomos interligando os curtos processos citoplasmáticos de células adjacentes. Formam a rede epitelial da medula e compartimentaliza grupos de timócitos. O núcleo destas células é densamente corado, como o núcleo de timócitos.

f) CET tipo VI – Corpúsculos de Hassall:

Os corpúsculos de Hassall são massas isoladas formadas por CET tipo VI concêntricamente arranjadas. Estas células epiteliais medulares possuem núcleo achatado e são interligadas por desmossomos. Estudos de MET revelaram a presença de grânulos de queratohialina ligados a filamentos citoplasmáticos intermediários, e gotas de lipídeo. O centro de um corpúsculo tímico pode exibir evidências de queratinização.

Classicamente, os corpúsculos de Hassall são descritos como estruturas únicas, com tamanho e número variável, antigenicamente distintas e com frequente presença de modificações degenerativas no interior, como: necrose, detritos celulares, calcificação e alterações císticas (Raica et al., 2006).

Uma função recentemente atribuída ao epitélio dos corpúsculos de Hassall é a expressão de moléculas de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), que promovem a ativação das células dendríticas medulares capazes de induzir a diferenciação de células T regulatórias (Treg) naturais CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺ (Watanabe et al., 2005; Wang e Xing, 2008).

1.5 Involução do timo

Em mamíferos, o tecido funcional do timo diminui com a idade. No homem, a perda de áreas de células epiteliais, denominada atrofia tímica, começa já na primeira infância, com taxas de 3% ao ano até a fase adulta média (35–45 anos), e segue diminuindo a 1% ao ano até o fim da vida (Steinmann et al., 1985). Em condições fisiológicas normais, o tamanho do timo permanece inalterado durante toda a vida (média de 19,5 cm³). Isto se deve à expansão do espaço perivascular, do tecido conectivo e dos corpúsculos de Hassall, bem como o surgimento de adipócitos a partir da puberdade (**Figura 2**) (Steinmann et al., 1985). A perda constante de epitélio tímico resulta na diminuição progressiva da timopoiese, com consequente redução da emigração de linfócitos T *naïve* para a periferia (Steinmann et al., 1985; Haynes et al., 2000; Hale, 2004; Lynch et al., 2009).

