

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO DE PEDIATRIA**

ALANA DOS SANTOS DIAS

**Estabelecimento do protocolo de armazenamento e recolonização dos
tecidos tímicos descelularizados**

São Paulo

2022

ALANA DOS SANTOS DIAS

**Estabelecimento do protocolo de armazenamento e recolonização dos
tecidos tímicos descelularizados**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Estela Maria Novak

São Paulo

2022

Dias AS. Estabelecimento do protocolo de armazenamento e recolonização dos tecidos tímicos descelularizados [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profª. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, Alana dos Santos
Estabelecimento do protocolo de armazenamento e
recolonização dos tecidos tímicos descelularizados /
Alana dos Santos Dias. -- São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Estela Maria Novak.

Descritores: 1.Síndrome de DiGeorge 2.Tecido
tímico 3.Transplante tímico 4.Depleção linfocítica
5.Criopreservação

USP/FM/DBD-413/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À minha mãe Durcilena, pelo que sou e
pelo exemplo de força e resiliência!*

Agradecimentos

A Deus em primeiro lugar, pois acredito que nada aconteça sem a sua permissão e por ser meu suporte em todos os momentos.

A Dra. Estela Maria Novak por me dar a oportunidade de realizar este trabalho e pela contribuição no meu desenvolvimento acadêmico. Por sua dedicação em desenvolver um trabalho e protocolo de qualidade, que no futuro venha a ser uma ferramenta importante no tratamento dos pacientes.

Ao Dr. Vicente Odone Filho pelo suporte ao trabalho desenvolvido, visando a terapêutica em pacientes pediátricos.

Aos médicos Dr. Marcelo Jatene e Dra. Patrícia Oliveira do Hospital do Coração. Associação do Sanatório Sírio (HCor) de São Paulo, pelo comprometimento e colaboração ao trabalho proposto na captação dos tecidos.

Ao Dr. Vanderson Rocha pelo apoio no desenvolvimento e as discussões sobre o trabalho, propondo melhoria e aplicabilidade futura do protocolo.

A minha mãe Durcilena a quem eu chamo carinhosamente de Dudu, por ser o maior e melhor exemplo de ser humano, ensinando todos os dias sobre amor e respeito ao próximo. Te Amo!

Ao meu pai Valter, por ser um exemplo de caráter e de honestidade.

Ao meu irmão Fredson, que foi o suporte para nossa mãe quando eu precisei estar ausente devido aos compromissos da dissertação dando apoio e carinho.

Ao meu sobrinho Rayan Pedro por ser curioso e um dos meus maiores incentivadores pela busca do saber. Te amo!

As minhas tias Luzinete, Maria do Carmo, Maria de Lurdes, Dirlene e Rita de Cassia por serem mulheres fortes e destemidas. Obrigada pelo exemplo!

As minhas amigas Ana Paula Vieira, Bruna Santillo, Denise Reis, Edione Reis, Laís Teodoro, Marcella Vassão e Nathalia Romani do grupo mais lindo e inteligente do meu WhatsApp e da minha vida “Tikikikos” por todo conhecimento compartilhado, pelos momentos de diversão, companheirismo e amizade. Gostaria que soubessem que sou muito feliz em ter vocês, seus cônjuges e suas proles na minha vida.

A minha parceira de laboratório e amiga Dra. Thamiris Magalhães Gimenez por todo o apoio nos momentos difíceis durante o desenvolvimento da dissertação e por controlar meus ímpetos, pelos almoços e por apresentar as tentações de papelaria. Obrigada Thami!

A Dra. Paula Ordonhez Rigato pela amizade e carinho por mim. Mas que isso alguém que compartilha o conhecimento com humildade e respeito. Obrigada Paula!

Aos meus amigos que eu conheci no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo Karoline Campos (minha dupla), Thainá, Talita, Nice, Margarete e Júlio. Muito obrigada pelo apoio, gargalhadas e mostrar que sempre vale a pena se lutar por um ideal!

Aos amigos da vida, mais que isso um encontro de almas Caroline Vilas Boas, Meire Vilas Boas, Lucas Vilas Boas, Fernanda Kobayashi (Fer), Elias El-Mafarjeh (meu filho e aluno), Ana Roberta Comin, Jefferson Comin, Grazielle Santana, Grasielle Pujol, Erasmo Assumpção Neto, eu amo vocês cada um do seu jeito e no seu tempo!

