LUCIANA BENTO DE SOUZA

**Avaliação da expressão de receptores e ligantes
Notch nas populações de linfócitos T em
desenvolvimento, linfócitos T reguladores naturais e
células dendríticas no timo humano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2012

LUCIANA BENTO DE SOUZA

**Avaliação da expressão de receptores e ligantes
Notch nas populações de linfócitos T em
desenvolvimento, linfócitos T reguladores naturais e
células dendríticas no timo humano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

reprodução autorizada pelo autor

Bento-de-Souza, Luciana

Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch nas populações de linfócitos T em desenvolvimento, linfócitos T reguladores naturais e células dendríticas no timo humano / Luciana Bento de Souza. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Alberto José da Silva Duarte.

Descritores: 1.Timo 2.Populações de linfócitos T em desenvolvimento
3.Linfócitos T reguladores 4.Células dendríticas 5.Receptores Notch

USP/FM/DBD-214/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese:

À todas as crianças e aos pais ou responsáveis que, por consentirem, tornaram este trabalho possível;

Aos meus pais, Luiz Carlos e Nilde, pelo amor, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, por serem meus exemplos, meu alicerce, minha inspiração;

À querida Magaly, minha amiga, pelo incentivo, apoio e credibilidade sempre;

Aos meus irmãos Mônica, Simone, Gustavo, Gisele, Amanda e Arthur, por serem únicos, pelo amor e amizade incondicionais e por completarem minha vida;

Ao meu amor, Jefferson, pelo companheirismo e dedicação, pelo incentivo, pela confiança e por sempre estar ao meu lado em minha vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte por me acolher em seu laboratório e desde cedo ter acreditado em meu trabalho, me proporcionando as oportunidades e ferramentas fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal, por ser meu admirável chefe e orientador, por me guiar e incentivar para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria Irma Seixas Duarte, pela colaboração neste trabalho, pela amizade e pela transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

Ao Dr. João Bosco de Oliveira Filho, por ter me recebido em seu laboratório (*NIH Immunology Service*, Bethesda, EUA), pela orientação e paciência, pela amizade sincera e permitir meu crescimento pessoal e profissional. À equipe do *NIH Immunology Service*: Hyessun, Lu, Jackie, Jennifer e Kim pela amizade e por todo apoio concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Sato, pela amizade, pelo incentivo e apoio científico durante a execução deste trabalho.

Aos cirurgiões cardiovasculares da equipe HCor Dr. Luiz Carlos Bento de Souza, meu querido pai, meu exemplo de profissional, de ser humano, e Dra. Magaly Arrais dos Santos, minha querida amiga, exemplo de mulher forte e profissional, por conduzirem o início de todo este trabalho com muita dedicação, por acreditarem em minha capacidade e sempre me incentivarem durante a execução da tese e em todos os momentos de minha vida.

À Prof. Dra. Magda Carneiro Sampaio pela amizade, pela colaboração e pela transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

Aos professores da Banca do Exame de Qualificação: Prof. Dra. Vera Capelozzi, Prof. Dra. Hiro Goto e Prof. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob pelas

discussões e valiosas críticas às quais renderam sugestões que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pela colaboração nas capturas das imagens de imunohistoquímica e análises estatísticas.

Ao pessoal do Museu da Imagem da FMUSP, pelo apoio e confiança, pela amizade e pelas experiências de vida compartilhadas.

À Dra. Andréia Cristina Rangel Santos e Dra. Érica Pereira Costa, pela amizade, pelas orientações fundamentais desde o início do desenvolvimento deste trabalho, pelas experiências de bancada e vida compartilhadas, contribuindo para meu crescimento em todos os aspectos.

À Dra. Elaine Raniero, pela amizade, pelo apoio e incentivo sempre, pelas orientações e por toda a colaboração com as imunohistoquímicas, e à Dra. Fernanda Guedes, pela amizade e apoio científico sempre.

À Enfa. Mara Lúcia Leite Ribeiro e toda sua maravilhosa equipe do Centro Cirúrgico do Hospital do Coração- HCor, pela amizade, colaboração e por sempre serem cuidadosos e atenciosos com a coleta dos timos.

Ao Dr. Jefferson Russo Victor, pela extrema dedicação e orientação nas discussões científicas, apoio na elaboração de artigo e tese, pelo incentivo, por acreditar em meu trabalho, por me inspirar e ensinar a fazer ciência. Pelo amor mútuo que, por consequência, agregou muito no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Flávia Afonso Lima pela amizade, pelo apoio desde o início deste trabalho, pela colaboração e pela troca de conhecimentos científicos.

Ao superintendente do Hospital do Coração-HCor, Dr. Antônio Carlos Kfoury, pela amizade antiga e carinhosa, por acreditar em meu potencial, sempre me incentivando, e por ter me dado a oportunidade de desenvolvimento deste trabalho em âmbito internacional.

Ao diretor do Instituto de Ensino e Pesquisa do HCor, Dr. Otávio Berwanger, pelo apoio no momento crucial deste trabalho, promovendo a possibilidade de expansão acadêmica internacional.

À Dra. Marinez Farana Matos, pelo apoio, amizade e compreensão, por ter contribuído para minha expansão acadêmica internacional essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Cláudia Finazzo, irmã de coração, por desde o início me guiar nos ensaios de citometria de fluxo, por todo apoio nos momentos mais difíceis deste trabalho, pelas experiências de bancada e vida compartilhadas.

Aos amigos do LIM56, Dr. Dewton Vasconcelos, Dr. Gil Bernard, Dra. Telma Oshiro, Dr. Alexandre Almeida, Dr. Cyro Alves Brito, Dra. Camila Cacere, Dra. Paula Rigato, Noemia Mie Orii, José Eduardo Rodrigues Martins, Soraya Oigusuku, Laís Teodoro, Wanessa Cardoso da Silva, Mariana Palma, Gabrielle Eime Mitsunari, Luana de Mendonça Oliveira, pela amizade e apoio direto ou indireto no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Alessandra Pontillo e Vanessa Batista, amigas nascidas no laboratório que muito contribuíram nesses anos de tese, que hoje fazem parte da minha vida.

Aos funcionários da secretaria, suporte técnico e limpeza do LIM56 que nos ajudam e apoiam em *todos* os momentos: Edna Reis, Juliana Pisok, Luiz Abraão, Lucio Martins, Celeste Romano, Ângelo Tiago, Adriana Costa, Silvia Maria de

Araújo Castro, Adriana Rocha Santos Santana, André Goto e a equipe de informática.

Às comadres de bancada da equipe Lab. HCor, Maria Olívia Serrão Moralez e Daniela Rezani Benfica, que presenciaram os momentos deste trabalho, pela amizade e por sempre me ajudarem quando mais necessitei neste período de doutoramento.

Aos amigos da equipe do Coração (LabHCor): Eliana Futata, Fabíola Lima, Rita de Cássia, Sandra Alves, Vânia Andréia Gomes, Maury Tanji, Egley Gomes, Ronald Hinz, Daniel Paulo de Oliveira, César Florêncio Costa, Raimunda Maria de Almeida Tripoloni, Catarina Bueno, João Carlos Teodoro, Carina Cenevina, Lucilene Rodrigues, Ana Paula Marangon, Fábiana Yves Bezerra, entre outros, pela amizade e por sempre me darem apoio durante o curso do doutorado.

Aos meus pais, cujo amor dedicado torna-me uma pessoa cada dia melhor, por serem meu centro, meu exemplo, minha fortaleza, por todas as oportunidades concedidas e apoiadas, por estarem próximos a mim a cada passo dado em minha vida, simplesmente por fazerem toda diferença na minha existência. Aos meus irmãos Mônica, Simone, Gustavo, Gisele, Amanda e Arthur que sempre estão em minha vida, acompanhando meus momentos e torcendo por mim. À minha tia Edith que, carinhosamente, acompanha meus passos desde sempre.

Às crianças envolvidas neste trabalho e aos seus pais e/ou responsáveis, que mesmo em um momento de preocupação com seus filhos, consentiram a essa pesquisa, meu eterno agradecimento.

À Deus, que por forças do destino me tornou uma pessoa apaixonada pela ciência, pela fé maior que move a minha pessoa a cada dia, acreditando que a cada momento posso fazer melhor, nunca cessando minha sede em adquirir novos conhecimentos, e quem sabe um dia, contribuir para a humanidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese,
meus sinceros agradecimentos.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese 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. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância do timo no homem.....	3
1.1.1 Timo na fase gestacional.....	3
1.1.2 Timo na fase pós-natal.....	4
1.2 Timo: estrutura e função.....	7
1.3 Via de Sinalização Notch.....	11
1.4 Receptores e ligantes Notch e o desenvolvimento de linfócitos T.....	13
1.5 Linfócitos T reguladores naturais e adquiridos.....	14
1.6 Sinalização Notch e nTreg.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21

3.1 Casuística.....	22
3.2 Dissociação do tecido tímico.....	22
3.3 Separação de células tímicas.....	23
3.4 Congelamento viável e manuseio de células tímicas em suspensão.....	24
3.5 Imunofenotipagem, caracterização e purificação de populações de timócitos, linfócitos nTreg e tDC por citometria de fluxo.....	24
3.6 Expressão de genes FOXP3 e de receptores e ligantes Notch nas populações purificadas.....	26
3.6.1 Purificação de RNA.....	26
3.6.1.1 Purificação de RNA utilizando coluna <i>RNeasy PLUS MINI</i>	26
3.6.1.2 Purificação de RNA utilizando coluna <i>RNeasy PLUS MICRO</i>	27
3.6.2 Síntese da cadeia de DNA complementar (cDNA).....	28
3.6.3 Avaliação da expressão de genes de receptores e ligantes Notch e FOXP3 por RT-PCR.....	30
3.6.3.1 Avaliação da expressão dos genes NOCTH1, 2 e 3, DLL1, JAG1 e 2, FOXP3, GAPDH por RT-PCR (<i>TaqMan</i>).....	32
3.6.3.2 Avaliação da expressão dos genes DLL4 e GAPDH por RT-PCR (<i>Sybr Green</i>).....	33
3.7 Imunohistoquímica.....	34
3.7.1 Coleta e processamento de amostras de timos humanos.....	35
3.7.2 Cortes histológicos, desparafinização e hidratação das lâminas.....	35
3.7.3 Bloqueio da peroxidase endógena.....	35
3.7.4 Recuperação antigênica.....	36
3.7.5 Bloqueio de sítios de ligações inespecíficas.....	36

3.7.6	Incubações com anticorpos primários.....	36
3.7.7	Realização das duplas marcações.....	37
3.7.8	Quantificação e análise da expressão de receptores e ligantes Notch em células FOXP3+ e S100+ no timo.....	39
3.8	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS.....	40
4.1	Caracterização das populações de timócitos e avaliação da expressão de genes de receptores e ligantes Notch.....	41
4.2	Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch no timo e correlação com a expressão dos respectivos genes.....	45
4.3	Caracterização da população nTreg no timo e avaliação da expressão de genes e proteínas de receptores e ligantes Notch e FOXP3.....	51
4.4	Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch em células FOXP3+ tímicas e correlação com a expressão dos respectivos genes.....	57
4.5	Caracterização e avaliação da distribuição das tDC no timo e expressão de genes de receptores e ligantes Notch.....	61
4.6	Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch em células S100+ no timo e correlação com a expressão dos respectivos genes.....	65
5.	DISCUSSÃO.....	69
6.	CONCLUSÃO.....	81
7.	ANEXOS.....	83
	Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCFMUSP).....	84
	Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCor).....	89
	Anexo C: Aprovação do Comitê de Ética (HCFMUSP)	92
	Anexo D: Aprovação do Comitê de Ética (HCor).....	93
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
APH-1	<i>Pharynx-defective 1</i>
BSA	Albumina de soro bovino
C	Região cortical do timo
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD4+CD8-	Timócitos CD4 simples-positivo
CD4+CD8+	Timócitos duplo-positivos
CD4-CD8-	Timócitos duplo negativos
CD4-CD8+	Timócitos CD8 simples-positivo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CH	Corpúsculo de Hassal
CM	Região córtico-medular tímica
CSL	<u>C</u> BF1/RBP-J κ , <i>Supressor of Hairless</i> e Lag-1
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAB	3-3'diamonibenzidina
DLL1	Ligante Delta-like 1
DLL4	Ligante Delta-like 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN1	Timócitos duplo-negativos estágio 1
DN2	Timócitos duplo-negativos estágio 2
DN3	Timócitos duplo-negativos estágio 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DSL	Delta, Serrate, Lag2
e cols.	e colaboradores
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase
GATA3	<i>Trans-acting T cell specific transcription factor GATA3</i>

GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCor	Hospital do Coração
Herp	<i>HES-related repressor protein</i>
Hes1	<i>Hairy/Enhancer of Split 1</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICD	<i>Intracellular Notch domain</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor interleucina 2
IPEX	Desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligados ao cromossomo X
JAG1	Ligante Jagged 1
JAG2	Ligante Jagged2
LIN	<i>Lineage Defective</i>
M	Medula tímica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
n	Número
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NOCTH1	Receptor Notch1
NOCTH2	Receptor Notch2
NOCTH3	Receptor Notch3
NOCTH4	Receptor Notch4
Nrarp	Proteína Nrarp
nTreg	Linfócitos T reguladores naturais
PBS	Tampão fosfato salino

PEN-2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
PEST	Domínio rico em prolina, glutamine, serina e treonina
pH	Potencial hidrogeniônico
Ptcra	<i>Pre T-Cell Antigen Receptor alpha</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RAM	<i>RBD-Jκ-associated module</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RBPJ	<i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SDG	Síndrome DiGeorge
SFB	Soro fetal bovino
t-Bet	<i>T-box transcription factor</i>
TCD4	Linfócito T auxiliares (CD4)
TCD8	Linfócitos T citotóxicos (CD8)
TCR	<i>T cell Receptor</i>
tDC	Células dendríticas tímicas
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th3	Células T auxiliares do tipo 3
TLSP	Linfopoetina estromal tímica
TNF	Fator de necrose tumoral
Tr1	Células T reguladoras do tipo 1
TRECs	<i>T Cell Receptor Excision Circles</i>
Treg	linfócitos T reguladores
ZSC	Zona subcapsular do timo

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
g	unidade gravitacional
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\%$	Porcentagem
n°	Número
rpm	Rotações por minuto
$\pm$	Mais ou menos
$<$	Menor
ΔCt	variação <i>Cicle threshold</i>
mm^2	Milímetro quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia mostrando seção de um timo humano, corado por hematoxilina e eosina, aumento de 100X.....	10
Figura 2: Curvas de amplificação sondas gene específicas.....	33
Figura 3: Curvas de amplificação e dissociação <i>primers</i> gene específicos.....	34
Figura 4: Caracterização das subpopulações de timócitos.....	42
Figura 5: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolados das populações de timócitos purificadas.....	43
Figura 6: Expressão relativa de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolados das subpopulações de timócitos purificadas.....	44
Figura 7: Quantificação de receptores e ligantes Notch1, 2, 3 e 4, DLL1 e 4, e Jagged1 e 2 por imunohistoquímica.....	47
Figura 8: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4-CD8-, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth no córtex tímico.....	48
Figura 9: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4+CD8+, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth na região córtico-medular.....	49
Figura 10: Correlação entre a média de expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4-CD8+ e CD4+CD8-, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth na medula tímica.....	50
Figura 11: Caracterização das nTreg no timo.....	52
Figura 12: Expressão do gene FOXP3 em RNA total de timócitos isolados de populações tímicas CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8- e CD4+CD25 ^{high}	53
Figura 13: Quantificação de FOXP3 por imunohistoquímica.....	54

Figura 14: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolado da subpopulação CD4+CD25 ^{high}	55
Figura 15: Expressão relativa de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolado na população CD4+CD25 ^{high}	56
Figura 16: Quantificação por imunohistoquímica de células FOXP3+ e receptor/ligante Noth+ no timo, nas regiões tímicas.....	58
Figura 17: Fotomicrografia do ensaio de imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína FOXP3 e receptores/ligantes Notch.....	59
Figura 18: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em células CD4+CD25 ^{high} , e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth em células FOXP3+.....	60
Figura 19: Caracterização das tDC no timo.....	62
Figura 20: Quantificação de S100 por imunohistoquímica.....	63
Figura 21: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA isolados da subpopulação CD11c+.....	64
Figura 22: Quantificação por imunohistoquímica de células S100+ e receptor/ligante Noth+ no timo e nas três regiões tímicas.....	66
Figura 23: Fotomicrografia do ensaio de imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína S100 e receptores/ligantes Notch.....	67
Figura 24: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em células CD11c+, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth em células S100+.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação da quantidade de reagentes utilizados por reação de síntese de cDNA.....**29**

Tabela 2: Relação e informações dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica.....**37**

Resumo

Bento-de-Souza L. **Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch nas populações de linfócitos T em desenvolvimento, T reguladores naturais e células dendríticas no timo humano.** [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012

O timo é o órgão linfóide primário responsável pela maturação dos linfócitos T onde se observam estruturas e células especializadas. A sinalização intra-tímica durante a maturação de linfócitos T não é bem esclarecida. Entre outras, a via de sinalização Notch, composta por receptores (Notch 1 a 4) e ligantes (DLL1, 3 e 4, Jagged 1 e 2), pode regular este processo. Neste trabalho temos como objetivo avaliar a expressão gênica e proteica de receptores e ligantes Notch nas diferentes fases de maturação de linfócitos T, linfócitos T reguladores naturais (nTreg) e células dendríticas tímicas (tDC). Para tanto, timos de 10 crianças submetidas à cirurgia cardíaca corretiva foram manipulados e as populações CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, nTreg e tDC foram purificadas por citometria de fluxo. O RNA total foi isolado e os genes NOTCH1, 2 e 3, DLL1 e 4, JAG1 e 2, FOXP3 foram amplificados por RT-PCR. Alguns fragmentos de tecido foram avaliados por imunohistoquímica, quanto a expressão dos receptores Notch 1, 2, 3 e 4 e dos ligantes, DLL1 e 4, Jagged 1 e 2 em timócitos totais, células FOXP3+ e células S100+ em cada região tímica. Todos os genes de receptores e ligantes Notch foram expressos nas populações estudadas. Na população CD4-CD8- o gene NOTCH1 é mais expresso em comparação as outras populações de timócitos imaturos. Na população CD4+CD8+ o gene NOTCH2 é menos expresso, e o gene JAG2 mais expresso quando comparados à população CD4+CD8-. Os demais genes de receptores e ligantes Notch são expressos de maneira similar entre as populações de timócitos. A avaliação relativa dos genes Notch nas populações de timócitos mostrou uma maior expressão do gene DLL1 na população CD4+CD8- e JAG1 na população CD4-CD8+ em comparação à CD4-CD8-. A expressão dos receptores e ligantes Notch no tecido mostrou ser homogênea entre as regiões. As nTreg expressam o gene do ligante JAG1 em maior nível entre os avaliados. A expressão gênica relativa das nTreg mostrou uma maior expressão de NOTCH1, NOTCH2, DLL4 e JAG1 e menor expressão de NOTCH3, DLL1 e JAG2 em relação as CD4-CD8-. Quando a relação utilizou a população CD4+CD8- observamos que as nTreg expressam mais os genes NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, DLL4 e JAG1, e em níveis similares DLL1 e JAG2. A avaliação histológica mostrou uma maior expressão de DLL4 em nTreg em comparação às demais proteínas avaliadas, e uma distribuição homogênea entre as regiões com exceção de Notch3 e Jagged2. As tDC mostraram uma maior expressão do gene JAG1 em comparação aos demais, e uma maior expressão da proteína DLL4. A expressão do receptor Notch2 em tDC difere entre as regiões tímicas. Em conjunto, nossos resultados mostraram que os receptores e ligantes Notch são expressos de forma gênica e proteica em todos os estágios de maturação de linfócitos T, nTreg e tDC do timo humano, com algumas variações quanto ao nível de expressão e distribuição no timo. Dados que se assemelham às avaliações murinas, porém com pontos a serem discutidos. Nossa inédita avaliação em nTreg propõem uma nova abordagem ao envolvimento da via Notch em sua maturação e a avaliação das tDCs sugere sua participação direta via Notch na maturação dos timócitos humanos.