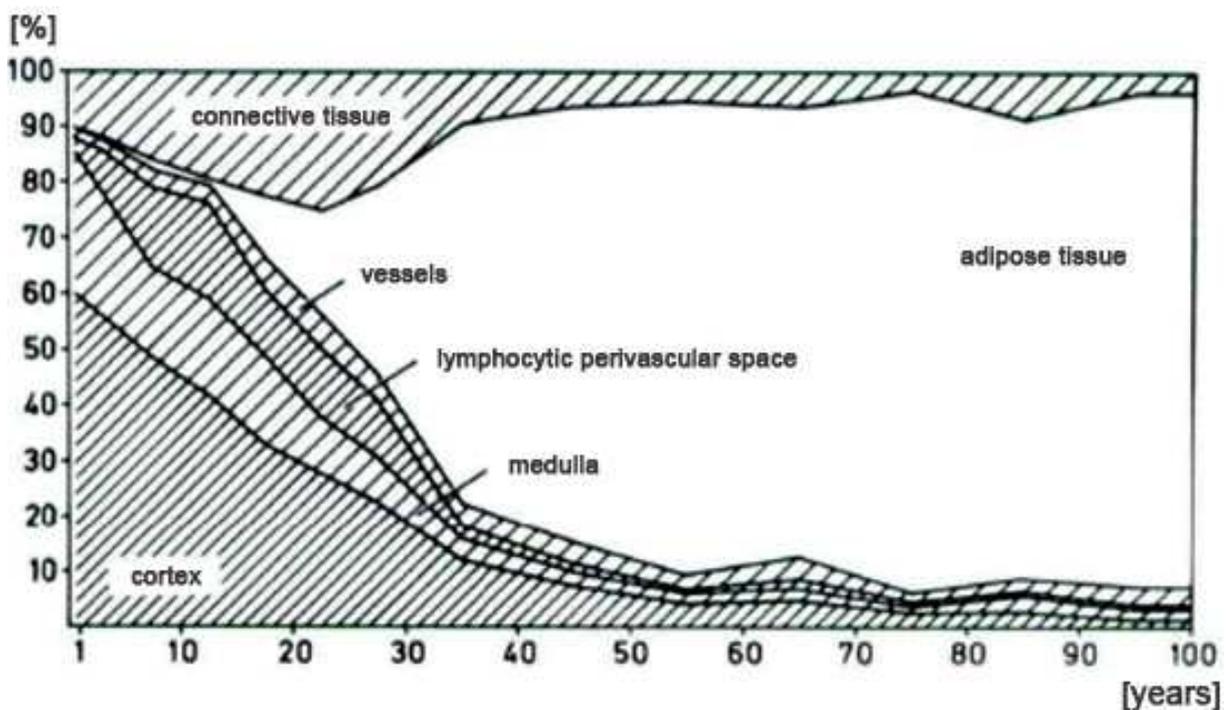


Figura 2. Mudanças no volume relativo (%) dos compartimentos tímicos em relação à idade do indivíduo.

FONTE: Steinmann et al. (1985).

Na maioria das circunstâncias, o declínio do timo tem mínimas consequências sobre indivíduos saudáveis, entretanto, com o avanço da idade, a reduzida eficácia do sistema imune tem ligação etiológica direta com o aumento de doenças como infecções oportunistas, doenças autoimunes e câncer. Além disto, observa-se em adultos uma grande dificuldade de restaurar a função do sistema imune após danos provocados por quimioterapia, exposição à radiação ionizante e infecções graves (por exemplo, pelo vírus HIV), podendo conduzir o indivíduo à morbidade e, frequentemente, à morte.

1.6 Timestomia

A razão mais comum para a remoção cirúrgica do timo é a necessidade de acesso ao coração ou grandes vasos do tórax de crianças com cardiopatias congênitas submetidas a cirurgias para correção. Estima-se que uma em cada 100 crianças nasça com algum defeito cardíaco congênito (Hoffman e Kaplan, 2002), e em mais de 50% dos casos há necessidade de cirurgia invasiva para correção do defeito – em alguns casos, no paciente ainda recém-nascido e, em outros, mais tarde.

Nos últimos 30 anos, a cirurgia cardíaca aberta em neonatos tem se tornado um procedimento cada vez mais seguro e frequentemente executado. Não há relatos clínicos apontando distúrbios imunes, tais como imunodeficiências, em decorrência da timestomia nestes pacientes (Rubinstein et al., 1976; Appay et al., 2010). Entretanto, pacientes timestomizados antes dos 15 dias de vida, avaliados com idades entre 18 e 26 anos, apresentam alterações imunológicas periféricas significativas como: menor número de células T CD4⁺ e CD8⁺; reduzida proporção de linfócitos T *naïve* recém saídos do timo, menos TREC (*TCR recombination excision circle*); acúmulo de populações de células T de memória oligoclonais; marcadores de inflamação aumentados (Sauce et al., 2009). Estes dados indicam sinais de envelhecimento prematuro do sistema imune relacionados à falta de produção de novos linfócitos T pelo timo.

Aparentemente, o repertório de linfócitos T produzido antes do nascimento, e até a data da timectomia, é suficiente para suportar as necessidades do organismo até a fase adulta jovem. Entretanto, a manutenção da atividade tímica é necessária para prevenir o desenvolvimento prematuro de um fenótipo imune de risco, que pode ter consequências graves na fase adulta mais madura (aguardando dados concretos) (Sauce et al., 2009; Zlamy e Prelog, 2009).

1.7 Síndrome DiGeorge e transplante de timo

O fenótipo da síndrome DiGeorge (SDG) é resultado de uma desordem congênita provocada por microdeleção monoalélica de um ou vários genes adjacentes, localizados no cromossomo humano 22q11.2. Afeta um a cada 3000–4000 nascidos vivos, sendo a mais frequente deleção cromossômica conhecida (Botto et al., 2003; Öskarsdóttir et al., 2004). As manifestações clínicas e a gravidade da doença são variáveis, com características cognitivas, comportamentais e físicas alteradas. Classicamente, a doença se caracteriza pela presença de dismorfismos faciais, defeitos cardíacos e dos grandes vasos, hipoplasia ou aplasia do timo e da paratireoide (Ryan et al., 1997). Os órgãos afetados se derivam do terceiro e do quarto par de bolsas faríngeas, e as manifestações fenotípicas são o resultado de defeitos no desenvolvimento embrionário destas estruturas.