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP principalmente a técnica Kelly Bispo por sempre está disposta a oferecer ajuda e compartilhar boas risadas.

Ao Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP não só na essência de laboratório que realizou o trabalho brilhante com as lâminas do trabalho, mas também por todo o carinho, amor e respeito que sempre tiveram pelo trabalho desenvolvido e por mim. As técnicas Ângela “Angel”, Sandra e Esmeralda, que sempre estarem com o sorriso e a palavra necessária na hora do meu desespero, o meu carinho e muito obrigada!

Ao Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP pelo suporte na reta final do trabalho com as discussões sobre as análises histopatológicas e fotografia das lâminas, foi uma grata surpresa e fonte de conhecimento que eu tive. Dra. Nilsa Regina Damasceno-Rodrigues e Sueli obrigada por tanto carinho, respeito e conhecimento compartilhados.

Ao Laboratório de Investigação Médica LIM 56 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, pelo conhecimento compartilhado durante a minha vida profissional. Dra. Maria Sato, Dr. Gil Bernard, Dra. Telma Oshiro, Dr. Jorge Simão Casseb, Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos, Silvinha, Adriana, Dilma, Daniel, Tati, Du, Noemia, Mayra, Nayura, Lucio, Luís, Cristina, Rosa, Edna e alunos, muito obrigada por tudo sempre.

Ao Laboratório de Investigação Médica LIM 36 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, pelo suporte para a realização do trabalho. Obrigada a todos os funcionários em especial a secretária Regina pelos cafés com doses de carinho que salvaram muitas vezes o meu dia e a Dona Margarida que sempre foi um

exemplo de ser humano, amor, alegria, respeito e que nos momentos tensos tirou a minha melhor risada. Obrigada!

Aos pais dos pacientes que no momento de preocupação após a cirurgia dos seus filhos, foram sempre de uma generosidade e educação ao conversarem comigo sobre o trabalho desenvolvido, concedendo o uso do tecido. Muito Obrigada pelas palavras de “Boa sorte”, “ Espero que ajudem outras crianças”, “Meu filho já nasceu generoso” entre outras que foram minha fonte de inspiração e mais um motivo de não desaminar em momento algum!

Ao Departamento de Pós-Graduação da Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP e todos seus funcionários pelo suporte acadêmico durante o desenvolvimento da dissertação.

À FAPESP -Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que concedeu o financiamento ao Projeto Temático (subprojeto especial) FAPESP: 2013/02162-8 e recursos da parceria com o Projeto Temático FAPESP: 2014/50489-9.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida, o que tornou possível a realização deste trabalho.

“Se você pode sonhar, você pode realizar!”
Walt Disney

RESUMO

Dias AS. Estabelecimento do protocolo de armazenamento e recolonização dos tecidos tímicos descelularizados [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A síndrome de DiGeorge é ocasionada pela deleção do cromossomo 22q11.2, acarretando na ausência total ou parcial do timo. Aproximadamente 1% dos pacientes diagnosticados com a síndrome de DiGeorge tem parcial ou completa ausência de timo na forma completa da síndrome. Estes pacientes requerem tratamento urgente para reconstituírem a imunidade com células T. Transplante tímico é uma promessa em investigação para a reconstituição das funções tímicas em crianças com atimia congênita. Neste estudo, foi demonstrado uma possível otimização na preparação dos fragmentos tímicos através de depleção prévia de células de timócitos e leucócitos, para agilizar o transplante tímico. Fragmentos tímicos previamente após depleções de timócitos e leucócitos foram criopreservados com 5% Dextran FP 40, 5% Me2SO, 5% SFB, para preservar a estrutura do tecido tímico, e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C durante 30 dias e um ano. A arquitetura tecidual foi preservada durante estes períodos, incluindo as células epiteliais medulares tímicas (mTEC), células epiteliais corticais (cTEC), células endoteliais e o corpúsculo de Hasall. Estas estruturas se mantiveram integras e viáveis após o descongelamento em cada período. Com os resultados do protocolo de criopreservação, foi possível fazer a recolonização com injeções com 3×10^6 timócitos/mL de um doador, no tecido tímico após depleção de timócitos e leucócitos e criopreservado por um ano, demonstrando a capacidade destes fragmentos para realizar a maturação dos linfócitos T. Esses dados, abrem a possibilidade para armazenar fragmentos tímicos prontos para o transplante imediato em pacientes com síndrome de DiGeorge ou fenótipo atípico (Omenn-like).