Descritores: timo; populações de linfócitos T em desenvolvimento; linfócitos T reguladores; células dendríticas; receptores Notch.

SUMMARY

Bento-de-Souza L. **Evaluation of the expression of Notch receptors and ligands in developing lymphocytes, natural regulatory T cells and dendritic cells in human thymus.** [thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

The thymus is a primary lymphoid organ responsible of maturing T lymphocytes, where specialized structures and cells are observed. The intrathymic signaling during lymphocytes maturation is unclear. Among them, Notch signaling pathway, which comprises in receptors (Notch1-4) and ligands (DLL1, 2 and 3, Jagged1 and 2), may regulate this process. In this work our aim is to evaluate the expression of Notch receptors and ligands in different phases of T lymphocytes maturation, natural T regulatory cells (nTreg), and thymic dendritic cells (tDC). For this purpose, thymuses from 10 children who underwent corrective cardiac surgery were manipulated and populations CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, nTreg and tDC were sorted by flow cytometry. Total RNA was purified and genes NOTCH1, 2 and 3, DLL1 and 4, JAG1 and 2, FOXP3 were amplified by RT-PCR. Some thymic fragments were evaluated by immunohistochemistry and screened for expression of Notch 1, 2, 3 and 4 receptors, DLL1 and 4, Jagged and e 2 ligands in total thymocytes, FOXP3+ cells and S100+ cells in each thymic region. All Notch receptors and ligands genes were expressed in studied populations. In CD4-CD8- subset NOTCH1 gene is more expressed in comparison to others immature thymocytes. In CD4+CD8+ subset NOTCH2 gene is less expressed, and JAG2 gene is more expressed when compared to CD4+CD8- population. The other receptors and ligands genes were expressed in a similar level among developing lymphocytes subsets. The relative Notch genes evaluation in developing lymphocytes populations showed a higher expression of DLL1 gene in CD4+CD8- population and JAG1 gene in CD4-CD8+ subset in comparison to CD4-CD8- thymocytes. The Notch receptors and ligands expression in thymic tissue showed to be homogeneous between thymic regions. The nTreg cells express JAG1 ligand gene in highest level among evaluated genes. The relative gene expression in nTreg presented higher expression of NOTCH1, NOTCH2, DLL4 and JAG1 genes, and low levels of NOTCH3, DLL1 and JAG2 related to CD4-CD8- subset. When relative gene expression were performed using CD4+CD8- subset, we observed that nTreg cells expressed more NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, DLL4 and JAG1, and in a similar level of expression DLL1 and JAG2 genes. The histological analysis showed that DLL4 was more expressed in nTreg cells in comparison to others proteins evaluated in this work, and a homogeneous distribution in thymic regions, in exception Notch3 and Jagged2. tDC cells presented higher expression of JAG1 gene among the others, and a higher expression of DLL4 protein. Notch2 expression in tDC was different between thymic regions. All together, our results showed that both genes and proteins of Notch receptors and ligands are expressed in distinct developmental stages of the maturation of T lymphocytes and nTreg cells and in the tDC cells in human thymus, with some variations in levels of expression and distribution in the thymus. These data are similar to the murine evaluations, but with some issues to be discussed. Our unpublished assessment in nTreg propose a new approach about the involvement of Notch pathway in its maturation and the evaluation of tDC suggests its direct participation of Notch signaling in the process of human thymocytes maturation.

Descriptors: thymus; developing lymphocytes; regulatory T cells; dendritic cells; Notch receptors.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O órgão timo foi primeiramente descrito por Medawar (1963) como um órgão com acúmulo de linfócitos resultante de um acidente evolucionário, sem grande significância, de natureza redundante durante a evolução, visto como “um cemitério” de linfócitos apoptóticos. Posteriormente, Miller (1962) descreveu o timo como um órgão essencial para a maturação de células T em humanos, sendo evidenciado através de experimentos em modelos animais.

Estudos da década de 60 reportavam que a timectomia de camundongos adultos não era relacionada a nenhum defeito imune ou outros efeitos indesejáveis ao organismo. Ainda neste período, os imunologistas enfatizavam que as características de uma resposta imune não eram vistas no timo de camundongos normais imunizados, e células do baço e linfonodos desses camundongos poderiam transferir adotivamente resposta imune antígeno-específica em camundongos *não* imune, o que não era verificado com células do timo (Miller e cols., 1962).

Gowans e cols. (1962) demonstraram que timócitos extratímicos recirculados do sangue através dos tecidos linfóides, circulavam pela linfa e retornavam ao sangue via ducto torácico, e não voltavam ao timo. Essas células foram então conhecidas por representarem uma população homogênea capaz de responder a antígenos, como por exemplo, a rejeição a enxertos.

A análise histológica de camundongos que foram timectomizados ao nascimento revelou deficiência de linfócitos no sangue e tecidos linfóides, e a avaliação do fígado desses animais resultou em lesões, sugerindo infecção pelo vírus da hepatite. Mas quando esses animais foram enxertados com pele de outras linhagens de camundongos ou até mesmo de ratos, os enxertos não foram rejeitados. Esses dados demonstraram que o timo possui uma função imunológica e as células provenientes deste órgão seriam uma população especial de células com funções específicas (Miller e cols., 1961). Posteriormente foi demonstrado que camundongos timectomizados ao nascimento eram imunodeficientes, mesmo sem apresentarem sinais de doença (McIntire e cols., 1964), e que eram mais propensos a desenvolverem tumores do que camundongos normais (Miller e cols., 1964).

Já a timectomia de camundongos adultos era discutida como não resultar em imunodeficiência em sua maioria, mas esses animais tornaram-se imunodeficientes

de fato ao serem submetidos à irradiação na medula óssea seguida de reconstituição. Neste modelo experimental reforçou-se a ideia de que o timo, mesmo adulto, é essencial para a regeneração do sistema imune (Miller e cols., 1963).

1.1. Importância do timo no homem

O timo humano é o primeiro órgão linfoide a se formar durante a gestação, derivando-se da 3ª e 4ª bolsas branquiais. Ao nascimento, o timo apresenta cerca de 2/3 de seu peso maduro e alcança o pico de sua massa por volta dos 10 anos de idade. Subsequentemente, o timo continua a involuir e é substituído por tecido adiposo (Arkachaisri e Ballow, 1999; Cooper e Buckley, 1982), apresentando apenas uma atividade residual na vida adulta (Domínguez-Gerpe e Rey-Méndez, 2003).

É sabido que o timo é altamente ativo nos primeiros meses de vida humana (Janeway, 2002). A atividade de maturação de linfócitos T no timo é muito intensa durante a gestação. A partir do primeiro ano de vida esta atividade sofre uma redução de aproximadamente 3% ao ano até os 40 anos de idade. Após este período a redução de sua atividade cai para aproximadamente 1% ao ano pelo resto da vida (Steinmann e cols., 1985). Estima-se que a atividade tímica cessa aos 105 anos de idade (George e cols., 1996). Estas observações sugerem que o papel do timo no organismo pode variar de acordo com a fase da vida, especialmente quando comparamos a fase gestacional e pós-natal.

1.1.1. Timo na fase gestacional

A importância do timo durante a fase gestacional pode ser mensurada em pacientes portadores da Síndrome de DiGeorge (SDG). Esta condição é caracterizada por atimia congênita parcial ou total (Markert e cols., 2007) acompanhada de doença cardíaca congênita, hipoparatiroidismo e hipoplasia tímica ou atimia (DiGeorge, 1994). Além disso, os pacientes com SDG manifestam outros sintomas como, lábio e/ou palato leporino, rim único, atresia esofágica, vértebras em borboleta, anomalias de costelas e laringomalácia (Barrett e cols., 1981).

A maioria dos pacientes com SDG possuem um timo pequeno, o que permite a formação de um baixo número de células T, as quais têm funcionalidade normal (Piliero e cols., 2004). Esta condição é denominada SDG Parcial. Porém em

aproximadamente 1% ocorre ausência de timo funcional, condição conhecida SDG Completa. A SDG Completa é caracterizada pelo paciente possuir menos que 50 linfócitos T virgens (CD45RA+/CD62L+) por mm³ de sangue periférico (Markert e cols., 2007). Nesta condição há comprometimento total da resposta imune da criança levando a uma alta morbidade e óbito até aproximadamente os 2 anos de idade.

Recentemente, foi demonstrado que a sobrevivência média de 70% dos pacientes com SDG Completa pode aumentar para 4,7 anos com a realização de transplante de timo alogênico (Markert e cols., 2010). Este aumento da sobrevida foi acompanhado de reconstituição de linfócitos T funcionais e os efeitos adversos foram aceitáveis embora incluam a formação de respostas autoimunes e em casos mais graves enterocolite.

1.1.2. Timo na fase pós-natal

A importância do timo na fase pós-natal é observada após a timectomia. Há muitos anos sugere-se que a timectomia não compromete clinicamente os pacientes e por isso tem sido adotada rotineiramente em cirurgias cardíacas de neonatos nos últimos 30 anos (Rubinstein A. e cols, 1976; Moretta L. e cols, 1977).

Estima-se que uma a cada 100 crianças nasce com algum defeito cardíaco congênito (The Children's Heart Foundation - www.childrensheartfoundation.org). Entre os principais problemas observamos defeitos de septo, defeitos que causam obstrução dos vasos do coração, defeitos cianóticos e outras anormalidades. Alguns destes defeitos podem ser tratados com medicamentos até a idade adulta, porém, alguns podem ser letais ainda na fase neonatal. Nestes casos torna-se necessária uma cirurgia invasiva para correção do defeito.

O timo, localizado imediatamente atrás da extremidade superior do esterno e logo à frente do coração e grandes vasos, dificulta o acesso cirúrgico ao coração e suas estruturas associadas. Desta forma, torna-se necessária a timectomia, parcial ou total, para a exposição do campo cirúrgico (Brearley e cols., 1987). Além disso, a timectomia diminui a frequência de infecções e sangramentos locais que podem prejudicar o resultado da cirurgia, e seu reimplante não é feito para evitar a fibrose pós-cirúrgica, o que dificultará o acesso em caso de uma reintervenção cirúrgica.

O comprometimento imunológico pós-timectomia já foi demonstrado em roedores há muitos anos, com a manifestação de um estado de imunodeficiência parcial (Miller, 1961). Em seres humanos a timectomia não leva a criança a um estado de imunodeficiência como na SDG e, aparentemente, não influi de forma substancial na resposta imune, pois o repertório de receptores de linfócitos T (TCR) já está completo ao nascimento (Adkins e cols., 2004).

Atualmente sabemos que a timectomia tem impacto quantitativo sobre algumas subpopulações de linfócitos TCD4+, entre elas a população TCD4+CD45RA+CD62L+, fenótipo de células virgens, a qual está reduzida em adultos que foram timectomizados na infância (Prelog e cols., 2009). Nestes indivíduos foi observado um aumento gradual ao longo do envelhecimento do número de células TCD4+ de memória (CD45RO+CD28+).

Durante a recombinação somática para produção dos receptores TCR são formados círculos de excisão de DNA denominados TRECs (*T Cell Receptor Excision Circles*) cuja avaliação permite a identificação de linfócitos recém-emigrados do timo. Pacientes timectomizados apresentam uma redução da expressão de TRECs nos linfócitos do sangue periférico dias após a cirurgia (Madhok e cols., 2005). Essa redução também foi observada em períodos posteriores. A avaliação semestral de pacientes timectomizados mostrou que os níveis de TRECs reduzem intensamente no primeiro ano pós-cirurgia e gradualmente até os três anos (Mancebo e cols., 2008). A avaliação de pacientes submetidos à timectomia devido à realização de transplante cardíaco durante a infância mostrou efeito similar. Os 20 pacientes timectomizados devido ao transplante revelaram níveis dez vezes menores de TRECs em comparação a indivíduos saudáveis. Neste mesmo trabalho foi ainda observada uma redução de 100 vezes na diversidade dos genes β de receptores TCR dos pacientes (Ogle e cols., 2006).

Crianças timectomizadas nos primeiros anos após o nascimento também apresentam um nível reduzido de anticorpos totais IgA e IgG1 o que pode ser resultado da deficiência de colaboração dos linfócitos T com os linfócitos B (Eysteinsdottir e cols., 2004). Nestes pacientes foi ainda observado um número reduzido de linfócitos T, porém, o comparativo da proporção de linfócitos T reguladores (TCD4+CD25+) e T supressores (CD8+CD28-) é diferente de

indivíduos normais, sugerindo que nestes indivíduos ocorra maturação extratímica destas subpopulações de linfócitos (Torfadottir e cols., 2006). A maturação extratímica da população de linfócitos TCD4+CD25+ pode estar relacionada ao fato de, mesmo após a timectomia, estes pacientes não apresentarem alteração nos níveis de autoanticorpos, porém, na ocasião não foi avaliada a expressão do gene FOXP3 ou a funcionalidade desta população para afirmarmos que se tratava de linfócitos T reguladores (Torfadottir e cols., 2006).

Em termos de ativação da resposta imune adaptativa, a investigação de neonatos que sofreram infecção congênita por citomegalovírus mostrou que ao nascimento estas crianças possuem linfócitos TCD8 de memória funcionais (Holt, 2003).

A imunização de 17 crianças timectomizadas com a vacina contra a encefalite transmitida por carrapato (TBEV) revelou a produção de anticorpos específicos em níveis similares a crianças normais apenas após a terceira dose (Prelog e cols., 2008). Por outro lado, a avaliação dos níveis de anticorpos IgG produzidos contra o toxóide tetânico, sarampo e caxumba em crianças timectomizadas foi detectado em níveis normais quando comparados a indivíduos saudáveis (Torfadottir e cols., 2006).

Outra evidência de impacto negativo sobre a resposta imune adaptativa é mostrado em indivíduos que desenvolvem uma doença autoimune chamada Miastenia Gravis. Esta doença é caracterizada pela produção de autoanticorpos contra receptores de acetilcolina (AchR), apresentam uma gradual fraqueza e fadiga muscular. A realização da timectomia nestes indivíduos é capaz de conduzir 9% dos pacientes a remissão e 67% a melhoras clínicas provavelmente devido à diminuição da quantidade e, consequentemente, da ativação dos linfócitos T do indivíduo (Takanami e cols., 2009).

Quanto à ativação da resposta imune inata, a avaliação inicial dos parâmetros hematológicos de pacientes timectomizados durante a infância sugeriu um aumento do número de neutrófilos, o que poderia significar a maior ativação inata do sistema imune inato (Eysteinsdottir e cols., 2004). Porém, este mesmo grupo evidenciou dois anos mais tarde que esta característica não se manteve nos pacientes (Torfadottir e cols., 2006).

Embora até o momento não tenha sido evidenciado aumento da mortalidade e morbidade de indivíduos timectomizados durante a infância, é possível que a timectomia possa comprometer clinicamente estes indivíduos em fases posteriores da vida. As evidências conhecidas até o momento sugerem que a timectomia no período neonatal representa um relativo envelhecimento precoce do sistema imune o que gera um modelo interessante para o estudo da imunossenescência (Zlamy e Prelog, 2009). Este envelhecimento precoce pode acelerar o aparecimento de consequências clínicas observadas em indivíduos senis (Franceschi e cols., 2000; Franceschi e cols., 2007) exigindo maiores avaliações sobre seu desenvolvimento.

1.2. Timo: estrutura e função

O timo é um órgão linfoide primário o qual não possui potencial de autorrenovação, e depende constantemente da entrada de novos progenitores provenientes da medula óssea, circulantes no sangue (Foss e cols., 2001). É um sítio privilegiado para o desenvolvimento de linfócitos T, fornecendo uma série de fatores críticos que induzem e suportam o comprometimento das células-tronco provenientes da medula óssea com a linhagem T, sua diferenciação e sobrevivência (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

A estrutura do tecido tímico é melhor compreendida quando relacionada à sua função. Este órgão é constituído por vários lóbulos que são divididos em regiões distintas, fundamentais para os estágios de maturação dos linfócitos T, os quais sofrem migração coordenada entre os microambientes tímicos. Resumidamente, os progenitores oriundos da medula óssea adentram no timo pela região córtico-medular (CM), migram para córtex (C) pela zona subcapsular (ZSC) durante os primeiros estágios de maturação, e depois se movem novamente em direção à região CM, e depois para a medula (M), onde os timócitos atingem seu estágio mais maduro, tornando-se assim linfócitos T maduros (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

Na região do córtex há timócitos imaturos e macrófagos esparsos, que participam da eliminação de timócitos apoptóticos. A região medular abriga timócitos maduros, macrófagos e células dendríticas. Entre o córtex e a medula há células epiteliais que expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) I e II, denominadas HLA I e II em humanos. No

interior do timo, estas moléculas apresentam apenas peptídeos de antígenos próprios e são cruciais nos processos de seleção de linfócitos T (Male, 2002).

Em camundongos os progenitores de linfócitos T provenientes da medula óssea chegam ao timo e sofrem o processo de maturação por aproximadamente sete dias. Em camundongo jovem o timo contém cerca de 10^8 a 2×10^8 timócitos, e cerca de 5×10^7 novas células são produzidas diariamente. Entretanto, apenas 10^6 a 2×10^6 (2 a 4%) dessas células deixam o timo a cada dia como linfócitos T maduros. Estas observações indicam que aproximadamente 98% dos timócitos gerados morrem por apoptose dentro do próprio timo (Janeway, 2002).

Durante o desenvolvimento de linfócitos T no timo, o complexo processo de maturação envolve quatro estágios baseados principalmente na expressão dos correceptores CD4 e CD8 (Starr e cols., 2003). Os progenitores que migram para o timo não são comprometidos à linhagem T (Weerkamp e cols., 2006), e consequentemente não expressam CD4 e CD8 em sua superfície celular, e são descritos como timócitos duplo negativos (CD4-CD8-) (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). Os timócitos CD4-CD8- podem ser fenotipicamente e funcionalmente distinguidos em progressivos subestágios de maturação: DN1 que compreende aos novos progenitores provenientes da medula óssea e sangue (Petrie e Zúñiga-Pflücker, 2007), DN2 caracterizado por proliferação ativa, e DN3 sendo um importante subestágio de maturação onde ocorre comprometimento irreversível à linhagem T (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). A atividade dos genes de recombinases (RAG) 1 e 2 medeiam rearranjos dos loci de TRC β , TCR γ e TCR δ necessários para a formação do TCR, iniciam-se no subestágio de DN2 e continuam predominantemente no subestágio de DN3 (Godfrey e cols., 1994).

Timócitos imaturos que expressam cadeia TCR β funcional, os quais são associados com a cadeia pré-TCR α invariante e sinalização de moléculas CD3 para formar o complexo pré-TCR, são selecionados para a diferenciação da linhagem $\alpha\beta$. O pré-TCR medeia a seleção β por sinalização recuperando as células da apoptose, por extensa expansão celular e pela finalização da recombinação do locus TCR β , evoluindo para o estágio de duplo positivo (CD4+CD8+) (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

Durante a formação do TCR ocorre o processo de Recombinação Somática para formação da diversidade destes receptores, e são submetidos a dois diferentes processos de seleção, a positiva e a negativa. A seleção positiva consiste na ligação de linfócitos T imaturos CD4+CD8+ através de seus receptores TCR às moléculas HLA próprias expressas por células do epitélio tímico (Liu, 2006).

Os TCRs possuem grande diversidade quanto ao reconhecimento de antígenos e podem ser compostos por cadeias γ e δ ou α e β . A diversidade do TCR se deve ao fato deste receptor ser produto da Recombinação Somática de segmentos de genes, processo onde um número limitado de segmentos variáveis (V) e de junção (J), são aleatoriamente combinados para a formação de cadeias α e γ . Para a formação de cadeias β e δ são utilizados também segmentos de diversidade (D). A combinação VJ ou VDJ resulta na diversidade de cadeias e consequentemente a geração da diversidade do TCR (Salameire e cols., 2009).

Os linfócitos T selecionados positivamente migram para a junção córtico-medular e medular do timo onde ocorre a seleção negativa. Neste processo, as células que expressarem um TCR capaz de se ligar com afinidade média as moléculas HLA I ou II sobrevivem e aquelas que não possuírem afinidade ideal entram em processo de apoptose (Hogquist e cols., 2005). Este processo determina as populações dos linfócitos T, sendo TCD4+ caso haja afinidade com moléculas HLA-II e TCD8+ caso haja afinidade com moléculas HLA-I.