De acordo com a condição clínica, a SDG pode ser classificada em dois tipos: parcial e completa. A SDG parcial é mais frequente e os pacientes apresentam um grau variável de hipoplasia tímica e paratireoidea, enquanto os portadores da SDG completa apresentam aplasia destes tecidos.

A maioria dos pacientes com SDG apresenta imunodeficiência de menor grau, e comumente é diagnosticada com infecções como sinusite, otite média, bronquite e pneumonias de repetição (Jawad et al., 2001). A ocorrência de imunodeficiência se deve à hipoplasia tímica, observada na maioria dos casos. Entretanto, em alguns destes pacientes, a imagem tímica não é vista na radiografia de tórax (Ryan et al., 1997; Sullivan, 2004). Este fato tem levantado à hipótese de que haja resquícios de

tecido tímico ou timos ectópicos, funcionais, na região do pescoço dos pacientes acometidos, que geralmente apresentam linfócitos T maduros na periferia.

Crianças acometidas com a forma mais rara e severa da doença, a SDG completa, apresentam total ausência de tecido tímico, resultando em imunodeficiência grave, causada pela falta de linfócitos T. Estes pacientes tipicamente morrem de infecção antes de completar dois anos de vida, a menos que haja reconstrução imune através de um transplante, bem sucedido, de tecido tímico halogênico. Neste caso, o timo a ser transplantado é proveniente de lactentes, de até nove meses de idade, submetidos a cirurgias cardíacas. Fatias de timo são inseridas no músculo quadríceps do paciente com SDG, em cirurgia aberta (Hudson et al., 2007). Os capilares do músculo invadem o tecido enxertado e após dois meses já se observa timopoiese a partir de células–tronco migrantes da medula óssea do paciente receptor, no estroma tímico do doador. A partir do terceiro mês, linfócitos T são encontrados na circulação sanguínea (Markert et al., 1997; Hudson et al., 2007; Markert et al., 2010).

A complexa maquinaria do timo, com todas as implicações para o funcionamento apropriado do sistema imune, bem como as suas falhas – que podem levar a imunodeficiências e patologias autoimunes –, contribui para que este seja um campo de pesquisa fascinante. Assim, uma compreensão adicional dos mecanismos moleculares e celulares que regulam o desenvolvimento dos timócitos é sempre bem-vinda.

Neste trabalho, foram estudados os padrões de expressão de moléculas fundamentais para o sucesso da diferenciação e da seleção de linfócitos T no timo humano, como as proteínas que compõem a via de sinalização celular Notch e AIRE (*autoimmune regulator*), respectivamente. O Capítulo 2 se refere à análise da expressão de AIRE em timos de crianças com cardiopatias congênitas, e que tiveram o timo removido (timectomia) durante cirurgia cardíaca. No Capítulo 3 apresentamos a avaliação da expressão da proteína AIRE em timos provenientes de crianças com síndrome de Down, mostrando uma diminuída proporção de células AIRE⁺ neste grupo de pacientes, que frequentemente apresenta autoimunidade. No

Capítulo 4 está descrita a distribuição de ligantes e receptores Notch no timo humano.

6 CONCLUSÕES

A investigação de moléculas importantes para o desenvolvimento (Notch) e seleção negativa (AIRE) de linfócitos T no timo humano, proveniente de crianças com cardiopatias congênitas, algumas das quais com a síndrome de Down, nos permitiu concluir que:

- 1 – O receptor N1 é expresso abundantemente por células-tronco hematopoiéticas CD117⁺, bem como por timócitos e células do estroma tímico das regiões cortical e medular. Esta molécula pode exercer um papel fundamental na autorrenovação de CTH, bem como no comprometimento e diferenciação de célula T no timo humano.
- 2 – Os ligantes Dll4 e Jag1 são amplamente expressos por timócitos e células do estroma tímico de ambas as regiões, cortical e medular, e podem estar diretamente envolvidos no desenvolvimento de linfócitos T.
- 3 – Os receptores N2 e N3 são expressos apenas por CET tipo II e CET tipo VI, respectivamente, sendo assim, não estariam diretamente relacionados à diferenciação de timócitos no timo humano.
- 4 – Aparentemente, o receptor N4 e os ligantes Dll1 e Jag2 não teriam um papel importante na diferenciação de timócitos em humanos, uma vez que apresentam expressão muito tênue.
- 5 – Timos de crianças com a SD apresentaram um número significativamente reduzido ($p < 0.0001$) de células epiteliais medulares expressando AIRE. As manifestações autoimunes frequentemente observadas na SD podem ser consequência da baixa expressão de AIRE nos portadores da trissomia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:56–9.

Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med.* 1990;322:1829–36.

Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T–helper–cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:116–24.

Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 2005;23:227–39.

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 2002;298:1395–401.

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002;3:756–63.

Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY).* 2010;2:78–81.

Aschenbrenner K, D’Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 2007;8:351–8.

Barrena M, Echaniz P, Garcia-Serrano C, Cuadrado E. Imbalance of the CD4+ subpopulations expressing CD45RA and CD29 antigens in the peripheral blood of adults and children with Down syndrome. *Scand J Immunol.* 1993;38:323–6.

Bellavia D, Campese AF, Vacca A, Gulino A, Screpanti I. Notch3, another Notch in T cell development. *Semin Immunol.* 2003;15:107–12.

*De acordo com:

International Committee of Medical journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1049–55.

Beverly LJ, Ascano JM, Capobianco AJ. Expression of JAGGED1 in T-lymphocytes results in thymic involution by inducing apoptosis of thymic stromal epithelial cells. *Genes Immun.* 2006;7:476–86.

Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Philos Trans R Soc Lond.* 1956;239B:357–412.

Botto L, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics.* 2003;112:101–7.

Bottomley MJ, Collard MW, Huggenvik JI, Liu Z, Gibson TJ, Sattler M. The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol.* 2001;8:626–33.

Chistiakov D. Down syndrome and coexistent autoimmune diseases. *J Appl Biomed.* 2007;5:71–76.

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. A Survival Guide to Early T Cell Development. *Immunol Res.* 2006;34:117–32.

Cooper MD, Alder MN. The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell.* 2006;124:815–22.

Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and Nude mice. *Am J Anat.* 1980;157:227–63.

Cordier AC, Heremans JF. Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol.* 1975;4:193–6.

De La Coste A, Freitas AA. Notch signaling: Distinct ligands induce specific signals during lymphocyte development and maturation. *Immunol Lett.* 2006;112:1–9.

- Felli MP, Maroder M, Mitsiadis TA, Campese AF, Bellavia D, Vacca A, et al. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand–receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol.* 1999;11:1017–25.
- Ferguson BJ, Alexander C, Rossi SW, Liiv I, Rebane A, Worth CL, et al. AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J Biol Chem.* 2008;283:1723–31.
- Finnish–German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD–type zinc–finger domains. *Nature Genet.* 1997;17:399–403.
- Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* 2007;94:459–74.
- Fortini ME, Bilder D. Endocytic regulation of Notch signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:323–8.
- Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev.* 2003;195:28–50.
- Glick B, Chang TS, Japp RG. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.* 1956;35:224–5.
- Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3–CD4–CD8–triple–negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol.* 1993;150:4244–52.
- Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, et al. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol.* 2004;5:546–53.
- Gotter J, Brors B, Hergenhausen M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue–specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med.* 2004;199:155–66.

Gowans IL, Gesner BM, McGregor DD. The immunological activities of lymphocytes. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, eds. *Biological activity of leucocyte*. Ciba Foundation Study Group. London: Churchill. 1961;32–34.

Guidos CJ. Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol*. 2002;14:395–404.

Hale LP. Histologic and Molecular Assessment of Human Thymus. *Ann Diagn Pathol*. 2004;8:50–60.

Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Visan I, Guidos CJ. Notch signaling in development and disease. *Clin Genet*. 2003;64:461–72.

Haynes BF, Sempowski GD, Wells AF, Hale LP. The human thymus during aging. *Immunol Res*. 2000;22:253–61.

Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, et al. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:821–5.

Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1890–1900.

Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT, Habu S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med*. 2008;205:2507–13.

Hudson LL, Louise Markert M, Devlin BH, Haynes BF, Sempowski GD. Human T cell reconstitution in DiGeorge syndrome and HIV-1 infection. *Semin Immunol*. 2007;19:297–309.

Husebye ES, Kappler JW, Marrack P. Thymic selection stifles TCR reactivity with the main chain structure of MHC and forces interactions with the peptide side chains. *Mol Immunol*. 2008;45:599–606.