Descritores: Síndrome de DiGeorge. Tecido tímico. Transplante tímico. Depleção leucocitária. Criopreservação.

ABSTRACT

Dias AS. Establishment of the protocol for storage and recolonization of decellularized thymic tissues [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

DiGeorge syndrome is a disorder caused by a microdeletion on the long arm of chromosome 22q11.2. Approximately 1% of patients diagnosed with DiGeorge syndrome may have an absence of a functional thymus, which characterizes the complete form of the syndrome. These patients require urgent treatment to reconstitute T cell immunity. Thymus transplantation is a promising investigational procedure for reconstitution of thymic function in infants with congenital athymia. Here, we demonstrate a possible optimization of the preparation of thymus slices for transplantation through prior *depletion of* thymocytes and leukocyte cell lineages followed by cryopreservation with cryoprotective media (5% Dextran FP 40, 5% Me2SO, and 5% FBS) while preserving tissue architecture. Thymus fragments were stored in liquid nitrogen at -196 °C for 30 days or one year. The tissue architecture of the fragments was preserved, including the distinction between medullary TECs, cortical TECs, Hassall bodies. Moreover, depleted thymus fragments cryopreserved for one year were recolonized by intrathymic injections of 3×10^6 thymocytes per mL, demonstrating the capability of these fragments to support T-cell development. Thus, this technique opens up the possibility of freezing and storing large volumes of thymus tissue for immediate transplantation into patients with DiGeorge syndrome or atypical (Omenn-like) phenotype.

Descriptors: DiGeorge syndrome. Thymocytes. Thymus transplantation. Leukocyte depletion. Cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Maturação dos linfócitos T no tímica.....	4
Figura 2- Preparação do tímica após timectomia.....	10
Figura 3- Avaliação da depleção celular pela expressão de CD45 e CD3 no tecido tímico após depleção por 21 dias.....	19
Figura 4- Histopatologia do tecido tímico após o protocolo de depleção e criopreservação por 30 dias e 1 ano.....	21
Figura 5- Histopatologia do tecido tímico após o protocolo de depleção e criopreservação por 30 dias e 1 ano.....	22
Figura 6- Análise da viabilidade das células do estroma tímico após a depleção e criopreservação durante 30 dias e 12 meses.....	24
Figura 7- Avaliação das células epiteliais tímicas durante o processo de depleção e criopreservação do tecido tímico.....	26
Figura 8- Avaliação da recolonização do tecido tímico após depleção e criopreservado por 30 dias/ 1 ano por citometria de fluxo.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de Anticorpos para a técnica de imuno-histoquímica.....	13
Tabela 2- Anticorpos monoclonais utilizados na avaliação do epitélio tímico pelo método de citometria de fluxo.....	16
Tabela 3- Anticorpos monoclonais utilizados para marcação dos tímócitos recolonizados no tecido após a depleção e criopreservação avaliadas pelo método de citometria de fluxo.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