Na região medular tímica encontram-se estruturas especializadas chamadas Corpúsculos de Hassal (CH), os quais possuem células dendríticas que são fundamentais para o processo de maturação de timócitos medulares (Senelar e cols., 1976). Neste processo, os linfócitos T imaturos CD4+ ou CD8+ que expressarem TCR de alta afinidade às moléculas HLA sofrem apoptose e aqueles de baixa afinidade sobrevivem e tornam-se maduros. Como resultado deste processo os linfócitos maturados no timo predominantemente apresentam TCR compostos por cadeias α e β e expressam moléculas CD4 (TCD4+) ou CD8 (TCD8+) na membrana (95%). Outros linfócitos expressam TCR composto por cadeias γ e δ (T $\gamma\delta$) e cumprem funções especializadas nas mucosas.

Embora seja bem aceito o conceito que o estabelecimento da autotolerância no timo é mediado, principalmente, pela seleção negativa ou deleção clonal (Starr et al, 2003), muitos estudos sugerem que algumas células T autorreativas de média-alta afinidade às moléculas de HLA não são descartadas durante a ontogenia de células T e alcançam a circulação periférica. Estas células T autorreativas são destinadas a se tornarem células T CD4+ imunossupressoras (Bensinger e cols., 2001), denominadas linfócitos T reguladores naturais (nTreg) (Sakaguchi, 2004), que discutiremos com maiores detalhes nas sessões seguintes.

Figura1: Fotomicrografia mostrando seção de um timo humano, corado por hematoxilina e eosina, aumento de 100X. As regiões do timo são divididas em: (A) Zona Subcapsular; (B) Córtex; (C) Córtyco-medular; (D) Medula e (E) ainda na medula tímica, Corpúsculo de Hassal. (Imagem cedida pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da FMUSP).

Nos últimos anos diversos estudos têm avaliado as interações intratímicas com o intuito de elucidar a maturação dos linfócitos T. Durante a diferenciação intratímica, os progenitores de linfócitos tornam-se gradualmente restritos às

especificações da linhagem T, e a sua habilidade em diferenciar-se em linhagens alternativas é extinta. Todo este processo requer mecanismos de sinalização estritamente regulados. Entre diferentes vias de sinalização foi sugerida a participação sinalização Notch. Maillard e colaboradores (2005) sugeriram a participação do receptor Notch1 na determinação da linhagem T *versus* B durante a hematopoiese e outros estudos já avaliaram a expressão deste receptor durante o desenvolvimento de linfócitos T no timo de camundongos (Hasserjian e cols., 1996, Wilson e cols., 2000).

1.3. Via de Sinalização Notch

Notch é uma via de sinalização celular composta por receptores e ligantes da família de proteínas transmembrana evolutivamente conservadas encontradas em diversos organismos, de moscas *Drosophila* a humanos (Arvanitis-Tsakonas e cols., 1999). Enquanto a *Drosophila* possui apenas um receptor Notch, que pode ser ativado por dois ligantes transmembrana chamados Serrate e Delta, mamíferos possuem quatro receptores Notch (Notch 1 a 4) e cinco ligantes: Jagged 1 e 2 (homólogos ao Serrate), e Delta-like 1, 3 e 4 (homólogos ao Delta) (Radtke e cols., 2004).

Nos mamíferos, a presença de quatro receptores e cinco ligantes aumenta a possibilidade de diferentes combinações de interações receptor-ligante. Entretanto, os quatro receptores e cinco ligantes são diferentemente expressos e estritamente regulados durante o desenvolvimento linfoide (Parreira, 2003).

Ligantes Notch possuem uma larga região com domínio Delta-Serrate-Lag2 (DSL) e repetições tipo-EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor). Os receptores Notch também são proteínas transmembrana heterodiméricas; seu domínio extracelular possui repetições tipo-EGF e repetições LIN/Notch que previnem a sinalização ligante-independente. O domínio intracelular Notch (ICD, *i*ntracellul^{ar} *N*otch *D*omain) possui domínios que medeiam a transdução de sinal. Estes incluem domínios RAM e repetições de anquirina, que interagem com proteínas efetoras supressoras, sequências de localização nuclear e domínio PEST c-terminal, regulando a estabilidade da proteína (Lai, 2004).

A sinalização Notch é essencial para a regulação de uma variedade de eventos em diversos aspectos da diferenciação celular (Harper e cols., 2003). A interação entre ligantes Notch e seus receptores ativa esta via. Durante o trânsito à membrana, os receptores são submetidos a uma clivagem por protease tipo-furina no sítio externo da subunidade transmembrana criando um receptor heterodimérico com associação não-covalente nas subunidades extracelular e transmembrana. A interação com o ligante inicia duas clivagens que liberam o ICD da membrana. A primeira clivagem é metaloprotease-dependente e ocorre extracelularmente próximo ao domínio transmembrana. A segunda clivagem ocorre dentro do domínio transmembrana e é mediado por um complexo multiproteína com atividade γ -secretase contendo presilina, nicastrina, proteínas APH-1 e PEN-2 (Fortini, 2002).

Seguindo a clivagem, o ICD transloca-se ao núcleo, onde se liga ao fator de transcrição hélice-loop-hélice CSL/RBP-J (CBF1/RBP-J em mamíferos, Supressor de *Hairless* em *Drosophila*, Lag-1 em *C. elegans*) através de seus domínios RAM e repetições de anquirina (Fryer, 2002). A interação de ICD com CSL forma o complexo ICD-CSL, e este por sua vez liga-se a membros da família de Mastermind, o qual induz o deslocamento de proteínas corressoras (coR) e recruta proteínas coativadoras (coA), estimulando a transcrição dos genes alvo Notch (Radtke e cols., 2004). Alguns genes alvo Notch foram descritos, tais como: Hes-1 (Deftos e cols., 2000) e Herp (Iso e cols., 2001); nas células T há evidências dos genes: Deltex (Deftos e cols., 1998), Nrarp (Piot e cols., 2004), Ptcra (Deftos e cols., 2000), CD25 (Maillard e cols., 2006), IL-4 (Tanaka e cols., 2006), t-Bet (Minter e cols., 2005) e GATA-3 (Amsen e cols., 2007). Algumas proteínas regulam a sinalização Notch, entre elas incluem: Numb (atua para diminuir transdução de sinal Notch1-dependente), Deltex1 (inibe sinais Noth1, mas não Noth2 quando superexpressos em células tronco; no desenvolvimento de *Drosophila*, Deltex1 aumenta sinalização Notch, LRF (inibe sinalização Notch por mecanismos desconhecidos) e MINT (inibe transcrição Notch-dependente) (Yashiro-Ohtani e cols., 2010).

1.4. Receptores e ligantes Notch e o desenvolvimento de linfócitos T

A mais bem documentada função da sinalização Notch durante a hematopoiese é na decisão das linhagens T versus B (Wilson e cols., 2000; Arvatanis-Tsakonas e cols., 1999).

Por análises de imunohistoquímica, demonstrou-se que o Notch1 é expresso em diferentes níveis durante o desenvolvimento de células T, apresentando altos níveis de expressão nos estágios mais imaturos, por exemplo, o estágio de CD4-CD8-, com uma diminuição no estágio de CD4+CD8+, e com um nível intermediário de expressão no estágio de simples-positivo (CD4-CD8+ e CD4+CD8-) (Hasserjian e cols., 1996). Esses dados mostraram que a expressão de Notch1 é um processo dinâmico durante a diferenciação dos linfócitos T no timo. A ausência de Notch1 nas células-tronco hematopoiéticas bloqueia o desenvolvimento das células T no estágio DN1 (Radtke e cols., 1999), enquanto que a invalidação condicional de Notch1 no estágio de DN3 em camundongos não tem efeito no desenvolvimento das células T, sugerindo que a atividade de Notch1 é temporariamente restrita ao estágio precoce de desenvolvimento destas células (Wolfer e cols., 2001). Camundongos que possuem a sinalização Notch comprometida pela deleção condicional do gene que codifica Notch1 em progenitores hematopoiéticos falham completamente no desenvolvimento das células T. Progenitores da medula óssea, na ausência de Notch1, entram no timo e se desenvolvem em linfócitos B (Wilson e cols., 2001). Por outro lado, o receptor Notch2 regula a maturação de linfócitos B no baço (Saito e cols., 2003); porém este receptor pode estimular a maturação de linfócitos T *in vitro* na ausência de Notch1 (Radtke e cols., 2004). A ativação dos receptores Notch1 e Notch3 é crucial para a regulação da expressão e função dos sinais pré-TCR nos timócitos em estágios de desenvolvimento DN3 (Bellavia e cols., 2003). Por fim, em camundongos o receptor Notch4 é expresso em células endoteliais (Uyttendaele e cols., 1996), entretanto estudos com a transferência de células de cordão umbilical com expressão de Notch4 resultaram no desenvolvimento imaturo de linfócitos T na medula óssea e baço de camundongos, e o total bloqueio do desenvolvimento de linfócitos B (Vercauteren e Sutherland, 2004).

No timo, os ligantes Delta-like 1 e Delta-like 4 são expressos pelas células estromais, enquanto a expressão de Delta-like 3 não é detectada. A expressão dos ligantes Delta é maior no córtex quando comparada com a medula, reforçando a ideia que a ativação de Notch induzida por ligantes Delta é importante para o desenvolvimento precoce das células T. Em modelo animal foi verificado o ligante DLL4 favorece o comprometimento de precursores da medula óssea para a linhagem T e o seu completo desenvolvimento *in vitro* (Hozumi e cols., 2004; Mohtashami e cols., 2010). A inativação de DLL4 em células epiteliais tímicas resultou em bloqueio completo no desenvolvimento de células T acompanhado por desenvolvimento ectópico de células B no timo, iguais a camundongos com deficiência de Notch1 (Hozumi e cols., 2008).

A expressão de Jagged1 é restrita ao epitélio tímico, enquanto que Jagged2 é expresso em células linfoides e estromais do timo, sugerindo que os ligantes Jagged podem participar de uma forma distinta no desenvolvimento das células T mediados pela sinalização Notch (Parreira e cols., 2003). O ligante Jagged1 pode regular a interação entre timócitos e células do estroma tímico, enquanto Jagged2 pode estar envolvido nas interações entre timócitos (Felli e cols., 1999)

1.5. Linfócitos T reguladores naturais e adquiridos

Entre os linfócitos TCD4+ maduros podemos observar algumas populações com funções especializadas, entre elas uma caracterizada por expressar, além do CD4, a molécula CD25. Aproximadamente 5-10% dos linfócitos TCD4+ periféricos expressam constitutivamente CD25 (IL-2R), tanto em camundongos quanto em humanos (Baecher-Allan e cols, 2001). A expressão do CD25 não é específica para determinarmos uma população de linfócitos, uma vez que esta molécula também é expressa em estágios precoces de maturação (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). Porém, a avaliação da expressão intracelular de uma molécula chamada FOXP3 (Hori e cols, 2003) os linfócitos CD4+, CD25+ e FOXP3+ constituem uma população com atividade reguladora sobre o sistema imune. Por serem naturalmente maturados no timo estes linfócitos T são denominados linfócitos T reguladores naturais (nTreg) (Sakagushi e cols, 2007).

Além do fenótipo dos nTreg ser caracterizado por CD4+CD25+FOXP3+, estes linfócitos também expressam constitutivamente outras moléculas de superfície celular como CD62L, CTLA-4, CD28, GITR (receptor de TNF induzido por glicocorticóide) e neuropilina-1 (Fehérvári e cols, 2004).

Dois modelos experimentais deram início a caracterização funcional dos linfócitos nTreg. No primeiro modelo, os autores demonstraram que a timectomia neonatal em camundongos normais (NTx) com idade entre os dias 2 e 4 após nascimento, resultou na destruição dos ovários. Os autores sugeriram que este fenômeno poderia estar relacionado à deficiência de hormônio com tropismo ovariano secretado pelo timo. Essas lesões ovarianas foram identificadas em um momento posterior como sendo de natureza autoimune, pois a investigação dos NTx revelou danos teciduais inflamatórios em outros órgãos e houve a detecção de autoanticorpos na circulação. Os autores ainda verificaram em certas linhagens de camundongos NTx o desenvolvimento de tireoidite, gastrite, orquite, prostatite e sialoadenite (Nishizuka e Sakakura, 1969). No segundo modelo experimental os autores reportaram que a timectomia de ratos adultos normais (ATx) seguida de radiação X duas vezes por semana por 4 ciclos produziram tireoidite autoimune acompanhada por produção de autoanticorpos anti-tireoglobulina (Penhale e cols, 1973).

Outros autores demonstraram posteriormente em modelos experimentais de Diabetes do tipo 1, uma doença autoimune, que a inoculação de linfócitos T normais de animais singênicos inibia a doença (Sakagushi e cols, 1982; Penhale e cols, 1976). Esses dados sugeriram a existência de populações de linfócitos T reguladores que eram responsáveis pela manutenção da autotolerância periférica (Fehérvári e cols, 2004).

A relação entre a expressão do FOXP3 e os linfócitos T reguladores foi primeiramente sugerida pela avaliação de camundongos *scurfy*. Esses camundongos desenvolvem uma doença linfoproliferativa fatal ligada ao cromossomo X, caracterizada por imunopatologia grave em múltiplos órgãos, alergias e doença inflamatória do intestino. Estudos evidenciaram que o fenótipo destes camundongos, que é muito semelhante à sintomatologia da doença IPEX (síndrome de imunodeficiência ligada ao cromossomo X) em humanos, era causado por mutações

no gene *foxp3*. Powell e colaboradores (1982) reportaram o primeiro caso de síndrome de IPEX e nesta doença as mutações em FOXP3 impedem o desenvolvimento das nTreg, resultando em hiperativação dos linfócitos T reativos contra antígenos próprios e bactérias comensais no intestino, causando poliendocrinopatia autoimune, doença inflamatória intestinal e fenômenos alérgicos (Lyon e cols, 1990).

Embora timócitos imaturos FOXP3+ tenham sido identificados no timo humano (Tuovinen e cols., 2008a,b) pouco se sabe a respeito dos requisitos para o desenvolvimento das nTreg. O desenvolvimento das nTreg necessita de interações de alta-afinidade entre seus TCRs e complexo HLA-peptídeo próprio apresentado pelas células estromais tímicas (Picca e cols., 2006). As células do estroma tímico também fornecem sinais coestimuladores que são necessários para o desenvolvimento das nTreg e a presença de IL-2 e IL-7 no microambiente tímico são fundamentais para o desenvolvimento destas células em camundongos (Sakagushi e cols., 2008). Dadas as similaridades do desenvolvimento de timócitos entre camundongos e humanos, é possível que muitos desses requisitos em camundongos sejam similares em humanos para o desenvolvimento das nTreg. Entretanto, os corpúsculos de Hassal (Hassal, 1849) estrutura encontrada no timo humano e em menor grau de desenvolvimento no timo animal, podem contribuir para a formação do microambiente especializado necessário para a geração das nTreg (Watanabe e cols, 2005).

Na região medular tímica, existem os Corpúsculos de Hassal que são agrupamentos de células epiteliais. Há evidências que essa é uma região importante para a maturação de timócitos medulares (Senelar e cols, 1976). Watanabe e colaboradores (2005) demonstraram que os corpúsculos de Hassal são locais de indução e seleção de linfócitos T reguladores. Nesse estudo os autores evidenciaram que essas estruturas expressam linfopoetina estromal tímica (TSLP), que ativam fortemente as células dendríticas tímicas (tDCs) CD11c+ para que estas expressem altos níveis de CD80 e CD86, e uma vez ativadas essas células são capazes de induzir a proliferação e diferenciação de timócitos CD4+CD8-CD25- em linfócitos T reguladores CD4+CD25+FOXP3+. Não se conhece o mecanismo exato deste processo, apenas que depende de moléculas de HLA classe II e da presença de CD80 e CD86, assim como de IL-2. Estes estudos sugerem que os Corpúsculos de Hassal

possuem um papel importante na seleção positiva secundária de linfócitos T autorreativos, resultando na geração de nTreg.

Há extensa evidência que linfócitos T reguladores também podem ser gerados fora do timo. Estes linfócitos são classificados como T reguladores adquiridos (Treg). Os principais grupos de linfócitos Treg são designados como Tr1 (linfócitos T reguladores do tipo 1) e Th3 (linfócitos T *helper*-3). Os linfócitos Tr1 são induzidos por IL-10 e tem função supressora via produção de TGF- β , porém não expressam FOXP3. Em alguns casos, as Tr1 podem secretar citocinas adicionais, tais como IL-5 e interferon (IFN)- γ (Bataglia e cols, 2006). Os linfócitos Th3 são induzidos por TGF- β e expressam FOXP3 (Wiener e cols, 2001). Ambos os tipos de Treg adquiridas podem participar do controle da autoimunidade (Lan e cols, 2005).

A distinção entre os nTreg e Treg pode ser devido ao antígeno cognato. Enquanto os nTreg são selecionadas com antígenos-próprios e podem ser responsáveis pelo controle dos linfócitos T autorreativos antes que a tolerância seja quebrada, as Treg são possivelmente encontradas em sítios de inflamação nos quais seria plausível converter linfócitos T ativados em células supressoras (Jaeckel e cols, 2006).

As nTreg exercem supressão mediada por mecanismos dependentes de contato celular via CD39, CD73 e LAG-3, ou independentes de contato celular via IL-10, TGF- β , IL-35, galectina-1 e privação de IL-12 necessária para a expansão ou sobrevivência dos linfócitos T respondedores (Shevach, 2009). É muito provável que vários mecanismos de supressão atuem sinergicamente e de maneira complementar, dependendo de diferentes condições. Outro mecanismo proposto para a inibição mediada por nTreg envolve a expressão de CTLA-4. As nTreg expressam constitutivamente altas quantidades de CTLA-4 e o bloqueio desta molécula por anticorpo monoclonal favorece o desenvolvimento de doenças autoimunes órgão-específicas em camundongos (Takahashi e cols, 2000). Além disso, o gene FOXP3 induz a expressão de CTLA-4 por ligação com a região promotora do gene *Ctla-4* em nTreg (Zheng e cols, 2007).

1.6. Sinalização Notch e nTreg

Estudos em camundongos sugerem que a sinalização Notch tem participação na diferenciação dos linfócitos nTreg. A sinalização Notch pode modular o promotor de *foxp3* através de mecanismos RBP-J-dependentes e HES1-dependentes (gene alvo Notch repressor de transcrição) em camundongos. Os complexos ICD-RBP-J e HES-1 podem interagir com o sítio altamente conservado de RBPP-J e com N-boxes (sítio de ligação de HES) localizados na região 5' do gene *foxp3*, respectivamente. Este complexo ICD-RBP-J é um transativador, enquanto HES-1 é um transrepressor do promotor de FOXP3 *in vitro*. O mesmo complexo liga-se ao promotor de *foxp3* em nTregs e linfócitos T CD4+CD25-, sugerindo que a expressão de FOXP3 pode ser diretamente regulada pela sinalização Notch (Ou-Yang e cols, 2008). Em humanos foi observado que o estímulo com fitohemaglutinina de linfócitos T isolados do sangue periférico resulta em um aumento da expressão de moléculas envolvidas na sinalização Notch em linfócitos nTreg quando comparados a linfócitos T CD4+CD25- (Ng e cols, 2001).

Tendo em vista a relevância das nTreg no controle da homeostase do sistema imune e a escassez de dados que esclareçam seus mecanismos de proliferação e maturação intratímica, torna-se fundamental e indispensável o estudo da maturação destas células no timo humano.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de proteínas e genes de receptores e ligantes Notch em linfócitos nas diferentes fases de maturação, nTreg e tDCs no timo humano.

2.2 Objetivos específicos

A) Caracterização fenotípica e purificação das populações de timócitos: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8-, CD4+CD25^{high} (nTreg) e CD11c+ (tDCs);

B) Avaliação da expressão de genes de receptores e ligantes Notch e FOXP3 nas populações tímicas: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8- e tDCs;

C) Avaliação inédita da expressão de genes de receptores e ligantes Notch e FOXP3 em nTreg intratímicas;

D) Quantificação e localização de receptores e ligantes Notch no tecido tímico total, regiões (córtex, córtico-medular e medula), nTreg e tDC.