Husebye ES, Perheentupa J, Rautemaa R, Kämpe O. Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Intern Med*. 2009;265:514–29.

- Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med*. 2001;194:991-1002.
- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan K. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *J Pediatr*. 2001;139:715-23.
- Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV, et al. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev*. 1998;12:1046-57.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2:283-4.
- Kappes DJ, He X, He X. CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. *Nat Immunol*. 2005;6:761-7.
- Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson S-A, Annerén G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch. Dis Child*. 1998;79:242-5.
- Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pöntynen N, et al. A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Immunol*. 2007;178:1208-15.
- Klamp T, Sahin U, Kyewski B, Schwendemann J, Dhaene K, Türeci O. Expression profiling of autoimmune regulator AIRE mRNA in a comprehensive set of human normal and neoplastic tissues. *Immunol Lett*. 2006;106:172-9.
- Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med*. 2008;205:2515-23.
- Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. Cutting Edge: The Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2009;182:2578-82.

Kuhn DE, Nuovo GJ, Martin MM, Malana GE, Pleister AP, Jiang J, et al. Human Chromosome 21–derived miRNAs are Over–expressed in Down Syndrome Brains and Hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370:473–7.

Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, et al. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol.* 2005;170:983–92.

Larocca LM, Lauriola L, Ranelletti FO, Piantelli M, Maggiano N, Ricci R, Capelli A. Morphological and immunohistochemical study of Down syndrome thymus. *Am J Med Genet Suppl.* 1990;7:225–30.

Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch Signaling. *Development.* 2005;132:1751–62.

Le Borgne R. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006;18:213–22.

Levelt CN, Carsetti R, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor β CD3 ϵ and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes. *J Exp Med.* 1993a;6:1867–75.

Levelt CN, Ehrfeld A, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. I. Timepoint of ligation of CD3 ϵ determines clonal deletion or induction of developmental program. *J Exp Med.* 1993b;177:707–16.

Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, et al. Gene dosage–limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ–specific autoimmunity. *J Exp Med.* 2004;200:1015–26.

Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ–specific T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:350–4.

Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:866–79.

Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009;30:366–73.

Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of Lymphoid Development, Differentiation, and Function by the Notch Pathway. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:945–74.

Manley NR, Blackburn CC. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol.* 2003;15:225–32.

Markert ML, Devlin BH, McCarthy EA. Thymus transplantation. *Clin Immunol.* 2010;135:236–46.

Markert ML, Kostyu DD, Ward FE, McLaughlin TM, Watson TJ, Buckley RH, et al. Successful formation of a chimeric human thymus allograft following transplantation of cultured postnatal human thymus. *Journal of Immunology.* 1997;158:998–1005.

Mathis D, Benoist C. A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:645–50.

Mathis D, Benoist C. AIRE. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:287–312.

Miller JFAP. Immunological function of the thymus. *Lancet.* 1961;ii:748–9.

Murphy M, Epstein L. Down syndrome peripheral blood contains phenotypically mature CD3 TCRalpha beta cells but abnormal proportions of TCRgamma delta, TCRalpha beta and CD4+45RA+ cells: evidence for an inefficient release of mature T cells by DS thymus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992a;62:245–51.

Murphy M, Friend D, Pike-Nobile L, Epstein LB. Tumor necrosis factor alpha and IFN-gamma expression in human thymus. *J Immunol.* 1992b;149:2506–12.

Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Epstein LB. A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res.* 1995;393:147–67.

Murphy M, Lempert M, Epstein L. Decreased level of T cell receptor expression by Down syndrome (trisomy 21) thymocytes. *Am J Med Genet.* 1990;7:234–7.

Murumagi A, Vahamurto P, Peterson P. Characterization of Regulatory Elements and Methylation Pattern of the Autoimmune Regulator (AIRE) Promoter. *J Biol Chem.* 2003;278:19784–90.

Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* 1997;17:393–8.

Ng WF, Duggan FJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, et al. Human CD41CD251 cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Immunology.* 2001;98:2736–44.

Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics.* 2006;26:335–48.

Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG–1 and RAG–2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* 1990;248:1517–23.

Org T, Chignola F, Hetényi C, Gaetani M, Rebane A, Liiv I, et al. The autoimmune regulator PHD finger binds to non–methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* 2008;9:370–6.

Öskarsdóttir S, Vujic M, Fath A. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population–based study in Western Sweden. *Arch Dis Child.* 2004;89:148–51.