AIRE: Gene Autoimmune Regulator

ATG: imunoglobulina anti-timócito

CTRL: controle

SSC: side-scattered light

DN: duplo negativo

DP: duplo positivo

DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

FSC: forward- scattered light

HLA-DR: human leukocyte antigen

HE: hematoxilina –eosina

IHQ: Imunohistoquímica

LT- β : Lymphotoxin-beta

MHC: Major Histocompatibility Complex

NGF: Nerve growth factor

PRSS16: Serine Protease 16

RER: reticulo endoplasmático rugoso

TECs: Thymic epithelial cells

TRECs T Cell Receptor Excision Circles

Treg: células T regulatórias

UEA-1: Ulex europaeus agglutinin I

VEGF: Vascular Endothelial Cell Growth Factor

TD: timo após depleção

TDC: timo após depleção e criopreservado

cTEC: cortical thymic epithelial cell

mTEC: medullary thymic epithelial cell

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1	Timo.....	1
1.1.2	Estrutura celular do arcaçouço tímico.....	1
1.1.3	Maturação dos linfócitos T no timo.....	3
1.1.4	Depleção do tecido tímico.....	4
1.2	Síndrome de DiGeorge.....	5
1.2.1	Aplicação terapêutica dos fragmentos tímicos em síndrome Digeorge (SDG)	7
1.2.2	Criopreservação do tecido tímico.....	7
2.0	JUSTIFICATIVA.....	8
3.0	HIPÓTESE.....	8
4.0	OBJETIVO.....	8
4.1	Objetivos específicos.....	8
5	CASUÍSTICA.....	9
5.1	Crítérios.....	9
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
6.1.	A preparação dos fragmentos tímicos para os ensaios.....	9
6.1.1	Etapa1- Fragmentação do tecido tímico após a timectomia. Separação dos fragmentos controle e de estudo.....	11
6.1.2	Etapa 2- Depleção dos fragmentos de timo em cultura.....	11
6.1.3	Etapa 3- Congelamento e descongelamento dos fragmentos de timo após depleções.....	11
6.1.4	Etapa 4- Análise histológica da estrutura do tecido tímico por coloração hematoxilina/eosina.....	12
6.1.5	Avaliação do arcaçouço tímico e das estruturas através da técnica de imunohistoquímica (IHQ).....	13
6.2.0	Dissociação das células do estroma tímico para análise por citometria de fluxo.....	14
6.3.0	Avaliação da depleção celular no epitélio tímico por citometria de fluxo.....	15
6.4.0	Avaliação de células cTec e mTec do estroma por citometria de fluxo.....	15

6.4.0	Avaliação de células cTec e mTec do estroma por citometria de fluxo.....	15
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
8.0	RESULTADOS.....	18
8.1	Avaliação da depleção celular com os marcadores CD45 e CD3 no tecido tímico.....	18
8.2	Avaliação da integridade do tecido tímico antes, após a depleção e criopreservação por 30 dias e 1 ano	20
8.3	Análise da viabilidade das células do tecido tímico TD, TDC 30 dias e TDC 1 ano.....	23
8.4	Avaliação fenotípica das células epiteliais tímicas cTEC e mTEC nos fragmentos TD, TDC 30 dias e TDC 1 ano.....	25
8.5	Avaliação da recolonização do tecido tímico criopreservado por 30 dias e 1 ano com timócitos/linfócitos (CD3).....	27
9.0	DISCUSSÃO.....	29
10.0	CONCLUSÃO.....	31
11.0	BIBLIOGRAFIA.....	32
12.0	ANEXOS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 TIMO

O timo é uma glândula linfóide primária responsável pela maturação dos linfócitos T, timo dependentes (Appay et al., 2010). Este é um órgão bilobado e localizado no mediastino. O timo pode ser dividido em dois compartimentos principais: O córtex e a medula. Cada compartimento contém vários subtipos de células epiteliais do timo (TEC), como as células epiteliais tímicas corticais (cTEC) e células epiteliais tímicas medulares (mTEC), além das células dendríticas, células mesenquimais e células endoteliais (Gordon J *et al.*, 2011 e Skogberg G *et al.*, 2015).

O período de maior atividade tímica ocorre durante a gestação. Em timos humanos, a exportação de células T começa na primeira etapa da gestação, com o estabelecimento de um repertório diversificado de células T, no final do primeiro trimestre (Haynes e Heinly, 1995). Análises moleculares do repertório V β dos receptores de células T nos períodos entre a 15^a a 17^a semana gestacional, não apresentaram diferença em comparação ao repertório V β do recém-nascido (Bonati *et al.*, 1992). Observando o processo de expansão e maturação das células.

Logo após o nascimento, o timo apresenta seu desenvolvimento parcialmente concluído e a partir do primeiro ano de vida, o timo inicia uma redução de sua atividade em aproximadamente 3% ao ano até a vida adulta (Steinmann *et al.*, 1985).

Após essa etapa, o volume tecidual total do timo, inicia um decréscimo, substituindo o tecido funcional em tecido adiposo (Boehm *et al.*, 2013). Entre 35 e 45 anos de idade, o timo continua diminuindo de volume em aproximadamente 1 % ao ano pelo resto da vida. Apesar desse decréscimo de tamanho e atividade, o timo continua a representar a principal fonte de diferenciação e maturação de células T (Appay *et al.*, 2010; Boehm et al., 2013; Domínguez-Gerpe e Rey-Méndez, 2003).

1.1.2. ESTRUTURA CELULAR DO ARCABOUÇO TÍMICO

Duas regiões distintas e fundamentais para a maturação dos linfócitos T são caracterizadas por: uma é a área medular mais central, margeada pelo córtex, e a outra uma região córtico-medular de transição entre os dois compartimentos (Anderson e Takahama, 2012).

As células epiteliais corticais (cTEC) e medulares (mTEC) possuem características de formação e função diferentes, mas atuam em conjunto para a formação dos aspectos da resposta imune adaptativa (Abbas & Lichtman 2005).