E) Correlações entre expressão gênica e proteica de receptores e ligantes Notch nas populações de estudo.

MATERIAS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Casuística

Analizamos as populações de timócitos, Treg e tDC e os tecidos provenientes de cerca de 10 timos humanos (idade variando entre 2 dias a 6 anos, média de idade de 3 anos e 2 meses) obtidos de pacientes com cardiopatia congênita – sem sinais de imunodeficiências e submetidos à cirurgia cardíaca – procedentes do Hospital do Coração (HCor), Associação do Sanatório Sírio, São Paulo. Deve-se ressaltar que a timectomia é realizada rotineiramente pela equipe de cirurgia cardiopediátrica do Hospital do Coração.

Para a realização desta pesquisa, a utilização dos timos teve o consentimento prévio dos pais ou responsáveis pelos menores, bem como a aprovação do Comitê de Ética do Hospital do Coração (HCor) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), ambos devidamente documentados (seção Anexos) .

3.2. Dissociação do tecido tímico

Após a remoção, os tecidos tímicos foram encaminhados imediatamente ao laboratório para manuseio e preparo das amostras. Os timos foram fragmentados e incubados por 10 minutos a 37°C com 10mL de solução de digestão (RPMI 1640 [Gibco] pré-aquecido a 37°C + colagenase A [Roche Applied Science] a 0,5mg/mL + DNase I [Roche Applied Science] a 0,02 mg/mL + 5% de soro fetal bovino [Life Technologies] - SFB). Após este período, o tecido digerido foi macerado sobre uma peneira com um êmbolo de seringa estéril.

Após este processo as células foram lavadas com tampão de lavagem 1 (50mL de RPMI 1640 [Gibco] pré-aquecido a 37°C + 0,1mg/mL de colagenase A [Roche Applied Science] + 0,02mg/mL de DNase I [Roche Applied Science]) e centrifugadas a 540g por 5 minutos a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspensionado para nova lavagem com o tampão de lavagem 1. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado e lavado por duas vezes em tampão de lavagem 2 (PBS 1x concentrado a 4°C [Sigma Aldrich] + EDTA [Amresco] 5mM + 0,02mg/mL DNase I [Roche Applied Science] + 5% de SBF [Life Technologies]) e

centrifugado a 540g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, a suspensão foi submetida aos protocolos de separação.

3.3. Separação de células tímicas

Após processo de digestão do tecido tímico, as células do timo foram separadas por centrifugação utilizando dois métodos: Ficoll-Paque PLUS (GE) densidade 1.077 e Percoll (LGC Biotecnologia) a 52%. Para tal, a suspensão de células resultante do processo de digestão foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o sedimento em 20mL RPMI 1640 (*Gibco*) e mantivemos sob gelo até o momento do uso na separação.

Para a separação de timócitos utilizamos 5 mL da suspensão celular sobre 5 mL Ficoll-Paque PLUS (GE) densidade 1.077 em tubo de propileno cônico estéril (capacidade 50mL), e centrifugamos a 2000 rpm, por 20 minutos, com breque mínimo para desaceleração. O anel de células rico em timócitos foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur, e foram lavadas 2 vezes com RPMI 1640 [*Gibco*].

Para a separação de fração rica em células dendríticas tímicas, a suspensão de células resultante do processo de digestão foi centrifugada a 540 g por 5 minutos a 4°C. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o sedimento celular em volume de RPMI 1640 [*Gibco*] de modo a ajustar a concentração de células para $1,5 \times 10^8$ células/2 mL e mantivemos em gelo até o momento do uso na separação. Na sequência, colocamos em tubo propileno cônico estéril (capacidade 15mL) 2mL da suspensão celular com concentração de células ajustadas sobre 2mL de Percoll (LGC Biotecnologia) a 52%, em seguida acrescentamos 1mL de SFB [*Life Technologies*] sobre a suspensão, formando três camadas distintas. Centrifugamos os tubos a 1700g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, coletamos o anel de células tímicas, ressuspendemos em solução de lavagem PBS a 4°C [*Sigma Aldrich*] + EDTA [*Amresco*] 5mM + 5% de SBF [*Life Technologies*]) e centrifugamos a 540 g por 5 minutos a 4°C; este procedimento foi repetido 2 vezes. Após esta etapa, as células coletadas constituíram uma fração rica em células dendríticas tímicas.

Após protocolos de separação, as células foram submetidas ao procedimento de congelamento viável para uso posterior.

3.4. Congelamento viável e manuseio de células tímicas em suspensão

Após lavagem das células, calculamos o rendimento total de células obtidas da separação por Ficoll e/ou Percoll de modo que houvesse uma concentração de 50×10^6 células por tubo de criopreservação, em no máximo 2 mL de solução de congelamento (10% Dimetilsulfóxido [DMSO - *Synth*] + 90% SFB [*Life Technologies*]). As células foram congeladas lentamente com auxílio de caixas de congelamento lento contendo álcool isopropílico (*Synth*) na parte inferior (*Freezing Box – Nalgene Nunc*), armazenadas a -80°C por no máximo 3 dias, e depois estocadas em nitrogênio líquido para uso posterior.

Para o uso das células em suspensão congeladas viavelmente, antes de retirá-las do nitrogênio líquido, aquecemos banho-maria a 37°C e pré-aquecemos RPMI 1640 [*Gibco*] utilizado para lavagem das células. Depois de retirada as ampolas de células do nitrogênio líquido, colocamos em banho-maria 37°C imediatamente, homogeneizando os criotubos vagarosamente até o total descongelamento da suspensão. Após, lavamos as células 2 vezes com 15 mL de RPMI 1640 [*Gibco*] a 37°C , centrifugamos 1500 rpm por 10 minutos.

3.5. Imunofenotipagem, caracterização e purificação de populações de timócitos, linfócitos nTreg e tDC por citometria de fluxo

As células do tecido tímico foram submetidas às marcações de superfície para a caracterização de: timócitos CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4-CD8+,nTreg e tDC. Para tal, timócitos em suspensão foram marcados simultaneamente com anticorpos dirigidos a proteínas de superfície que identificam as diversas fases de maturação tímica, células do componente do estroma tímico (células dendríticas) e proteína intracelular para a identificação de células com fenótipo regulador. Para as marcações foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-: CD3 PE-Cy7 (*BD Bioscience*), CD8 PE (*BD Bioscience*), CD4 FITC e APC (*BD Bioscience*), CD25 FITC (*BD Bioscience*), FOXP3 APC (*eBioscience*), CD11c PE (*BD Bioscience*), além dos respectivos controles isotípicos.

Para a fenotipagem de células reguladoras FOXP3+, foram utilizados 1×10^6 de timócitos ressuspensos em 100 μL de tampão de coloração a 4°C e as moléculas de superfície foram marcadas utilizando os anticorpos monoclonais anti- CD8, anti-

CD4 e anti-CD25 (BD Bioscience Pharmingen). As células foram então marcadas intracelularmente com o anticorpo anti-FOXP3 utilizando-se o *kit Foxp3 Staining Set* (eBioscience San Diego, CA, USA), segundo especificações do fabricante. Em suma, após a marcação das moléculas de superfície, as células foram lavadas com PBS e então incubadas com 1mL da solução de fixação/permeabilização por 30 minutos no escuro a 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de permeabilização e em seguida ressuspensas com 100 µL do mesmo tampão e incubadas com 2 µL de soro normal de rato (*kit* eBioscience) por 15 minutos a 4°C para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com 5 µL do anticorpo anti-Foxp3 (eBioscience) a 4 °C por 30 minutos no escuro. Após este período as amostras foram lavadas novamente e então ressuspensas em 200 µL de paraformaldeído 1% para posterior aquisição em citômetro de fluxo BD FACS-Aria II.

Para a purificação das populações de timócitos e células dendríticas tímicas, foram utilizados em torno de 50×10^6 “pool” de timócitos e células dendríticas (por tubo de aquisição) ressuspensos em 100 µl em tampão de citometria a 4°C e incubados com anticorpos anti-: CD4 FITC e APC (50µL), CD8 PE (10µL), CD25 FITC (100µL) e CD11c PE (100µL), durante 30 minutos a 4°C no escuro. Ao término da incubação, as células foram lavadas em tampão de citometria a 4°C e então ressuspensas em 1 mL de tampão de citometria a 4°C e submetidas à aquisição para purificação das populações: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4+CD25^{high} (nTreg) e CD11c+ (tDC). Foram adquiridas o máximo de células possíveis no *gate* de linfócitos em citômetro de fluxo BD FACS-Aria II, obtendo-se dessa forma valores percentuais das subpopulações de timócitos e células dendríticas tímicas. O software FlowJo™ (*Tree Star*, Ashland, OR) foi utilizado para análise dos dados.

Para cada população purificada foi avaliado o rendimento de células, pois o número de células influenciou na escolha do *kit* utilizado para purificação de material genético.

3.6. Expressão de genes FOXP3 e de receptores e ligantes Notch nas populações purificadas

Para quantificação dos gene FOXP3 e dos genes de receptores e ligantes Notch (Notch 1, 2, 3; Delta-like 1 e 4; Jagged 1 e 2) foi utilizado o método de PCR em tempo-real quantitativo (RT-PCR). O RNA total foi extraído das populações de timócitos (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8-), nTreg (CD4+CD25^{high}) e células dendríticas tímicas (tDC – CD11c+) previamente purificadas usando método baseado em coluna sílica (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

Logo após a purificação das populações por citometria de fluxo, acrescentamos em cada uma delas quantidade de reagente necessária para lise das células, de acordo com o protocolo do fabricante (item 3.6.1).

3.6.1. Purificação de RNA

Após purificação das populações, obtivemos diferentes rendimentos finais de células; por tal motivo utilizamos dois *kits* com capacidades diferentes por coluna de purificação para a obtenção de RNA (ambos da marca *QIAGEN*). O *kit RNeasy Plus Micro* nos permitiu extrairmos material genético numa concentração menor ou igual a 5×10^5 células/coluna, e o *kit RNeasy Plus Mini* maior do que 5×10^5 células/coluna até 1×10^7 células/coluna. Em geral, utilizamos o *kit RNeasy Plus Micro* para as populações de tDC e nTreg, e o *kit RNeasy Plus Mini* para as outras populações purificadas (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8-).

3.6.1.1. Purificação de RNA utilizando coluna *RNeasy PLUS MINI*

Resumidamente, para a extração de RNA na coluna *kit RNeasy Plus Mini* (QIAGEN), as células foram lisadas e acrescentamos 600 µL de tampão de lise RLT Plus e homogeneizamos vigorosamente por 1 minuto. Após, o lisado foi pipetado diretamente na coluna *QIAshredder* para reduzir a viscosidade da amostra e eliminar materiais insolúveis, e centrifugamos em velocidade máxima (14.800 rpm) por 2 minutos. Após, transferimos o lisado homogeneizado para coluna *gDNA Eliminator* para eliminar o DNA genômico na amostra, e centrifugamos a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartamos a coluna e retivemos o sobrenadante. Adicionamos 600 µL

de etanol 70% ao sobrenadante e homogeneizamos vigorosamente com a pipeta. A adição do etanol na amostra permite promover condições favoráveis para a ligação do RNA presente na amostra à membrana da coluna. Transferimos 700 µL de amostra com etanol 70%, incluindo qualquer precipitado que possa eventualmente ser formado, à coluna *RNeasy*. Centrifugamos a 10.000 rpm por 15 segundos. Descartamos o sobrenadante e adicionamos 500 µL de tampão *RPE* à coluna e centrifugamos a 10.000 rpm por 15 segundos para lavar a membrana da coluna. Repetimos este procedimento e após, centrifugamos a coluna com a tampa aberta em velocidade máxima (14.800 rpm) por 1 minuto para eliminar todo o etanol remanescente. Colocamos a coluna em tubo coletor limpo e eluímos o RNA adicionando 20µL de água ultra pura livre de RNase e DNase (*Life Technologies*), centrifugando a 10.000 rpm por 1 minuto. O rendimento e pureza foram avaliados por espectrofotometria (Nanodrop, ND1000, Thermo Scientific) e a razão A260/280 >1.8 foi considerada aceitável. As amostras de RNA purificadas foram imediatamente congeladas a -80°C para uso posterior.

3.6.1.2. Purificação de RNA utilizando coluna *RNeasy PLUS MICRO*

Resumidamente, para a extração de RNA na coluna *kit RNeasy Plus Micro* (QIAGEN), lisamos as células acrescentando 350 µL de tampão de lise RLT Plus e homogeneizar vigorosamente por 1 minuto. Os procedimentos posteriores são os mesmos citados no item 3.6.1.1., com exceção nas etapas de lavagem as quais adicionamos 700 µL de tampão *RWI* à coluna e centrifugamos a 10.000 rpm por 15 segundos para lavar a membrana da coluna, além do tampão *RPE*. Após a lavagem da membrana da coluna, acrescentamos a coluna 500 µL etanol 80%, centrifugando à 10.000 rpm por 2 minutos para lavar membrana da coluna. Para eliminar o etanol remanescente, centrifugamos a coluna com a tampa aberta em velocidade máxima (14.800 rpm) por 5 minutos. A seguir, a coluna foi colocada em tubo coletor limpo e eluímos o RNA adicionando 15µL de água ultra pura livre de RNase e DNase (*Life Technologies*), centrifugando em velocidade máxima (14.800 rpm) por 1 minuto. O rendimento e pureza foram avaliados por espectrofotometria (Nanodrop, ND1000, Thermo Scientific) e a razão A260/280 >1.8 foi considerada aceitável. As amostras de RNA purificadas foram imediatamente congeladas a -80°C para uso posterior.

3.6.2. Síntese da cadeia de DNA complementar (cDNA)

Após a purificação do RNA, a síntese da primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi efetuada por transcriptase reversa PCR (RT-PCR) usando o *kit* Sensiscript (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir. A escolha desse *kit* se deu em função da pouca quantidade de RNA obtida em algumas populações deste estudo, permitindo síntese de cDNA a partir de até 50ng de RNA/reação.

Ao iniciar o procedimento, descongelamos as amostras de RNA das populações em gelo. Descongelamos todos os reagentes do *kit* em temperatura ambiente e depois preservamos também em gelo até o momento do uso.

Em linhas gerais, preparamos a mistura dos reagentes conforme tabela 1 (volume por reação), homogeneizamos por 5 segundos e estocamos em gelo até o momento do uso. A seguir, a amostra de RNA foi acrescentada de maneira que a concentração final atingisse 50ng/reação. A mistura foi homogeneizada por 5 segundos e incubar por 60 minutos a 37°C.

Após este período, as amostras foram conservadas em gelo e diluídas a 1:4 com água ultra-pura livre de RNase e DNase (*Applied Biosystems- Life Technologies*) e finalmente estocadas a -80°C até o momento do uso na reação de RT-PCR para análise dos genes de estudo.

COMPONENTE MASTER MIX	VOLUME/REAÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tampão RT 10 X	2,0 µL	1 X
dNTP Mix	2,0 µL	0,5 mM cada dNTP
Primer Oligo-dT	2,0 µL	1 µM
Inibidor RNase	1,0 µL	10 unidades (por reação)
Transcriptase Reversa Sensiscript	1,0 µL	---
Água livre de RNase	Variável (volume de amostra dependente)	---
AMOSTRA RNA		
RNA	Variável	50ng por reação
VOLUME TOTAL POR REAÇÃO	20,0 µL	

Tabela1: Relação da quantidade de reagentes utilizados por reação de síntese de cDNA.

3.6.3. Avaliação da expressão dos genes de receptores e ligantes Notch e FOXP3 por RT-PCR

Para quantificação da expressão do gene FOXP3 e dos genes de receptores e ligantes Notch (Notch 1, 2, 3; Delta-like 1 e 4; Jagged 1 e 2) foi utilizado o método de PCR em tempo-real quantitativo (RT-PCR). Utilizamos duas metodologias diferentes: amplificação com *primers* gene específicos e *Sybr Green*, e amplificação com sondas gene específicas *TaqMan* (ambos *Applied Biosystems-Life Technologies*), utilizando a plataforma AB 7500 Sistema de PCR em tempo real (*Applied Biosystems-Life Technologies*). Os controles para contaminação exógena (não adição de cDNA) e contaminação do DNA genômico (reações onde a transcriptase reversa não foi adicionada) foram incluídos em todas as reações de RT-PCR. Realizamos as quantificações dos genes de interesse nas populações de estudo: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8-, nTreg e tDC.

A reação de RT-PCR necessita de normalização para uma leitura adequada dos dados. Para tal, é necessário a utilização de genes que apresentem transcritos com expressão uniforme em todas as células do organismo ou entre as espécies que estão sendo analisadas, bem como durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais. Esses genes são chamados genes-referência ou *housekeeping*. Para nossos experimentos utilizamos o gene-referência gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). O produto deste gene catalisa uma etapa importante no metabolismo do carboidrato, a fosforilação reversível oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato na presença de fosfato inorgânico e dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD). Pseudogenes muito semelhantes ao GAPDH estão presentes no genoma humano (*RefSeq, NCBI*). Desta forma, o gene GAPDH foi escolhido como controle endógeno no presente estudo, a fim de testar a integridade das amostras avaliadas e também para a normalização dos níveis de expressão dos genes estudados.

A expressão dos genes alvo de estudo por RT-PCR foi calculada usando o ΔC_t (*Cycle threshold*-valores de C_t foram fornecidos pelo *software* do aparelho 7500 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems – Life Technologies*) e foram exportados para análise em uma planilha do Excel [Microsoft Inc.]), ou o valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de acordo com o método de Livak e cols, 2001.

O valor do Ct serve como ferramenta para o cálculo da quantidade inicial de transcritos na amostra. Dessa maneira, o Ct é o valor do ciclo da reação de RT-PCR primeiramente detectável para um gene em estudo. Portanto, quanto mais um gene é expresso em uma determinada amostra de RNA, menor o valor de Ct.

Os resultados expressos pelo valor do ΔCt , por exemplo, do gene alvo 1 na população 1, compreendem na equação (de normalização):

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo 1 na população 1} - Ct \text{ gene } housekeeping \text{ na população 1}$$

Para os resultados expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e cols., 2001) utilizamos a população de timócitos CD4-CD8- como população padrão para a realização do cálculo. A escolha dos timócitos CD4-CD8- como população padrão se baseou no fato de ser a população purificada no estágio mais precoce de maturação de timócitos e por ter expressado todos os genes alvo envolvidos neste estudo. Apenas para os resultados da expressão relativa de genes na população nTreg utilizamos, além da população CD4-CD8-, a população CD4+CD8- por representar o mesmo estágio de maturação da população de estudo.

Portanto, para os resultados expressos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, por exemplo, do gene alvo 1 na população 1, os valores de $\Delta\Delta Ct$ compreendem na equação:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gene alvo 1 na população 1} - \Delta Ct \text{ gene alvo 1 na população padrão (CD4-CD8-)}$$

Para tal, utilizamos as sondas: NOTCH1 (Hs01062014), NOTCH2 (Hs01050702), NOTCH3 (Hs01128541), JAG1 (Hs01070032), JAG2 (Hs00171432), DLL1 (Hs00194509), DLL3 (Hs01085096), FOXP3 (Hs01085834) e GAPDH (Hs02758991_g1); e *primer* DLL4: 5'-CAGAGTGTCTGGATATCAGCG-3' e 5'-TCCTGCCTTATACCTCCGTG-3', e *primer* GAPDH: 5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3' e 3'-TGAGCGATGTGGCTCGGCT-5' (todos Applied Biosystems- Life Technologies).

3.6.3.1. Avaliação da expressão dos genes NOCTH1, NOTCH2, NOTCH3, DLL1, JAGGED1, JAGGED2, FOXP3 e GAPDH por RT-PCR (TaqMan)

As reações de RT-PCR foram realizadas com sondas genes específicas *TaqMan* (Applied Biosystems) num volume final de 20 μ l: 10 μ l de TaqMan PCR Master MIX (2X concentrado, *Applied Biosystems- Life Technologies*), 1 μ l de sonda gene específica (20X concentrada, *Applied Biosystems- Life Technologies*) 2 μ l de cDNA previamente diluídos e 7 μ l de água ultra-pura livre de RNase e DNase (*Invitrogen – Life Technologies*). As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra em placas ópticas de polipropileno para 96 reações (ultraAmp 96-well Semi-Skirt PCR plates, Sorenson BioScience, Inc, EUA) cobertas com adesivos ópticos para microplacas (Adhesive PCR film, ABgene). As placas foram centrifugadas a 25°C por 1 minuto a 1500rpm, e então submetidas à reação.