Owen JJ, McLoughlin DE, Suniara RK, Jenkinson EJ. The role of mesenchyme in thymus development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;251:133–7.

Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2843–50.

Peterson P, Nagamine K, Scott H, Heino M, Kudoh J, Shimizu N, et al. APECED: a monogenic autoimmune disease providing new clues to self–tolerance. *Immunol Today.* 1998;19:384–6.

Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Taghon T, Kerre T, Vandekerckhove B. Human intrathymic development: a selective approach. *Semin Immunopathol.* 2008;30:411–23.

Powell BR, Buist NRM, Stenzel P. An X–linked syndrome of diarrhea polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr.* 1982;100:731–7.

- Radtke F, Fasnacht N, MacDonald HR. Notch Signaling in the Immune System. *Immunity*. 2010;32:14–27.
- Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004;5:247–53.
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, Van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999;10:547–58.
- Raica M, Encica S, Motoc A, Cîmpean AM, Scridon T, Bârsan M. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat*. 2006;188:345–52.
- Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem*. 2008;43:73–120.
- Rizzi M, Ferrera F, Filaci G, Indiveri F. Disruption of immunological tolerance: Role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2006;5:145–7.
- Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell*. 1996;87:483–92.
- Rodewald HR. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:355–88.
- Rubinstein A, Pelet B, Schweizer V. Immunological decay in thymectomized infants. *Helv Paediatr Acta*. 1976;30:425–33.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997;34:798–804.
- Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimisu K, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*. 2003;18:675–85.

Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck–Loebenstein B, et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*. 2009;119:3070–8.

Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga–Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor–ligand interactions. *J Exp Med*. 2004;200:469–79.

Schuurman HJ, Kuper CF, Kendall MD. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microsc Res Tech*. 1997;38:216–26.

Södnerbergh A, Gustafsson J, Ekwall O, Hallgren A, Nilsson T, Kämpe O, et al. Autoantibodies linked to autoimmune polyendocrine syndrome type I are prevalent in Down syndrome. *Acta Paediatr*. 2006;95:1657–60.

Steinmann GG, Klaus B, Müller–Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol*. 1985;22:563–75.

Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:505–12.

Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T–cell development and selection. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:127–35.

Tanigaki K, Honjo T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol*. 2007;8:451–6.

Taubert R, Schwendemann J, Kyewski B. Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self–tolerance and autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2007;37:838–48.

Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A Notch updated. *J Cell Biol*. 2009;184:621–9.

Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, et al. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med*. 2004;199:167–72.

- Utiyama SRR, Nisihara RM, Nass FR, Oliveira NP, Fiedler PT, Messias–Reason IT. Autoantibodies in patients with Down Syndrome: Early senescence of the immune system or precocious markers for immunological diseases? *J Paediatr Child Health*. 2008;44:182–6.
- van der Vliet HJJ, Nieuwenhuis EE. *Clin Dev Immuno*. 2007;2007:89017.
- van de Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, Rademakers LH, Kater L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res*. 1984;237:227–37.
- von Gaudecker B. Functional histology of the human thymus. *Anat Embryol (Berl)*. 1991;183:1–15.
- Wang J, Xing F. Human TSLP–educated DCs. *Cell Mol Immunol*. 2008;5:99–106.
- Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, et al. Notch activity influences the $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell lineage decision. *Cell*. 1997;88:833–43.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall’s corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005;436:1181–5.
- Wolfer A, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, Radtke F. Inactivation of Notch1 impairs VDJ β rearrangement and allows pre–TCR–independent survival of early $\alpha\beta$ lineage thymocytes. *Immunity*. 2002;16:869–79.
- Yahya–Graison EA, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, et al. Classification of human chromosome 21 gene–expression variations in Down syndrome: Impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2007;81:475–91.
- Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, et al. A Comprehensive Analysis of Allelic Methylation Status of CpG Islands on Human Chromosome 21q. *Genome Res*. 2004;14:247–66.
- Zhou L, Seo KH, Wong HK, Mi QS. MicroRNAs and immune regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:524–7.

Zlamy M, Prelog M. Thymectomy in early childhood: a model for premature T cell immunosenescence? *Rejuvenation Res.* 2009;12:249–58.

Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler–Kan E, Palmer E, Hollander GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmunepolyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol.* 2000;165:1976–83