As condições para a reação de PCR foram de: pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C).

Na figura 2 mostramos as curvas de amplificação de cada sonda utilizada.

Figura2: Curvas de amplificação sondas gene específicas: (A) Notch1, (B) Notch2, (C) Notch3, (D) DLL1, (E) Jagged1, (F) Jagged2, (G) GAPDH.

Entre todos os genes testados apenas o gene DLL3 não foi detectado, motivo pelo qual não foi incluído em nossas avaliações.

3.6.3.2. Avaliação da expressão dos genes DLL4 e GAPDH por RT-PCR (*Sybr Green*)

As reações de RT-PCR foram realizadas com *primers* gene específicos e *Sybr Green*, (Applied Biosystems- Life Technologie) num volume final de 20 μ l: 10 μ l de SYBR Green PCR Master MIX, 1 μ l de cada *primer* a ser estudado (senso e anti-senso), 2 μ l de cDNA previamente diluído e 6 μ l de água ultra-pura livre de RNase e DNase (Invitrogen- Life Technologies). As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra em placas ópticas de polipropileno para 96 reações (ultraAmp 96-well Semi-Skirt PCR plates, Sorenson BioScience, Inc, EUA) cobertas com adesivos ópticos para microplacas (Adhesive PCR film, ABgene). As placas foram centrifugadas a 25°C por 1 minuto a 1500rpm, e então submetidas à reação.

As condições para a reação de RT-PCR foram iguais à descrita no item anterior. Além disso, para conferir a qualidade da reação de RT-PCR, foi adicionada no final da amplificação uma etapa de dissociação. A uniformização da curva de

dissociação em cada gene estudado é a comprovação da qualidade da reação. Produtos de PCR de um *primer* específico devem apresentar curvas de dissociação semelhantes, a uma mesma temperatura (temperatura de 79°C a 82°). Temperaturas diferentes de curvas de dissociação indicam a amplificação de produtos não específicos, como os *primer-dimers* (dímeros de *primer*). Nos controles negativos, espera-se que há ausência de amplificação de produtos de qualquer natureza. Na figura 3 observamos as curvas de amplificação e dissociação dos *primers* gene específicos utilizados neste trabalho.

Figura3: Curvas de amplificação *primers* gene específicos: (A) DLL4 e (C) GAPDH; Curvas de dissociação: (B) DLL4 e (D) GAPDH.

Entre todos os genes testados apenas o gene NOCTH4 não foi detectado, motivo pelo qual não foi incluído em nossas avaliações.

3.7. Imunohistoquímica

Alguns fragmentos de tecido tímico foram separados antes da dissociação para avaliação *in situ*. Através desta técnica foi possível visualizar em cortes histológicos de tecidos tímicos a presença de proteínas da família de receptores e

ligantes Notch duplamente marcadas com S100 (marcador de células dendríticas) e FOXP3 (marcador de nTreg).

3.7.1. Coleta e processamento de amostras de timos humanos

Após a remoção cirúrgica do timo, fragmentos de 0,5 a 1 cm de diâmetro foram coletados e fixados em 10 mL de formalina 10% tamponada (pH 7,4) e enviados ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para o processamento das amostras e inclusão em parafina.

3.7.2. Cortes histológicos, desparafinização e hidratação das lâminas

Para visualizar a presença de proteínas da família de receptores e ligantes Notch duplamente marcadas com S100 ou FOXP3, foi empregado o método imunohistoquímico de Estreptavidina-biotina (Hsu e cols., 1981), conjugado com peroxidase ou com fosfatase alcalina, com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Cortes de 4µm foram coletados em lâminas silanizadas e desparafinizados através da imersão em dois banhos de xilol, o primeiro por 20 minutos e o segundo por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram hidratados em sequência de etanol (100%-95% e 70%) por cerca de 2 minutos em cada concentração de álcool. Em seguida, os cortes passaram por lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,4 por cinco minutos cada.

3.7.3. Bloqueio de peroxidase endógena

As hemácias presentes nos tecidos apresentam peroxidase endógena que pode reagir com o DAB (diaminobenzidina), já que esse cromógeno é ativado pela adição de peróxido de hidrogênio à solução de DAB diluído em PBS. Desta forma, se essa peroxidase endógena não é bloqueada, as hemácias podem ficar coradas com o DAB e prejudicar a interpretação da reação imunohistoquímica.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3%, em três banhos de 15 minutos cada, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, os cortes foram lavados com água corrente, água destilada e, em seguida, com tampão PBS pH 7,4 por 5 minutos cada.

3.7.4. Recuperação antigênica

A fixação do tecido em formalina promove ligações entre grupos aminos e formação de pontes de metileno entre os aminoácidos de uma proteína ou de proteínas adjacentes. Essas múltiplas ligações podem impedir o acesso de anticorpos primários aos epítomos alvos (antígenos). A exposição desses antígenos pode ser realizada através de diferentes processos (por exemplo: calor úmido, processo enzimático). Em nossa casuística, para realização da recuperação antigênica os cortes foram imersos solução *Retrieval* pH 9,0 (*Dako*, código S2367) e colocados em banho-maria a 95°C por 25 minutos. Após este procedimento, os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos cada.

3.7.5. Bloqueio de sítios de ligações inespecíficas

A principal causa de reação inespecífica em imunohistoquímica é a ligação, não imunológica, do anticorpo específico por forças eletrostáticas e hidrofóbicas a determinados sítios do tecido. Para bloquear os sítios e evitar essas ligações inespecíficas do anticorpo, os tecidos foram incubados com solução de bloqueio (Leite Desnatado 10% [Molico] em água destilada) por 30 minutos em temperatura ambiente.

3.7.6. Incubação com anticorpos primários

Após remoção da solução de bloqueio, cada amostra foi incubada com os anticorpos primários diluídos em solução PBS-albumina bovina 1% (BSA) por um período de 12 horas a 4°C, em câmara úmida. As concentrações dos anticorpos foram previamente padronizadas com base inicial nas recomendações dos fabricantes.

A seguir, a tabela 2 é representada com as especificações dos anticorpos primários, bem como suas respectivas diluições de uso.

ANTICORPO PRIMÁRIO	HOSPEDEIRO	DILUIÇÃO	FABRICANTE	SISTEMA DE DETECÇÃO
Notch1 (C-20)	Coelho (IgG)	1/50	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
Notch2 (C651.6DbHN)	Rato (IgG)	1/200	Hybridoma Bank	LSAB-HRP
Notch3 (M-20)	Cabra (IgG)	1/25	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
Notch4 (C-19)	Cabra (IgG)	1/25	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
Delta-like1 (C-20)	Cabra (IgG)	1/25	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
Delta-Like4 (ab-7280)	Coelho (IgG)	1/50	Abcam	LSAB-HRP
Jagged1 (H-114)	Coelho (IgG)	1/50	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
Jagged2 (H-143)	Cabra (IgG)	1/25	Santa Cruz Biotechnology	LSAB-HRP
FOXP3 (14-4776-82)	Rato (IgG)	1/25	eBioscience	LSAB-AP
S100	Coelho (IgG)	1/1000	Dako	LSAB-AP

Tabela2: Relação e informações dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica.

3.7.7. Realização das duplas marcações

Após incubação com anticorpos primários, os cortes foram lavados duas vezes com PBS pH 7,4 por 5 minutos cada lavagem, em temperatura ambiente. Incubados com anticorpo secundário universal biotinilado (anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra) do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS por duas vezes de cinco minutos cada e incubados com o reagente Estreptavidina peroxidase do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37°C.

A revelação da reação imunohistoquímica foi realizada com o emprego de 45µg do cromógeno 3’3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical CO, St. Louis,

MO, USA, código D-5637), diluído em 100 ml de PBS, filtrado e acrescido 45µg de níquel tetracarbonilo ($\text{Ni}(\text{CO})_4$), filtrado novamente e acrescido 1200 µl de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes a 3% para ativação do cromógeno. As marcações positivas foram visualizadas em negro. Os anticorpos primários nos quais foram empregados o método de imunoperoxidase (HRP) estão descritos na tabela de diluição dos anticorpos mencionada anteriormente (tabela 2).

Após a lavagem dos cortes em água corrente, os mesmos foram lavados em PBS pH 7,4, por cinco minutos e incubados com o anticorpo primário anti-FOXP3, para detecção de células nTregs ou com o anticorpo anti-S100, para detecção das tDC. Os cortes foram incubados por 12 horas a 4°C em câmara úmida.

Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS pH 7,4 por duas vezes de cinco minutos. Nas lâminas incubadas com o anticorpo anti-FOXP3, usou-se anticorpo secundário anti-IgG de rato, diluído em solução PBS-albumina bovina 1% (BSA), na diluição 1:200. Os cortes ficaram incubados em estufa a 37°C por 30 minutos e após incubação foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4.

Nas lâminas incubadas com o anticorpo anti-S100, colocamos em seguida anticorpo secundário universal biotilado do “Kit” LSAB fosfatase alcalina (LSAB+system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K689) e incubamos os cortes em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4.

O próximo passo foi incubar todas as lâminas com o reagente Estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina do “Kit” LSAB fosfatase (LSAB+system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K689) por 30 minutos a 37°C.

A revelação das reações foi realizada adicionando-se o cromógeno “Liquid Permanent Red” (Dako, código K640) por cerca de um a três minutos. As marcações positivas foram visualizadas na cor rosa escuro. Para interromper a reação, os cortes foram colocados em água corrente e em seguida, lavados novamente em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer’s (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309), lavados em água corrente por cinco minutos e colocados para secar a temperatura ambiente. Os cortes foram montados em resina “permount” (Fisher Scientific, código SP-15-100).

3.7.8. Quantificação e análise da expressão de receptores e ligantes Notch em células FOXP3+ e S100+ no timo

De cada um dos timos estudados (n=10) foram tomadas imagens digitais de cinco campos sequenciais de cada região tímica: córtex, córtico-medular e medula utilizando-se ocular de 10x e objetiva de 40x para as células FOXP3+ e S100+ duplamente marcadas com os receptores Notch1, 2, 3 e 4, ligantes DLL1 e 4, Jagged 1 e 2 (15 campos/marcação). Para a digitalização das imagens foi utilizada a câmera digital Carl Zeiss AxioCamMR5 montada em microscópio óptico LEICA DMR. As áreas das imagens capturadas foram aferidas através do programa AxioVision (Zeiss).

Com o auxílio do programa de análise de imagem *Image – Pro Express*, versão 4.8 para Windows XP/Vista (Media Cybernetics – The Imaging Experts, MD/USA) foi realizada a quantificação manual do número de células imunomarcadas para FOXP3, S100 concomitantemente aos receptores e ligantes Notch, e somente células imunomarcadas para os receptores e ligantes Notch, de cada uma das imagens obtidas. Desse modo, foi calculada a média de células imunomarcadas/unidade de área de cada um dos casos. Os resultados foram expressos em número de células marcadas/mm².

3.8. Análise estatística

A comparação das variáveis da expressão de genes e proteínas dos grupos avaliados foi realizada utilizando teste *One-way ANOVA*, *Tukey* (para comparar todos os pares de colunas) e *Bonferroni* (para comparar pares de colunas selecionadas). Diferença significativa foi obtida para valor de $p < 0,05$.

As correlações entre os dados da expressão gênica e proteica nas populações estudadas no timo foram realizadas pelo método estatístico *Spearman* com intervalo de confiança de 95%, considerando correlações significativas para valor de $p < 0,05$. Foi utilizado programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das populações de timócitos e avaliação da expressão de genes de receptores e ligantes Notch

Inicialmente foram caracterizadas as populações as quais representam os estágios de maturação de linfócitos T no timo humano. A população mais abundante observada foi CD4+CD8+ (média 51,82%) seguida por CD4+CD8- (média 25,7%), CD4-CD8+ (média 11,52%) e CD4-CD8- (média 5,55% - Figura 4).

Após isso, foi avaliada a expressão dos genes de receptores e ligantes Notch nestas populações. O nível de expressão do gene Notch1 (Figura 5A) está diminuído na população de CD4+CD8- em comparação à CD4-CD8-. Já a expressão do gene Notch2 mostrou uma diminuição na população CD4+CD8+ quando comparado à população CD4+CD8- (Figura 5B). A expressão do gene Jagged2 está diminuída na população CD4+CD8- quando comparada com CD4+CD8+ (Figura 5E). Para os demais receptores e ligantes não houve diferença na expressão de genes entre as populações de timócitos.

Também foi avaliada a expressão relativa dos genes de receptores e ligantes Notch utilizando a população CD4-CD8- como padrão onde observamos um aumento na expressão do gene DLL1 na população CD4+CD8- em comparação a CD4+CD8+ (Figura 6D). Nesta mesma avaliação, observamos um aumento da expressão do gene JAG1 na população CD4-CD8+ quando comparada a CD4+CD8+ (Figura 6F). A expressão relativa dos genes NOTCH1, 2 e 3, DLL4 e JAG2 (Figuras 6A-C;E;G) não apresentaram diferença entre as populações avaliadas.

Figura4: Caracterização das subpopulações de timócitos. (A) O gráfico (*dotplot*) representa o *gate* utilizado para caracterização das subpopulações de timócitos; (B) As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores percentuais obtidos para cada subpopulação (n=10). *p<0,05 quando comparados a todas as populações de timócitos.

Figura5: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolados das populações de timócitos purificadas (n=10). (A-G) As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de Δ Ct normalizados com o gene GAPDH em cada subpopulação. *p<0,05 quando comparado com a subpopulação indicada.

Figura6: Expressão relativa de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolados das subpopulações de timócitos purificadas (n=10). (A-G) As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ comparados relativamente com a população padrão (CD4-CD8-). *p<0,05 quando comparado com a população indicada.

4.2. Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch no timo e correlação com a expressão dos respectivos genes

Após a avaliação da expressão dos genes de receptores e ligantes Notch nas populações de timócitos, verificamos a expressão dos receptores e ligantes Notch nos diferentes compartimentos tímicos.

As diferentes regiões do timo representam sítios distintos durante a maturação de linfócitos T. Na região mais externa (córtex) predominam os timócitos CD4-CD8-, na região intermediária (córtico-medular) predominam os timócitos CD4+CD8+; e na região central (medular) predominam os timócitos CD4+CD8- e CD4-CD8+.

Inicialmente, avaliamos a média de expressão dos receptores e ligantes Notch nos compartimentos tímicos. Os receptores e ligantes Notch são expressos no timo, sendo, em ordem de maior expressão, o receptor Notch1 (99 células/mm²), seguido do ligante DLL4 (80 células/mm²), receptores Notch4 (68 células/mm²) e Notch3 (65 células/mm²), ligantes DLL1 (65 células/mm²) e Jagged2 (60 células/mm²), receptor Notch2 (59 células/mm²) e por fim, o ligante Jagged1 (51 células/mm²) (Figura 7A).

Também foi avaliada a expressão dos receptores e ligantes Notch em cada uma das regiões tímicas, e apesar do aparente aumento da expressão do ligante DLL4 no córtex, não foi observada diferença estatística. Os outros receptores e ligantes avaliados foram expressos de maneira homogênea nas regiões do timo (Figura 7B).

Após a conclusão das análises histológicas avaliamos sua correlação com os dados de expressão de genes de receptores e ligantes considerando o predomínio das populações em cada compartimento tímico: CD4-CD8-/córtex, CD4+CD8+/córtico-medular e CD4+CD8- e CD4-CD8+/medula.

Na figura 8 observamos que não houve correlação entre a expressão de genes e proteínas dos receptores e ligantes avaliados na população CD4-CD8- (região cortical).

Na figura 9 observamos correlação negativa entre a expressão do gene/proteína Nocth2 (Figura 9B), e entre a expressão do gene/proteína Jagged1 (Figura 9F). Não foram observadas correlações nos demais genes/proteínas avaliados na população CD4+CD8+ (região córtico-medular).

Por fim, também não observamos correlações entre a expressão de genes/proteínas de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4-CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ (região medular tímica) (Figura 10).

A

B

Figura7: Quantificação de receptores e ligantes Notch1, 2, 3 e 4, DLL1 e 4, e Jagged1 e 2 por imunohistoquímica. (A) Média de células positivas detectadas nas três regiões avaliadas no timo (B) Número de células positivas por região do timo. As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores (n=10).

Figura8: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4-CD8-, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Nocth no córtex tímico (n=10 timos). (A-G) Foram interpolados os valores médios de expressão normalizada de genes (ΔC_t) com os valores médios de células positivas.

Figura9: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4+CD8+, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Nocth na região córtico-medular tímica (n=10 timos). (A-G) Foram interpolados os valores médios de expressão normalizada de genes (ΔCt) com os valores médios de células positivas. r^2 - coeficiente de determinação.

Figura10: Correlação entre a média de expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em timócitos CD4-CD8+ e CD4+CD8-, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Noth na medula tímica (n=10 timos). (A-G) Foram interpolados os valores médios de expressão normalizada de genes (ΔCt) com os valores médios de células positivas.

4.3. Caracterização da população nTreg no timo e avaliação da expressão de genes e proteínas de receptores e ligantes Notch e FOXP3

Inicialmente determinamos o fenótipo da população nTreg no timo. Foram consideradas nTreg as células CD3+CD4+CD25^{high}. Esta população representa 2,15% dos timócitos e expressa a proteína FOXP3 em frequência superior a >97% (Figura 11).

A avaliação da expressão do gene FOXP3 nos linfócitos nTreg (CD3+CD4+CD25^{high}) corroborou com a evidência anterior mostrando ser aumentada em comparação as populações de timócitos avaliadas anteriormente (Figura 12).

Posteriormente, avaliamos a expressão de FOXP3 nos três compartimentos do tecido tímico. A expressão de FOXP3 mostrou ser homogênea entre as três regiões tímicas: córtex (157 células FOXP3+/mm²), córtico-medular (169 células FOXP3+/mm²) e medula (178 células FOXP3+/mm² – Figura 13).

Além da avaliação do gene FOXP3 na população nTreg, também foi verificada a expressão de genes de receptores e ligantes Notch. Todos os genes avaliados foram expressos na população CD4+CD25^{high}. Obtivemos em ordem de maior expressão os ligantes JAG1, seguido de DLL1 e DLL4. Na sequência, detectamos os receptores NOTCH2 e NOTCH1, ligante JAG2 e por fim, receptor NOTCH3 (Figura 14).

Avaliamos também a expressão relativa de genes de receptores e ligantes Notch na população CD4+CD25^{high} em comparação com as populações CD4-CD8- (Figura 15A) e CD4+CD8- (Figura 15B). As células CD4+CD25^{high} mostraram uma maior expressão de NOTCH1, NOTCH2, DLL1 e JAG1 e uma menor expressão de NOTCH3, DLL4 e JAG2 em comparação a população CD4-CD8- (Figura 15A). Porém, quando comparadas com a população CD4+CD8-, observamos que a população CD4+CD25^{high} tem uma maior expressão dos genes de receptores NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e dos ligantes DLL4 e JAG1, e níveis similares de expressão dos ligantes DLL1 e JAG2 (Figura 15B).

Figura11: Caracterização das nTreg no timo. Os gráficos (*dotplot*): (A) representa a estratégia de *gate* em timócitos total, resultando em população CD3+CD4+; (B) representa a estratégia de *gate* para caracterização de timócitos CD4+CD25high; (C) representa a estratégia para caracterização nTreg, timócitos FOXP3+, a partir do *gate* de timócitos CD4+CD25high (n=1 timo). (D) A barra representa a média ± erro padrão dos valores percentuais de CD4+CD25high obtidos da purificação de timócitos totais (2,15%) (n=10 timos).

Figura12: Expressão do gene FOXP3 em RNA total de timócitos isolados de populações tímicas CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8- e CD4+CD25^{high} (n=10 timos). As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de Δ Ct normalizados com o gene GAPDH em cada subpopulação. *p <0,05 quando comparado com a subpopulação indicada.

Figura13: Quantificação de FOXP3 por imunohistoquímica. As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores (n=10).

Figura14: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolado da subpopulação CD4+CD25^{high} (n=10 timos). As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de Δ Ct normalizados com o gene GAPDH na subpopulação CD4+CD25^{high}.

Figura15: Expressão relativa de genes de receptores e ligantes Notch em RNA total isolado na população CD4+CD25^{high} (n=10). As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ comparados relativamente **(A)** com a população padrão (CD4-CD8-) para a subpopulação CD4+CD25^{high}; **(B)** com a população padrão (CD4+CD8-) para a subpopulação CD4+CD25^{high}.

4.4. Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch em células FOXP3+ tímicas e correlação com a expressão dos respectivos genes

Após a avaliação da expressão dos genes de receptores e ligantes Notch na população CD4+CD25^{high}, verificamos a expressão das respectivas proteínas em células FOXP3+ no timo, e observamos que todos os receptores e ligantes Notch são expressos de maneira homogênea, com exceção do ligante DLL4 quando comparado com os demais (Figura 16A).

A mesma avaliação foi feita nas diferentes regiões tímicas, e observamos que o receptor Notch3 é mais expresso em células FOXP3+ nas regiões cortical e córtico-medular quando comparadas com a medula, e o ligante Jagged2 mostrou ser mais expresso em células FOXP3+ do córtex tímico em comparação à medula (Figura 16B). Apesar do ligante DLL4 ter sido mais expresso no timo em comparação aos demais receptores e ligantes (Figura 16A), sua expressão foi homogênea nas três regiões tímicas (Figura 16B). Os demais receptores e ligantes não foram observadas diferenças de expressão entre os compartimentos tímicos (Figura 16B).

Na figura 17 apresentamos fotomicrografias representativas do padrão de marcações simples e duplas de FOXP3 com receptor e/ou ligante Notch, nas regiões do córtex (Figura 17A), córtico-medular (Figura 17B) e medula (Figura 17C) no timo. As marcações em vermelho representam células FOXP3+, em preto o receptor e/ou ligante Notch, e ambas as cores marcação concomitante de FOXP3 e receptor e/ou ligante Notch.

Após a conclusão das análises histológicas avaliamos sua correlação com os dados de expressão de genes de receptores e ligantes na população CD4+CD25^{high}, e observamos correlação negativa entre gene/proteína Notch2 (Figura 18B).

Figura16: Quantificação por imunohistoquímica de: (A) Número de células FOXP3+ e receptor/ligante Noth+ no timo, (B) Número de células FOXP3+ e receptor/ligante Noth+ nas três regiões do timo. As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores (n=10). *p <0,05 quando comparados os receptores e ligantes Notch (A) as nas regiões indicadas (B).

Figura17: Fotomicrografia do ensaio de imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína FOXP3 e receptores/ligantes Notch (Aumento de 400x). O triângulo e o círculo representam respectivamente a marcação de FOXP3 e de um receptor/ligante Notch. O quadrado representa a marcação simultânea das proteínas avaliadas. (A) córtex (B) cortico-medular (C) medula (n=1).

Figura18: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em células CD4+CD25^{high}, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Nocth em células FOXP3+ (n=10 timos). (A-G) Foram interpolados os valores médios de expressão normalizada de genes (ΔCt) com os valores médios de células positivas. r^2 - coeficiente de determinação.

4.5. Caracterização e avaliação da distribuição das tDC no timo e expressão de genes de receptores e ligantes Notch

Por fim, determinamos o fenótipo das tDC no timo. Estas células possuem papel importante no processo de maturação dos linfócitos T, bem como das nTreg. Foram caracterizadas como CD11c⁺ representando 2 a 3% das células tímicas (Figura 19).

No tecido tímico, avaliamos a distribuição das tDC nos três compartimentos (córtex, córtico-medular e medula), utilizando o marcador S100. Observamos maior expressão de S100 nas regiões córtico-medular e medular, quando comparados com o córtex (Figura 20).

Quando avaliamos a expressão de genes de receptores e ligantes Notch nas tDC observamos que todos foram expressos na população CD11c⁺, sendo em ordem de maior expressão os ligantes JAG1, seguido de JAG2 e DLL4, receptor NOTCH2 e ligante DLL1, receptor NOTCH1 e por fim, receptor NOTCH3 (Figura 21).

Figura19: Caracterização das tDC no timo. (A) O gráfico (*dotplot*) representa o *gate* utilizado para caracterização das tDC (n=1); (B) A barra representa a média $\pm$ erro padrão do valor percentual obtido para a população de tDC (n=10).

Figura20: Quantificação de S100 por imunohistoquímica. As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores (n=10). *p<0.05 quando comparadas as regiões córtex, córtico-medular e medula.

Figura21: Expressão de genes de receptores e ligantes Notch em RNA isolados da subpopulação CD11c+ (n=10 timos). As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores de Δ Ct normalizados com o gene GAPDH na população CD11c+.

4.6. Avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch em células S100+ no timo e correlação com a expressão dos respectivos genes

Após a avaliação dos genes de receptores e ligantes Notch em tDC, verificamos a expressão de proteínas de receptores e ligantes Notch em células S100+ no timo. Todas as proteínas Notch foram detectadas em células S100+ no timo, e o ligante DLL4 mostrou ser mais expresso nessas células quando comparado aos demais receptores e ligantes Notch (Figura 22A). A mesma avaliação foi realizada nas três regiões tímicas, e observamos que o receptor Notch2 é mais expresso nas regiões córtico-medular e medula quando comparado com o córtex. Apesar do ligante DLL4 ter sido mais expresso em células S100+ no timo (Figura 22A), não foi observada diferença de expressão entre as regiões tímicas, fato também verificado para os receptores Notch1, Notch3 e Notch4, e ligantes DLL1, Jagged1 e Jagged2 (Figura 22B).

Na figura 23 apresentamos fotomicrografias representativas do padrão de marcações simples e duplas de S100 com receptor e/ou ligante Notch, nas regiões do córtex (Figura 23A), córtico-medular (Figura 23B) e medula (Figura 23C). As marcações em vermelho representam células S100+, em preto o receptor e/ou ligante Notch, e ambas as cores marcação concomitante de S100 e receptor e/ou ligante Notch.

Após concluirmos as análises histológicas, avaliamos sua correlação com os dados de expressão de genes de receptores e ligantes na população CD11c+, o qual não foram observadas correlações (Figura 24).

Figura22: Quantificação por imunohistoquímica de: (A) Número de células S100+ e receptor/ligante Noth+ no timo, (B) Número de células S100+ e receptor/ligante Noth+ nas três regiões do timo. As barras representam a média $\pm$ erro padrão dos valores (n=10). *p < 0,05 quando comparados todos os receptores e ligantes Noth (A), quando comparadas as regiões tínicas (B).

Figura23: Fotomicrografia do ensaio de imunohistoquímica para avaliação da expressão da proteína S100 e receptores/ligantes Notch (Aumento de 400x). O triângulo e o círculo representam respectivamente a marcação de S100 e de um receptor/ligante Notch. O quadrado representa a marcação simultânea das proteínas avaliadas. (A) córtex (B) córtico-medular (C) medula (n=1).

Figura24: Correlação entre expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em células CD11c+, e expressão das respectivas proteínas de receptores e ligantes Nocth em células S100+ (n=10 timos). (A-G) Foram interpolados os valores médios de expressão normalizada de genes (ΔC_t) com os valores médios de células positivas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi estudar o envolvimento da via de sinalização Notch na maturação de linfócitos T e nTreg no timo humano. Considerando que o processo de maturação dessas células compreende diferentes estágios distribuídos nos compartimentos tímicos, foi proposto avaliar a expressão gênica e proteica de receptores e ligantes Notch nos estágios de maturação de linfócitos T, células nTreg e tDC no timo.

Neste trabalho, a caracterização dos estágios de maturação dos linfócitos T revelou que a população CD4+CD8+ é a mais abundante, isto ocorre devido à intensa proliferação celular neste estágio (Tourigny e cols, 1997). Os percentuais observados nos outros estágios de maturação foram semelhantes ao descrito na literatura (Hernández-Hoyos e Alberola-Ila, 2003).

Inúmeros trabalhos já demonstraram que os receptores e ligantes Notch são expressos nas diferentes fases de maturação dos linfócitos T de camundongos (Rothenberg, 2012; Thompson e Zúñiga-Pflücker, 2011; Radtke e cols, 2010; Laky e Fowlkes, 2008; Parreira e cols, 2003), porém em humanos este tipo de avaliação foi realizada apenas em timócitos cultivados *in vitro* e não houve previa avaliação da expressão constitutiva destas moléculas (Magri e cols., 2009).

Apesar da via de sinalização Notch ser bem descrita em modelos murinos, alguns dados conflitantes discutem o envolvimento desta via na maturação de linfócitos T. Dificuldades técnicas são observadas na avaliação da expressão de receptores e ligantes Notch em linfócitos em desenvolvimento não apenas pela complexidade desta via de sinalização, mas pela difícil detecção dos componentes desta via em populações muito heterogêneas como as células do timo. Por ser uma via a qual podem ocorrer interações entre diferentes receptores e ligantes, surgem dificuldades de interpretação das funções fisiológicas dos componentes Notch (Huang e cols., 2003). Colabora ainda o fato de modelos animais deficientes dos receptores e ligantes Notch apresentarem problemas de letalidade embriogênica (Maillard e cols., 2005).

A similaridade dos mecanismos que envolvem a sinalização Notch na maturação de linfócitos T em humanos e camundongos é discutida. Atualmente,

observamos uma escassez de dados sobre a expressão constitutiva dos receptores e ligantes Notch nas diferentes fases de maturação de linfócitos T humanos. Portanto, este trabalho tem como finalidade elucidar a expressão de receptores e ligantes Notch no timo humano e, conseqüentemente, colaborar com a investigação do envolvimento desta via no processo de maturação de linfócitos T.

Na avaliação da expressão dos receptores e ligantes Notch na população CD4-CD8- observamos aumento da expressão de NOTCH1 em comparação à população CD4+CD8-, também ocorrido em camundongos (Maillard e cols., 2005). Desta maneira, sugerimos que no estágio mais precoce de maturação o gene do receptor NOTCH1 é expresso de maneira a contribuir para o comprometimento com a linhagem T e conseqüente maturação dos linfócitos T (Maillard e cols., 2005).

A análise da população CD4-CD8- não revelou nenhuma correlação gene/proteína entre os receptores e ligantes Notch avaliados, sugerindo que durante o estágio mais precoce de maturação a expressão gênica não necessariamente é traduzida em expressão proteica, justificando a continuidade de nossas avaliações incluindo os parâmetros genéticos, fenotípicos e sua correlação.

Na população CD4+CD8+ foi observada uma diminuição da expressão do gene NOTCH2 apenas em comparação a população CD4+CD8-, diferente do descrito em camundongos onde este receptor é expresso em níveis aumentados nos estágios mais precoces de maturação de linfócitos T, como os timócitos CD4-CD8- (Saito e cols., 2003). Por apresentarem função semelhante ao Nocth1 (Thompson e Zúñiga-Pflücker, 2011) estes dados sugerem que a expressão de Notch2 pode estar envolvida nos estágios finais da maturação de linfócitos TCD4+ e TCD8+.

A análise histológica do receptor Notch2 revelou sua expressão em baixa intensidade quando comparada à presença dos demais receptores avaliados e sua distribuição é homogênea nos compartimentos tímicos, dados que colaboram com a possibilidade de envolvimento deste receptor nos diferentes estágios de maturação dos linfócitos T. No presente trabalho não foi avaliada a intensidade de expressão destes receptores e sua variação entre indivíduos, porém, em camundongos manipulados geneticamente para expressarem este receptor em baixa intensidade no ambiente tímico, foi demonstrado que esta variação resulta em um aumento da maturação de linfócitos TCD8+, enquanto que a alta expressão de Notch2 induz a

formação de células T leucêmicas (Witt e cols., 2003). Atualmente as metodologias histológicas não permitem a avaliação da intensidade de expressão dos receptores e ligantes Notch nas populações estudadas, parâmetro que poderia revelar alterações entre os estágios de maturação de linfócitos T. Futuramente, avaliaremos esta variável entre as populações de estudo e analisaremos sua relação com o fenótipo de linfócitos T maduros do sangue periférico.

Devido à aparente discordância entre a expressão de genes e de proteínas dos receptores e ligantes avaliados, passamos a analisar a correlação entre estes parâmetros, considerando equivalente a população CD4-CD8- à região cortical, a população CD4+CD8+ à região córtico-medular, e a média dos valores das populações CD4+CD8- e CD4-CD8+ à região medular.

Na população CD4+CD8+ foi ainda observada uma correlação gene/proteína negativa do receptor Notch2 e do ligante Jagged1, revelando não apenas uma discordância, mas a possível inversão total da relação entre a expressão do gene e a expressão da proteína. A sinalização de receptores Notch é regulada por uma complexa ativação de proteínas efetoras citoplasmáticas (Yashiro-Ohtami e cols., 2010), e a observação de uma correlação negativa sugere uma regulação da expressão proteica mediada por mecanismos pós-transcricionais, os quais não são descritos na literatura. Todos os outros parâmetros avaliados não estabeleceram correlação de forma semelhante ao observado na população CD4+CD8+, mas estes dados sugerem que a avaliação da relação gene/proteína pode ter maior importância durante este estágio de maturação.

Na população CD4+CD8- observamos que o gene do receptor NOTCH1 é menos expresso quando comparado à população CD4-CD8-, embora sua expressão proteica seja homogênea nas diferentes regiões tímicas avaliadas, característica esta também descrita anteriormente em camundongos (Parreira e cols., 2003).

Ainda na população CD4+CD8- observamos que o gene do ligante JAG2 é menos expresso em comparação a população CD4+CD8+ sugerindo que a expressão deste gene pode estar envolvida no comprometimento ou representar uma consequência da maturação de linfócitos TCD4+.

Por outro lado, a avaliação da expressão proteica do ligante Jagged2 revelou-se homogênea no timo. Esta característica já foi descrita em timos de camundongos

onde este ligante também é expresso em células do estroma tímico (Heinzel e cols., 2007). De fato, não avaliamos a expressão de Jagged2 no estroma dos timos humanos, o que poderia justificar a homogeneia expressão proteica deste ligante no timo. Em contrapartida, a expressão de Jagged2 no estroma pode mediar uma interação direta dos timócitos com o tecido tímico, colaborando com o envolvimento da via Notch na maturação de linfócitos T.

A avaliação gênica do ligante DLL1 na população CD4+CD8- comprovou sua expressão nesta população, fato que não havia sido descrito em humanos ou camundongos até o momento. Em camundongos foi demonstrado apenas que o gene deste ligante é expresso em todos os compartimentos tímicos (Mohtashami e cols., 2010) e que os ligantes Notch, de uma maneira geral, são pouco expressos em linfócitos T CD4+ (Yuan e cols., 2010).

A avaliação relativa deste ligante entre as populações de timócitos revelou ainda que o gene de DLL1 é mais expresso na população CD4+CD8- em relação à população CD4+CD8+. Esta avaliação relativa nos permite sugerir que o comprometimento da população com linfócitos TCD4+ pode estar relacionado a um aumento da expressão de DLL1, já que este aumento da expressão gênica não foi observado na população CD4-CD8+.

Por outro lado, a avaliação da expressão gênica de receptores e ligantes Notch na população CD4-CD8+ mostrou um aumento relativo do gene de outro ligante da via Notch, o JAG1, em comparação a população CD4+CD8+. Em conjunto, constatamos que os timócitos CD4+CD8- tem um aumento da expressão de DLL1 e os timócitos CD4-CD8+ tem um aumento de JAG1. Estes dados revelam que a expressão de ligantes Notch, como DLL1 e JAG1, tem importância no processo de maturação de linfócitos T de forma mais abrangente do que o descrito atualmente, e que estes ligantes podem estar envolvidos principalmente nos estágios mais tardios de maturação, como em linfócitos TCD4+ e TCD8+.

Com o atual conhecimento, não é possível inferir se o aumento da expressão gênica destes ligantes se reflete em uma maior expressão proteica em linfócitos T maduros, se esta característica pode regular a funcionalidade de linfócitos maduros, ou ainda, se há participação destes ligantes na definição dos timócitos entre a

formação de linfócitos maduros TCD8⁺ ou TCD4⁺. Estes fatores serão investigados futuramente.

Corroborando com nossos resultados, foi descrita em camundongos a expressão do ligante Jagged1 em populações de timócitos e células do estroma tímico nas diferentes regiões (Heinzel e cols., 2007). Atualmente existem evidências na literatura do envolvimento do ligante JAG1 na maturação de linfócitos CD8⁺ murinos. Experimentos com células do estroma tímico e fibroblastos expressando o ligante Jagged1 mostraram o favorecimento da maturação de timócitos CD4⁺CD8⁺ em linfócitos TCD8⁺, sem que haja mudança no número absoluto de células TCD4⁺ (Jimenez e cols., 2001).

A expressão gênica e proteica do receptor Noth3 não revelou diferença entre as populações de timócitos e nas diferentes regiões tímicas, o que já foi descrito em camundongos, onde este receptor mostra importância na fase de transição dos timócitos CD4-CD8-CD25⁻ para CD4⁺CD8⁺CD25⁻ (Felli e cols., 1999). Por outro lado, alguns autores relatam que a expressão de Notch3 pode variar entre as populações de timócitos em camundongos, sendo maior na população CD4-CD8- (Shi e cols., 2011). Assim, tornam-se necessárias investigações que permitam a avaliação da intensidade de expressão deste receptor em timócitos humanos para esclarecermos sua função no processo de maturação de linfócitos T.

O receptor Notch4 não foi analisado quanto a sua expressão gênica, porém a expressão proteica mostrou que este é o segundo receptor mais expresso no timo, característica comum em todas as regiões tímicas avaliadas. Nos resultados anteriores não foi observada correlação positiva entre a expressão gênica/proteica dos receptores e ligantes avaliados, não permitindo estimar a expressão gênica de Notch4, porém a alta expressão proteica em todo o tecido sugere sua participação durante todo o processo de maturação de linfócitos T.

O gene do ligante DLL4 é expresso nas populações de timócitos de maneira homogênea, assim como na análise histológica nos diferentes compartimentos tímicos, apesar do aparente aumento na região do córtex. Pela primeira vez reportamos que o gene de DLL4 é detectável nas populações de linfócitos T, visto que em camundongos este ligante é preferencialmente expresso em células do estroma tímico (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

Considerando que em camundongos os primeiros estágios de maturação da linhagem T necessitam de sinais do ligante DLL4 via receptor Notch1 (Hozumi e cols., 2008), nossos resultados revelam que a sinalização via Notch1 pode ocorrer devido a interações recíprocas entre os timócitos imaturos, o que pode ocorrer até os estágios finais de maturação de linfócitos T.

Em conjunto, a avaliação da expressão gênica e proteica dos receptores e ligantes Notch nas fases de maturação dos linfócitos T permite a aplicação de novos conceitos dentro da maturação tímica. Os dados da literatura sobre maturação intratímica em geral, descrevem a interação entre timócitos imaturos e células do estroma ou outras populações especializadas, como as tDC. Nossos resultados revelaram a expressão dos ligantes e receptores Notch em todas as fases de maturação de linfócitos T, sugerindo que durante sua ontogenia, os timócitos podem induzir a sinalização Notch por interações recíprocas o que, conseqüentemente, pode modular o processo de maturação de forma adicional à interação com outras populações celulares presentes no timo.

Estes dados podem colaborar com estudos futuros para elucidar o processo de maturação de linfócitos T no timo humano.

Após a caracterização e avaliação dos principais estágios de maturação dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ passamos a investigar a expressão dos receptores e ligantes Notch nas células nTreg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). A caracterização das nTreg apresentou dificuldade devido a marcação da molécula FOXP3 exigir a permeabilização das células por tratar-se de uma proteína intracelular. Este processo impede a purificação de material genético desta população. Desta forma passamos a avaliar a possibilidade de isolamento das nTreg utilizando apenas proteínas expressas em sua membrana. De acordo com Baecher-Allan e colaboradores (2001) a população nTreg também pode ser caracterizada pelo fenótipo CD4⁺CD25^{high}.

Inicialmente, verificamos que as células CD4⁺CD25^{high} representam cerca de 2,15% dos timócitos, e que expressam a proteína FOXP3 em uma frequência superior a 97%, sugerindo que de fato sejam as células nTreg. Além disso, constatamos que esta população expressa o gene FOXP3 em níveis muito superiores as outras populações estudadas colaborando com sua caracterização como nTreg.

O gene FOXP3 também pode ser expresso em outras populações de células incluindo os timócitos humanos durante sua ontogenia, principalmente nos estágios iniciais de maturação quando é expresso concomitantemente ao gene de recombinases (RAG2). Estas células ainda não foram submetidas aos processos de seleção intratímica e após esta fase dão origem aos linfócitos nTreg (Tuovinen e cols., 2008).

Observamos na análise por citometria de fluxo que 3% dos timócitos humanos expressam a proteína FOXP3 (dados não mostrados), porcentagem semelhante ao total de células nTreg (CD4+CD25^{high}) detectadas no timo (2,15%). Desta forma, durante as avaliações histológicas, devido a impossibilidade de múltiplas marcações simultâneas, foram consideradas nTreg os timócitos FOXP3+.

Embora a região medular tímica seja descrita como o principal sítio de maturação de linfócitos nTreg (Watanabe e cols., 2005), estudos em camundongos revelaram que a região cortical também promove a maturação de timócitos FOXP3+ (Liston e cols., 2008). Nossos resultados histológicos revelaram uma distribuição homogênea dos timócitos FOXP3+ entre as regiões tímicas, o que sugere a maturação de linfócitos nTreg humanos fora da região medular e principalmente na região cortico-medular, fenômeno que nunca foi descrito em mamíferos. Por outro lado, esta distribuição de células FOXP3+ pode representar a detecção de linfócitos nTreg maduros nos sítios de maturação de linfócitos T, fato de grande importância considerando o alto potencial regulador desta população.

Os linfócitos CD4+CD25^{high} expressam todos os genes de receptores e ligantes Notch avaliados neste trabalho. Este dado é inédito e sugere o envolvimento desta via de sinalização na maturação de linfócitos nTreg humanos. O envolvimento da via Notch já foi sugerido em camundongos (Ou-Yang e cols, 2008), e em humanos, linfócitos TCD4+CD25+ isolados do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina resultaram em aumento da expressão de receptores e ligantes Notch quando comparados aos linfócitos T CD4+CD25- (Ng e cols, 2001).

Entre os receptores e ligantes avaliados nas nTreg o gene do ligante JAG1 foi o mais expresso, sugerindo que este ligante pode ter maior importância na maturação de linfócitos, porem não existem dados na literatura que elucidem esta possibilidade.

Na comparação relativa das células nTreg com a população CD4-CD8- observamos uma grande variação, positiva e negativa quanto a expressão dos genes de receptores e ligantes Notch.

Porém, quando comparadas à população CD4+CD8-, observamos que as nTreg expressam os genes de receptores e ligantes Notch com intensidade similar ou maior. Especialmente o gene do receptor Notch1 que é expresso em nível sete vezes maior e o gene do receptor Notch2 que é expresso em nível três vezes maior. Estas avaliações mostram que as células CD4+CD25^{high} sofrem uma grande alteração no nível de expressão dos genes de receptores e ligantes Notch em comparação aos os estágios iniciais de maturação, e que aumentam a expressão de todos os genes avaliados, principalmente Noth1 e Noth2, quando comparados ao equivalente estágio de maturação de linfócitos TCD4+ não reguladores. Isso reforça a importância da via Notch na maturação de nTreg.

A avaliação histológica de receptores e ligantes Notch foi realizada em células FOXP3+ no timo, e nossos dados são inédito uma vez isto não foi descrito até o momento no timo humano.

Esta avaliação revelou que o ligante DLL4 é o mais expresso em nTreg quando comparadas as demais populações de timócitos, porém sua expressão não difere entre as regiões do timo, sugerindo que a expressão deste ligante esteja envolvida com a maturação das nTreg.

O receptor Noth3 mostrou estar mais expresso nas células FOXP3+ das regiões cortical e córtico-medular em comparação à medula. Considerando que as regiões cortical e córtico-medular do timo comportam timócitos em estágios mais precoces de maturação, e que em camundongos o receptor Noth3 é expresso em estágios precoces de maturação e favorece a maturação de células nTreg (Anastasi e cols., 2003; Pennington e cols., 2006; Campese e cols., 2009), acreditamos que esta característica pode também ocorrer em humanos. Visto que em camundongos a região do córtex pode promover a maturação de nTreg (Liston e cols., 2008), a expressão do receptor Notch3 em maior intensidade nas regiões tímicas que compreendem aos estágios mais precoces de maturação, pode ter importância na maturação das nTreg na região do córtex e córtico-medular.

Diferente do Notch3, o ligante Jagged2 foi mais expresso em células FOXP3⁺ do córtex tímico quando comparado à medula, sugerindo que interações recíprocas entre as nTreg na região cortical possam ocorrer via receptor Notch3-ligante Jagged2, participando dos estágios iniciais de maturação, porém, a regulação de sua expressão ocorre de forma gradual e apresenta uma diminuição apenas no estágio mais avançado de maturação.

Em conjunto, a variação da expressão do receptor Notch3 e do ligante Jagged2 em células FOXP3⁺ entre diferentes regiões tímicas, as quais representam diferentes estágios de maturação de linfócitos T, sugerem que as células FOXP3⁺ detectadas no tecido tímico provavelmente representam diferentes estágios de maturação de linfócitos nTreg, reforçando a possibilidade de sua maturação ocorrer nas três diferentes regiões como discutimos anteriormente, ou ainda, que as nTreg expressam diferentes fenótipos em de acordo com a região do timo.

Estes dados também revelam o envolvimento da via Notch na maturação de linfócitos nTreg, e colaboram com nossa hipótese de interações recíprocas entre timócitos durante sua maturação. Além disso, considerando a distribuição das células FOXP3⁺ podemos sugerir que as nTreg colaboram com a sinalização via Notch das diferentes populações intratímicas.

Os outros ligantes e receptores avaliados em células FOXP3⁺ (Notch1, 2 e 4, DLL1 e JAG1) mostraram distribuição homogênea entre compartimentos tímicos, o que não permite descartar sua participação durante os processos de maturação de nTreg no timo.

Ainda em relação à população nTreg avaliamos a correlação entre a expressão gênica e protéica de receptores e ligantes Notch. Considerando que não foi possível definir claramente se as células FOXP3⁺ são estágios de maturação ou nTregs maduras no timo, optamos por fazer as correlações de expressão gênica de timócitos TCD4⁺CD25^{high} com a média de expressão proteica dos receptores e ligantes Notch em células FOXP3⁺ do timo.

Com isso observamos que não houve correlação entre os receptores e ligantes avaliados em nTregs com exceção do gene/proteína Notch2 que mostrou uma correlação negativa reforçando evidências anteriores, quanto aos estágios de maturação de linfócitos T, de que não se observa a uma correlação positiva gene/proteína em

timócitos humanos, fato que deve ser considerado em todos os futuros estudos envolvendo estas populações.

Durante o processo de maturação tímica a expressão de receptores e ligantes Notch, como demonstrado, pode permitir interações recíprocas entre timócitos imaturos, porém outras populações especializadas podem colaborar com este fenômeno, as tDC (Maillard e cols., 2005; Yuan e cols., 2009). Esta população já foi descrita no processo de maturação de linfócitos T (Senelar e cols., 1976) e nTreg (Watanabe e cols., 2005).

As tDC possuem importante papel durante os processos de seleção positiva e negativa e o envolvimento dos componentes Notch neste processo foi descrito em camundongos (Yamagushi e cols., 2002) embora não seja discutido em humanos. Por estas razões passamos a avaliar a expressão de receptores e ligantes Notch em tDC humanas.

As tDC no timo humano estão em uma pequena porcentagem, semelhante ao observado em camundongos (Yamagushi e cols., 2002, Ishifune e cols., 2011). Estas células expressam CD11c e em sua maioria são originadas de um progenitor linfóide (Marquez e cols., 1998; Radtke e cols., 2000; Li e cols., 2009).

Observamos que todos os genes de receptores e ligantes Notch são expressos nas tDC, e em maior nível de expressão o ligante JAG1. A expressão gênica dos ligantes e receptores Notch em tDC já foi descrita em camundongos (Yamagushi e cols., 2001) sugerindo uma similaridade entre as espécies também em relação a esta população.

A identificação das tDC no timo foi realizada utilizando a molécula S100 (Nakajima e cols., 1982). A avaliação da frequência de tDC no timo mostrou que esta população é mais abundante nas regiões córtico-medular e medular em comparação ao córtex tímico, sugerindo que as tDC tenham maior participação nos estágios de maturação CD4+CD8+, CD4+CD8- e CD4-CD8+. Durante estes estágios ocorrem a seleção positiva e negativa, reforçando o envolvimento de tDC neste processo.

A avaliação da expressão proteica revelou que as tDC expressam todos os ligantes Notch e, em maior frequência o DLL4, característica que não variou entre as regiões tímicas. Esta expressão proteica não foi descrita na literatura até o momento embora fosse esperada considerando que, em camundongos, este ligante é

indispensável para o comprometimento de timócitos com a linhagem T (Hozumi e cols., 2008).

Quanto a avaliação dos receptores Notch observamos que todos são expressos nas tDC sendo o Notch2 mais frequente nas regiões córtico-medular e medula quando comparados com o córtex. De forma similar ao DLL4, o receptor Notch2 pode ter maior importância na interação das tDC com os estágios mais tardios de maturação de linfócitos T.

Em conjunto nossos dados mostram que a interação das tDC com os timócitos pode ocorrer tanto pelo envolvimento de ligantes, os quais podem estimular timócitos imaturos via receptores Notch influenciando em sua maturação, como via receptores, onde a expressão de ligantes em timócitos pode estimular as tDC.

A estimulação de tDC no contexto tímico já foi descrita via linfopoetina estromal tímica (TLSP), o que pode regular positivamente a expressão de CD80 e CD86 em tDC e favorecer a maturação de timócitos CD4+CD25+FOXP3⁻ em CD4+CD25+FOXP3⁺ (Watanabe e cols., 2005). Porém, nada foi descrito em relação a via de sinalização Notch. Considerando nossos resultados, podemos sugerir que a via Notch também esteja envolvida na regulação/ativação de tDC o que pode ter impacto direto sobre maturação de linfócitos T e suas subpopulações como as nTreg.

Por fim, a ausência de correlação entre a expressão de genes e proteínas de receptores e ligantes Notch em tDC mostrou que esta característica se aplica a todas as populações estudadas no timo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

- A) As populações de timócitos CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4+CD8-, CD4+CD25^{high} (nTreg) e CD11c+ (tDCs) foram identificados fenotipicamente e purificadas.
- B) Os receptores Notch1, Notch2 e Notch3 e os ligantes DLL1, DLL4, Jagged1 e Jagged2 são expressos de forma gênica e proteica (incluindo o receptor Notch4) em todos os estágios de maturação de linfócitos T e tDC do timo humano.
- C) Os linfócitos nTreg expressam de forma gênica e proteica todos os receptores e ligantes avaliados, dado inédito na literatura.
- D) Os receptores e ligantes Notch avaliados foram quantificados e sua distribuição é homogênea nas regiões tímicas (córtex, córtico-medular e medula).
- E) A expressão proteica e gênica dos receptores e ligantes Notch avaliados não apresenta correlação positiva nas populações de estudo.

ANEXOS

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCFMUSP)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

***DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL*****1.NOME:**

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº
APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....).....

2.RESPONSÁVEL**LEGAL**

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº
APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ESTUDO DA MATURAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO TIMO HUMANO

PESQUISADOR: ALBERTO JOSÉ DA SILVA DUARTE

CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM-56 (DERMATOLOGIA E IMUNODEFICIÊNCIAS) – DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 ANOS

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:

O Timo é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento de células de defesa do organismo. Durante a cirurgia cardíaca de crianças, o Timo é normalmente retirado por necessidade de manuseio do coração e estruturas associadas. A retirada do Timo é realizada rotineiramente porque este órgão, em crianças nos primeiros anos de vida, está com grande dimensão e localizado à frente do coração, exigindo sua remoção para o acesso cirúrgico ao coração. O Timo removido não é re-implantado, pois durante a cicatrização ocorre um grande processo de fibrose nesse órgão, o que dificulta o manuseio em caso de necessidade de nova cirurgia. O Timo retirado é então descartado. Entretanto, a utilização deste órgão, para fins de pesquisa, pode ajudar no entendimento de algumas funções do sistema imunológico, como por exemplo, a maturação das células T regulatórias (T reg) e dos receptores chamados Notch.

As células T reg atuam no sistema imune para controlar reações indesejadas contra constituintes do próprio corpo, e também para regular a magnitude de uma resposta imunológica contra um patógeno, como uma bactéria ou vírus. Desta

forma, é muito importante entender como estas células se formam dentro do timo humano.

OBJETIVO GERAL

Nosso objetivo neste estudo é estudarmos o desenvolvimento das T reg e a expressão dos recptores Notch no timo humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a distribuição das células T reg no timo humano;
- Identificar a fase de desenvolvimento das células T reg;
- Identificar a expressão de receptores e ligantes Notch durante as fases de desenvolvimento das células T reg.

2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS, INCLUINDO IDENTIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SÃO EXPERIMENTAIS:

O cirurgião removerá o Timo, como de rotina, no momento da cirurgia de correção do coração ou estruturas associadas. O Timo retirado será conservado e levado ao laboratório, onde será realizada a análise do órgão. Este estudo engloba uma análise histológica, e uma análise da expressão de proteínas responsáveis pelo funcionamento normal do timo e das células regulatórias.

Todos os timos serão identificados por um código e pelo número do IH do paciente. Os dados clínicos serão mantidos sob sigilo, em armário dedicado, trancado à chave.

3. 4. DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

Não há desconfortos ou riscos adicionais associados ao projeto, uma vez que o procedimento será feito necessariamente para acesso cirúrgico ao coração e/ou vasos da base do coração e não por necessidade experimental.

5. BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE:

O principal benefício na participação deste projeto é permitir o avanço do conhecimento científico sobre o funcionamento do sistema imune que poderá, no futuro, beneficiar e até salvar a vida de outras pessoas.

6. RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS O PACIENTE POSSA OPTAR:

Não há procedimentos alternativos. O paciente pode optar por não doar o timo, sendo então descartado.

7. GARANTIA DE ACESSO: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são o Dr. Alberto José da Silva Duarte ou Dr. João Bosco de Oliveira Filho, que podem ser encontrados no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 – Prédio II – 3º. andar; Telefone: 3061-7193.

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9. DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11. DESPESAS E COMPENSAÇÕES: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ESTUDO DA MATURAÇÃO DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO TIMO HUMANO".

Eu discuti com Dra. Luciana Bento de Souza ou Dr. Alberto José da Silva Duarte ou Dr. Joao Bosco de Oliveira Filho sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCor)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE:.....

DOC. DE IDENTIDADE Nº :SEXO: MAS [] FEM []

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

DADOS DO RESPONSÁVEL LEGAL

NOME COMPLETO:.....

PARENTESCO:.....DOC. DE IDENTIDADE Nº :.....

ENDEREÇO: NºAPTO:

BAIRRO..... CIDADE:

UF:.....CEP:.....TELEFONE:(.....).....

II – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO RESPONSÁVEL LEGAL DO PACIENTE, SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA QUE SERÁ DESENVOLVIDA

1. Justificativa e objetivos da pesquisa

O timo é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento de células de defesa do organismo. Durante a cirurgia cardíaca de crianças, o timo é normalmente retirado para facilitar a visualização e o manuseio do coração e estruturas associadas. A retirada do timo é realizada rotineiramente em crianças nos primeiros anos de vida, pois nesta idade o timo é muito grande e está localizado à frente do coração, dificultando o acesso cirúrgico. O timo removido não é re-implantado, pois durante a cicatrização ocorre um grande processo de fibrose nesse órgão, o que dificulta o manuseio em caso de necessidade de nova cirurgia. O timo retirado é então

descartado. Entretanto, a utilização deste órgão, para fins de pesquisa, pode ajudar no entendimento de algumas funções do sistema imunológico, como a defesa do organismo contra bactérias, vírus, fungos e células cancerosas; e a prevenção de reações do próprio organismo contra ele mesmo.

Desta forma, é muito importante entender como as células de defesa se formam dentro do timo humano.

2. Procedimentos que serão utilizados, incluindo a identificação dos procedimentos experimentais

O cirurgião removerá o timo, como de rotina, no momento da cirurgia de correção do coração ou estruturas associadas. O timo retirado será conservado e levado ao laboratório, onde será realizada a análise do órgão. Este estudo engloba uma análise histológica, e uma análise da expressão de proteínas responsáveis pelo funcionamento normal do timo e das células regulatórias.

Todos os timos serão identificados por um código e pelo número do IH do paciente. Os dados clínicos serão mantidos sob sigilo, em armário dedicado, trancado à chave.

3. Desconfortos e riscos esperados

Não há desconfortos ou riscos adicionais associados ao projeto, uma vez que o procedimento será feito necessariamente para acesso cirúrgico ao coração e/ou vasos da base do coração e não por necessidade experimental.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

O principal benefício na participação deste projeto é permitir o avanço do conhecimento científico sobre o funcionamento do sistema imune que poderá, no futuro, beneficiar a vida de outras pessoas.

III – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após todos os esclarecimentos sobre a pesquisa, apresentados pelo pesquisador responsável, entendi o que me foi explicado e ciente, concordo em doar o órgão (Timo) removido da criança de minha responsabilidade para fins de pesquisa científica.

São Paulo, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura de Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo C: Aprovação do Comitê de Ética (HCFMUSP) **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/05/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0110/08**, intitulado: "**ESTUDO DA MATURAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO TIMO HUMANO**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Alberto José da Silva Duarte**

Pesquisador (a) Executante: **Luciana Bento de Souza**

CAPPesq, 16 de Maio de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo D: Aprovação do Comitê de Ética (HCor)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DO CORAÇÃO

CEP/HCor – 049/2008-Apr

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HCor, em reunião de 15.04.2008, **APROVOU** o documento abaixo mencionado referente ao protocolo de pesquisa nº 049/2008 intitulado "**ESTUDO DA MATURAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO TIMO HUMANO**", sob responsabilidade de execução do médico pesquisador Dr. *Alberto José da Silva Duarte*.

- Protocolo de Pesquisa: "**ESTUDO DA MATURAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS NO TIMO HUMANO**".
- Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Cabe ao pesquisador executante elaborar e apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Coração – CEP/HCor, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa, Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c", nas datas abaixo: 30.05.2009, 30.05.2010, 30.05.2011, 30.05.2012.

CEP/HCor, 15 de abril de 2008

Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa - HCor

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. 4(7):553-64.

Amsen D., Antov A., Jankovic D., Sher A., Radtke F., Souabni A., Busslinger M., McCright B., Gridley T., Flavell R.A. Direct regulation of GATA3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity.* 2007. 27: 89-99.

Anastasi E., Campese A.F., Bellavia D., e cols. Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2003. 171: 4504.

Anderson G., Pongracz J., Parnell S., Jenkinson E.J. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *European Journal of Immunology.* 2001. 31(11): 3349-3354.

Arkachaisri T.; Ballow M. Developmental immunology of newborn. *Immunol Allergy Clin N Am.* 1999. 2:253-279.

Arvanitis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J. Notch signaling: cell fate control and integration in development. *Science.* 1999. 284: 770-776.

Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001. 167:1245.

Barrett D.J., Ammann A.J., Wara D.W., Cowan M.J., Fisher T.J., Stiehm E.R. Clinical and immunologic spectrum of the DiGeorge syndrome. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1981. 6(1): 1-6.

Battaglia M.; Gregori S.; Bacchetta R; Roncarolo M-G. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Seminars in Immunology* . 2006. 18: 120–127.

Bellavia, D., Campese A.F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M.P. Constitutive activation of NF- κ B and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J.*, 2000. 19:3337-48.

Bellavia, D., Campese, A.F., Vacca, A., Gulino, A., Screpanti, I. Notch 3, another Notch in T cell development. *Seminars in Immunology*, 2003. 15: 107-12.

Bensinger S.J. *et al.* Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4+25+ immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001. 194: 427-438.

Brearley S., Gentle T.A., Baynham M.I., Roberts K.D., Abrams L.D., Thompson R.A. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin. Exp. Immunol.* 1987. 70(2): 322-7.

Campese A.F., Grazioli P., Colantoni S., Anastasi, E., Mecarozzi M., Checquolo S., De Luca G., Bellavia D., Frati L., Gulino A. Notch3 and pT α /pre-TCR sustain the in vivo function of naturally occurring regulatory T cells. *International Immunology*. 2009. 21(6): 727-743.

Ciofani M., Zúñiga-Pflücker J.C. 2007. The thymus as an inductive site for T cell lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 463-93.

Cooper M.; Buckley R. 1982. Developmental immunology and immunodeficiency diseases. *JAMA*. 248: 2658-2670.

Deftos M.L., He Y.W., Ojala E.W., Bevan M.J. Correlating Notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity*. 1998. 9: 777-786.

Deftos M.L., Huang E., Ojala E.W., Forbush K.A., Bevan M.J. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity*. 2000. 13: 73-84.

DiGeorge A.M. 1994. Maldevelopment of the thymus. *Pediatr. Pathol.* 14(1): 179-80.

Domínguez-Gerpe L. & Rey-Méndez, M. 2003. Evolution of the Thymus Size in Response to Physiological and Random Events Throughout Life. *Microscopy Research and Technique*. 62: 464-476.

Eysteinsdottir J.H., Freysdottir J., Haraldsson A., Stefansdottir J., Skaftadottir I., Helgason H., Ogmundsdottir H.M. 2004. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clin. Exp. Immunol.* 136(2):349-55.

Fehérvári Z.; Sakaguchi S. 2004. CD4⁺ Tregs and immune control. *The Journal of Clinical Investigation*. 114: 1209-1217.

Felli, M.P., Maroder, M., Mitsiadis, T.A., Campese, A.F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R.S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A., Screpanti, I. 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. *International Immunology*, 1999, 11 (7): 1017-25.

Fortini, M.E. Γ -secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. 3:673-684

Foss, D.L., Donskoy, E., Goldscheider I. The importance of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2001. 193:365-74.

Franceschi C., Bonafè M., Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*. 2000. 18(16):1717-20.

Franceschi C., Capri M., Monti D., Giunta S., Olivieri F., Sevini F., Panourgia M.P. Invidia L., Celani L., Scurti M., Cevenini E., Castellani G.C., Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev*. 2007. 128(1):92-105.

Fryer, C.J; Lamar, E.; Turbachova, I.; Kintner, C.; Jones, K.A. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev*. 2002. 16: 1397-13411.

Gallegos A.M., Bevan M.J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med*. 2004. 200: 1039-49.

George A.J., Ritter M.A. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today*. 1996. 17(6):267-72.

Godfrey D.I., Mombaerts P., Tonegawa S., Zlotnik A. Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J. Immunol*. 1994. 152: 4783-92.

Gowans, J. L., McGregor, D. D., Cowen, D. M. & Ford, C. E. Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 1962. 196:651–653.

Hamada Y., Kadokawa Y., Okabe M., Ikawa M., Coleman J.R., Tsujimoto Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development*. 1999. 126: 3415-24.

Harper J.A., Yuan J.S., Tan J.B., Visan i. & Guidos C.J. Notch signaling in development and disease. *Clinical Genetics*. 2003. 64:461-472.

Hassall A. H. *The Microscopic Anatomy of The Human Body in Health and Disease* (Samuel Highly, London, 1849).

Hasserjian R.P., Aster J.C., Davi F., Weinberg D.S., Sklar J. Modulated expression of Notch1 during thymocyte development. 1996. *Blood*. 88: 970-976.

Heinzel K., Benz C., Martins V.C., Haidl I.D., Bleul C.C. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrives in the thymic microenvironment. *J. Immunol.* 2007. 178(2): 858-68.

Hernández-Hoyos, G., Alberola-Ila, J. A Notch so simple influence on T cell development. *Seminars in Cell and Development Biology*, 2003. 14: 121-5.

Hogquist, K.A. *et al.* Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. 5:772-785.

Holt P.G. Functionally mature virus-specific CD8(+) T memory cells in congenitally infected newborns: proof of principle for neonatal vaccination? *J. Clin. Invest.* 2003. 111(11):1645-7.

Hori S., Nomura T., Sakagushi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003. 299: 1057-1061.

Hozumi K., Negishi N., Suzuki D., Abe N., Sotomaru Y., Tamaoki N., Mailhos C., Ish-Horowicz D., Habu S., Owen M.J. 2004. Delta-like1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 5: 638-644.

Hozumi K., Mailhos C., Negishi N., Hirano K., Yahata T., Ando K., Zuklys S., Holländer G.A., Shima D.T., Habu S. Delta-like4 is indispensable in thymic environment for T cell development. *J. Exp. Med.* 2008. 205(11): 2507-13.

Hozumi K., Negishi N., Tsuchiya I., Abe N., Suzuki D., Yamamoto M., Engel J.D., Habu S. Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38: 977-985.

Huang E.Y., Gallegos A.M., Richards S.M., Lehar S.M., Bevan M.J. Surface expression of Notch1 on thymocytes: correlation with the double-negative to double-positive transition. *J. Immunol.* 2003. 171(5): 2296-2304.

Hsu S.M., Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981;29(4):577-80.

Ishifune C., Maekawa Y., Nishida J., Kitamura A., Tanigaki K., Yasutomo K. Notch signaling regulates the development of a novel type of Thy1-expressing dendritic cell in the thymus. *European J. of Immunol.* 2011. 41: 1309-1320.

Iso T., Sartorelli V., Chung G., Shichinohe T., Kedes L., Hamamori Y. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol. Cell. Biol.* 2001. 21: 6071-6079.

Jaeckel E., Kretschmer K., Apostolou I., Von Boehmer H. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin. Immunol.* 2006. 18: 89.

Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J. Exp. Med.* 2001. 194: 991-1002.

Janeway C.; Travers P.; Walport M.; Shlomchik M. 2002. Immunobiology. The immune system in health and disease, 5^a ed. RS. Ed. ARTMED.

Jiang R., Lan Y., Chapman H.D., et cols. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev.* 1998. 12(7): 1046-57.

Jimenez E., Vicente A., Sacedón R., Munoz J.J., Weinmaster G., Zapata A.G., et al. Distinct mechanisms contribute to generate and change CD4:CD8 cell ratio during thymus development: a role for the Notch ligand Jagged1. *J. Immunol.* 2001. 166: 5898-5908.

Kitamoto, T., Takahashi, K., Takimoto, H., Tomizuka, K., Hayasaka, M., et al. Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis analysis of notch genes expression in Notch3-deficient mice. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 2005. 331: 1154-62.

Lai, E.C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004. 131:965-73.

Laky K., Fowlkes B.J. 2008. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 2008. 20 (2): 197-202.

Lan R.Y.; Ansari A.A.; Lian Z.X; Gershwin M.E. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2005. 4: 351.

Li J-C., Park J-H, Foss D., Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 2009. 206(3): 607-622.

Liston A., Nutsch K.M., Farr A.G., Lund J.M., Rasmussen J.P., Koni P.A., Rudensky A.Y. Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. 105(33): 11903-08.

Livak K.J. and Schittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25(4): 402-8.

Liu, Y-J. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends in Immunology*. 2006. 27:215-221.

Lyon M.F.; Peters J.; Glenister P.H.; Ball S & Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1990. 87: 2433-2437.

Madhok A.B., Chandrasekran A., Parnell V., Gandhi M., Chowdhury D., Pahwa S. Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2005. 12(5): 563-5.

Maillard, I., Fang, T., Pear, W.S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu. Rev. Immunol*. 2005. 23: 945-74.

Maillard I., Tu L., Sambandam A., Yashiro-Ohtani Y., Millholland J., Keeshan K., Shestova O., Xu L., Bhandoola A., Pear W.S. The requirement of pre-T cell receptor. *J. Exp. Med*. 2006. 203: 2239-2245.

Magri M., Yatim A., Benne C., Balbo M., Henry A., Serraf A., Sakano S., Gazzolo L., Le'vy Y., Lelie'vre J-D. Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur. J. Immunol*. 2009. 39: 1231-1240.

Male, D. 2002. *Imunologia, um resumo ilustrado*. 3^a. ed. SP. Ed. Manole LTDA.

Mancebo E., Clemente J., Sanchez J., Ruiz-Contreras J., De Pablos P., Cortezon S., Romo E., Paz-Artal E., Allende L.M. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin. Exp. Immunol.* 2008. 154(3): 375-83.

Mancini S.J., Mantei N., Dumortier A., e cols. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood.* 2005. 105(6): 2340-2.

Markert L.M.; Boek A.; Hale L.P.; Kloster A.L.; MCLAughlin T.M.; Batchvarova M.N.; Douek D.C.; Koup R.A.; Kostyu D.D.; Ward F.E.; Rice H.E.; Mahaffey S.M.; Buckley R.H.; Haynes B.F. Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome. *New Engl. J. Med.* 1999. 341:1180-89.

Markert M.L., Devlin B.H., Alexieff M.J., Li J., McCarthy E.A., Gupton S.E., Chinn I.K., Hale L.P., Kepler T.B., He M., Sarzotti M., Skinner M.A., Rice H.E., Hoehner J.C. Review of 54 patients with DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood.* 2007. 109(10):4539-47.

Markert M.L., Devlin B.H., McCarthy E.A. Thymus transplantation. *Clin. Immunol.* 2010. 135(2):236-46.

Marquez C., Trigueros C., Franco J.M., Ramiro A.R., Carrasco Y.R., Lopez-Botet M., Toribio M.L. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood.* 1998. 91: 2760-2771.

McIntire, K. R., Sell, S. & Miller, J. F. A. P. Pathogenesis of the post-neonatal thymectomy wasting syndrome. *Nature* 1964. 204: 151–155.

Medawar, P. B. *The Immunologically Competent Cell: Its Nature and Origin* (editora Wolstenholme, G. & Knight, J.) 70 (Churchill, Londres, 1963).

Miller, J. F. A. P. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961. 2: 748–749

Miller, J. F. A. P., Marshall, A. H. E. & White, R. G. Immunological significance of the thymus. *Adv. Immunol* 1962.. **2**, 111–162

Miller, J. F. A. P., Doak, S. M. A. & Cross, A. M. Role of the thymus in the recovery of the immune mechanism in the irradiated adult mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1963. **112**, 785–792

Miller, J. F. A. P., Law, L. W. & Ting, R. C. Influence of thymectomy on tumor induction by polyoma virus in C57BL mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964. **116**, 323–327

Miller, J.F.A.P. Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* 1965. 208:1337-38.

Minter L.M., Turley D.M., Das P., Shin H.M., Joshi I., Lawlor R.G., Cho O.H., Palaga T., Gottipati S., Telfer J.C., Kostura L., Fauk A.H., Simpson K., Such K.A., Miele L., Golde T.E., Miller S.D., Osborne B.A. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat. Immunol.* 2005. 6: 680-688.

Mohtashami M., Shah D.K., Nakase H., Kianizad K., Petrie H.T., Zúñiga-Pflücker J.C. Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J. Immunol.* 2010. 185: 867-876.

Moretta L., Mingari M.C., Webb S.R., Pearl E.R., Lydyard P.M., Grossi C.E., Lawton A.R., Cooper M.D. Imbalances in T cell subpopulations associated with

immunodeficiency and autoimmune syndromes. *Eur. J. Immunol.* 1977. 7(10):696-700.

Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Shimosato, Y., Motoi, M., Lennert, K. S-100 protein in Langerhans cells, interdigitating reticulum cells and histiocytosis X cells. 1982. *Gann.* 73:429-32.

Ng W.F.; Duggan P.J.; Ponchel F. *et al.* Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* 2001. 98: 2736.

Nishizuka Y. & Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 1969. 166:753-755.

Ogle B.M., West L.J., Driscoll D.J., Strome S.E., Razonable R.R., Paya C.V., Cascalho M., Platt J.L. Effacing of the T cell compartment by cardiac transplantation in infancy. *J. Immunol.* 2006. 176(3):1962-7.

Ou-Yang H.F.; Zhang H.W.; Wu C.G.; Zhang P.; Zhang J.; Li J.C.; Hou L.H.; He F.; Ti X.Y.; Song L.Q.; Zhang S.Z.; Feng L.; Qi H.W.; Han H. Notch signaling regulates the FOXP3 promoter through RBP-J- and Hes1-dependent mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2008. 320: 109-114.

Parreira, L., Neves, H., Simões, S. Notch and lymphopoiesis: a view from the microenvironment. *Seminars in Immunology*, 2003. 15: 81-9.

Penhale W.J.; Farmer A.; McKenna R.P.; Irvine W.J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* 1973. 15: 225-236.

Penhale W.J.; Irvine W.J.; Inglis J.R.; Farmer A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1976. 25: 6-16.

Pennington D.J., Silva-Santos, B., Silberzahn T., e cols. Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature*. 444: 1073.

Petrie H.T., Zúñiga-Pflücker. 2007. Zoned Out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Ann. Rev. Immunol.* 2006. 25: 649-79.

Picca C.C. *et al.* Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Review*. 2006. 212: 74-85.

Piliero L.M., Sanford A.N., McDonald-MacGinn D.M., Zackai E.H., Sullivan K.E. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*. 2004. 103(3):1020-5.

Pirot P., Grunsven L.A., Marine J.C., Huylebroeck D., Bellefroid E.J. Direct regulation of Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. 322: 526-534.

Powell B.R.; Ruist N.R.; Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy and fatal infection in infancy. *J Pediatr*. 1982. 100:731-7.

Prelog M., Keller M., Geiger R., Brandstätter A., Würzner R., Schweigmann U., Zlamy M., Zimmerhackl L.B., Grubeck-Loebenstien B. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin. Immunol.* 2009. 130(2):123-32.

Prelog M., Wilk C., Keller M., Karall T., Orth D., Geiger R., Walder G., Laufer G., Cottogni M., Zimmerhack I., Lothar B., Stein J., Grubeck-Loebenstien B., Wuerzner R. Diminished response to tick-borne encephalitis vaccination in thymectomized children. *Vaccine*. 2008. 26(5):595-600

Radtke F., Wilson A., Stark G., Bauer M., van Meerwijk J., MacDonald H.R., Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999. 10: 547-558.

Radtke F., Ferrero I., Wilson A., Lees R., Aguet M., MacDonald H.R. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. *J. Exp. Med.* 2000. 191(3): 1085-94.

Radtke F., Wilson A. & MacDonald H.R. Notch signaling in T and B –cell development. *Current Opinion in Immunology*. 2004. 16: 174-179.

Radtke F., Fasnacht N., MacDonald H.R. Notch signaling in immune system. *Immunity*. 2010. 32(1): 14-27.

Rothenberg E.V., Scripture-Adams D.D. Competition and collaboration: GATA-3, PU.1, and Notch signaling in early T-cell fate determination. *Seminars in Immunology*. 2008. 20: 236–246.

Rothenberg E.V. Transcriptional drivers of the T-cell lineage program. *Current Opinion in Immunology*. 2012. 24:1–7.

Rubinstein A., Pelet B., Schweizer V. Immunological decay in thymectomized infants. *Helv. Pediatr. Acta*. 1976. 30(4-5):425-33.

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., et al. Notch 2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, 2003. 18: 675-85.

Sakagushi S.; Takahashi T.; Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. *J. Exp. Med.* 1982. 156: 1577- 1586.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. 22: 531-562.

Sakagushi S., Wing K., Miyara M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: S116-S123.

Sakagushi S., Yamagushi T., Nomura T., Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008. 133: 775-787.

Salameire, D.; Le Bris, Y.; Fabre, B.; Fauconnier, F.; Solly, F.; Pernollet, M.; Bonnefoix, T.; Leroux, D.; Plumas, J.; Jacob, M.C. Efficient characterization of the TCR repertoire in lymph nodes by flow cytometry. *Cytometry.* 2009. 75A: 743-751.

Sandy A.R., Jones M., Maillard I. Notch signaling and development of the hematopoietic system. *Adv Exp Med Biol.* 2012. 727:71-88.

Senelar R.; Escola M.J.; Escola R.; Serrou B. & Serre A. 1976. Relationship between Hassal's corpuscles and thymocytes fate in guinea-pig foetus. *Biomedicine.* 24:112-122.

Shevach E.M. Mechanism of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009. 30: 636-645.

Shi J., Fallahi M., Luo J.L., Petrie H.T. Nonoverlapping functions for Notch1 and Notch3 during murine steady-state thymic lymphopoiesis. *Blood.* 2011. 118(9): 2511-9.

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T-cells. *Annu Rev Immunol* 2003. 21:139-76.

Steinmann G.G., Klaus B., Müller-Hermelink H.K. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 1985. 22(5): 563-75.

Takahashi T. *et al.* 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192: 303-310.

Takanami T., Abiko T., Koizumi S. Therapeutic outcomes in thymectomized patients with myasthenia gravis. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009. 15(6):373-7.

Tanaka S., Tsukada J., Suzuki W., Hayashi K., Tanigaki K., Tsuji M., Inoue H., Honjo T., Kubo M. The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity.* 2006. 24: 689-701.

The Children's Heart Foundation, disponível em:
www.childrensheartfoundation.org

Thompson P.K., Zúñiga-Pflücker J.C. On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Seminars in Immunology.* 2011. 23: 350-359.

Torfadottir H., Freysdottir J., Skaftadottir I., Haraldsson A., Sigfusson G., Ogmundsdottir H.M. Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. 145(3):407-12.

Tourigny M.R., Mazel S., Burtrum D.B., Petrie H.D. T cell receptor (TCR)- β gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J. Exp. Med.* 1997. 185: 1549-56.

Tuovinen H., Kekalainen E., Rossi L.H., Puntila J., Arstila T.P. Cutting edge: human CD4-CD8- thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR. *J. Immunol.* 2008a. 180: 3651-3654.

Tuovinen, H., Pirkka, T.P., Rossi, L.H., Mattila, I., Arstila, P. The FOXP3⁺ subset of human CD4⁺CD8⁺ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. *Immunology and Cell Biology*, 2008b. 86: 523-529.

Uyttendaele H., Marazzi G., Wu G., et al. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development*. 1996. 122: 2251-2259

Vercauteren S.M., Sutherland H.J. Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood*. 2004. 104: 2315-22.

Yamaguchi E., Chiba S., Kumano K., Kunisato A., Takahashi T., Takahashi T., Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunology Letters*. 2002. 81(1): 59-64.

Yashiro-Ohtani Y., Ohtani T., Pear W.S. Notch regulation of early thymocyte development. *Seminars in Immunology*. 2010. 22: 261-269.

Yuan J.S., Kousis P.C., Suliman S., Visan I., Guidos C. Functions of Notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu. Rev. Immunol.* 2010. 28: 343-65.

Watanabe N.; Wang Y-H.; Lee H.K.; Ito T.; Wang Y-H.; Cao W. & Liu Y-J. Hassal's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005. 436:1181-1185.

Weerkamp F., Baert M.R., Brugman M.H., Dik, W.A., de Haas E.F. e cols. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood*. 2006. 107: 3131-37.

Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev*. 2001. 182: 207-214.

Wilson A., Ferrero I., Macdonald H.R., Radtke F. Cutting edge: an essential role for Notch-1 in the development of both thymus-independent and -dependent T cells in the gut. *J Immunol.* 2000. 165: 5397-5400.

Wilson A., Macdonald H.R. & Radtke F. Notch1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J. Exp. Med.* 2001. 194: 1003-1012.

Witt C.M., Hurez V., Swindle C.S., Hamada Y., Klug C.A. Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol. Cell Biol.* 2003.23: 8637-50.

Wolfer A., Bakker T., Wilson A., Nicolas M., Ioannidis V., Littman D.R., Lee P.P., Wilson C.B., Held W., Macdonald H.R., Radtke F. Inactivation of Notch1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat. Immunol.* 2001. 2:235-241.

Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007. 445: 936-940.

Zlamy M., Prelog M. Thymectomy in early childhood: a model for premature T cell immunosenescence? *Rejuvenation Res.* 2009. 12(4):249-58.