Células progenitoras cTEC, expressam citocinas e interleucinas, como IL-7 e os ligantes do receptor NOTCH e DL4, que tem um papel importante na indução de proliferação e diferenciação das células T e tímócitos. Estes ligantes também podem estar envolvidos no desenvolvimento de regulatórias CD25⁺, além do receptor de quimiocina CCR9, expressos em tímócitos em desenvolvimento (Thompson, PK 2011; Koch, U *et al.*, 2008).

O compartimento cortical do timo também é responsável pela seleção positiva dos linfócitos auxiliada pelas moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade) classe I e II (Laufer, T M *et al.*, 1996). A seleção positiva do MHC de classe II e cTEC será dependente das proteases, como a PRSS16, uma serina protease expressa exclusivamente no compartimento cortical, que desempenha um papel no processamento de antígenos peptídicos durante a seleção positiva de células T e a protease lipossomal catepsina L (Cheunsuk *et al.*, 2005).

As cTEC expressam durante o seu desenvolvimento, as proteínas CK-8, Ly51, CD205 e ainda, moléculas do MHC de classe II. Além da exclusiva expressão de uma subunidade do proteossomo B5T. Para a manutenção destas células, a expressão de FOXP1 é importante na etapa inicial, como na etapa tardia do seu desenvolvimento (Ucar *et al.*, 2014).

Na área medular, além de células epiteliais tímicas medulares (mTEC), observam-se estruturas peculiares, denominadas corpúsculos de Hassal, que são caracterizados por aglomerados de células epiteliais tímicas, e cuja função é reconhecer peptídeos próprios associados ao MHC. Os corpúsculos de Hassal são capazes de induzir células T (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁻) em células T (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺), denominadas células T reguladoras naturais (Treg) (Watanabe *et al.*, 2005). Estas células têm a função supressora e controladora de respostas autoimunes indesejáveis (Klein *et al.*, 2014).

As células T CD4⁺CD25⁺ são diferenciadas nos corpúsculos de Hassal no timo (células *naïve*) e, ao alcançarem o sangue periférico e os órgãos linfoides secundários, tornam-se ativadas, adquirindo fenótipo de memória (Klein *et al.*, 2014).

Na etapa inicial e na tardia de desenvolvimento das células mTEC, destacam-se os ligantes AIRE, receptores de RANK e osteoprotegerina (OPG), que são importantes

para o tecido normal do timo. Além da presença de citoqueratina 5 (CK5), lectina UEA-1, CD80, MTS10, ERTS5 e claudina 3 (CLDN3) e claudina-4 (CLDN4), presentes em células epiteliais do timo (Hamazaki, Y et al., 2007).

As mTEC no compartimento medular do timo, atuam induzindo a auto tolerância, onde um receptor CCR7, CCL19 e CCL21, são exclusivamente expressos durante a seleção positiva dos timócitos no tecido. Estas moléculas estão envolvidas na atividade regulatória autoimune e na origem de células AIRE+, que também são importantes para a expressão de antígenos próprios pelas células dendríticas, encontradas predominantemente na medula (Boehm, T *et al.*, 2013).

No arcabouço tímico ocorre a angiogênese, que é a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Este evento ocorre para a regeneração tecidual, e é de extrema importância para o desenvolvimento normal do timo e aderência das células dendríticas, que são provenientes da medula óssea para a formação do arcabouço. Estes vasos também auxiliam no mecanismo de maturação das células Pré T, provenientes da medula óssea, sendo uma rede densa de ramificação de anastomosados de vasos sanguíneos (Kato *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2007).

1.1.3 MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T NO TIMO

A maturação dos linfócitos T no timo como revisto por Miller *et al.*, 2011, ocorre a partir da entrada das células progenitoras, oriundas da medula óssea no timo pela região cortico-medular, migrando para o córtex pela zona subcapsular durante os primeiros estágios, e retornando para a região cortico-medular e depois para a medula onde os timócitos atingem seu estágio mais maduro.

A função principal do timo é atuar como sítio de maturação de células T, sendo um órgão linfóide primário, que possui um microambiente ideal para o desenvolvimento de células provenientes da medula óssea, comprometidas com a linhagem T. Estas células que migraram e proliferaram no timo são submetidas ao processo de rearranjo de receptores de células T (TCR-T cell receptor) para diferenciarem em células T maduras e assim migrarem para a periferia (Miller *et al.*, 2011).

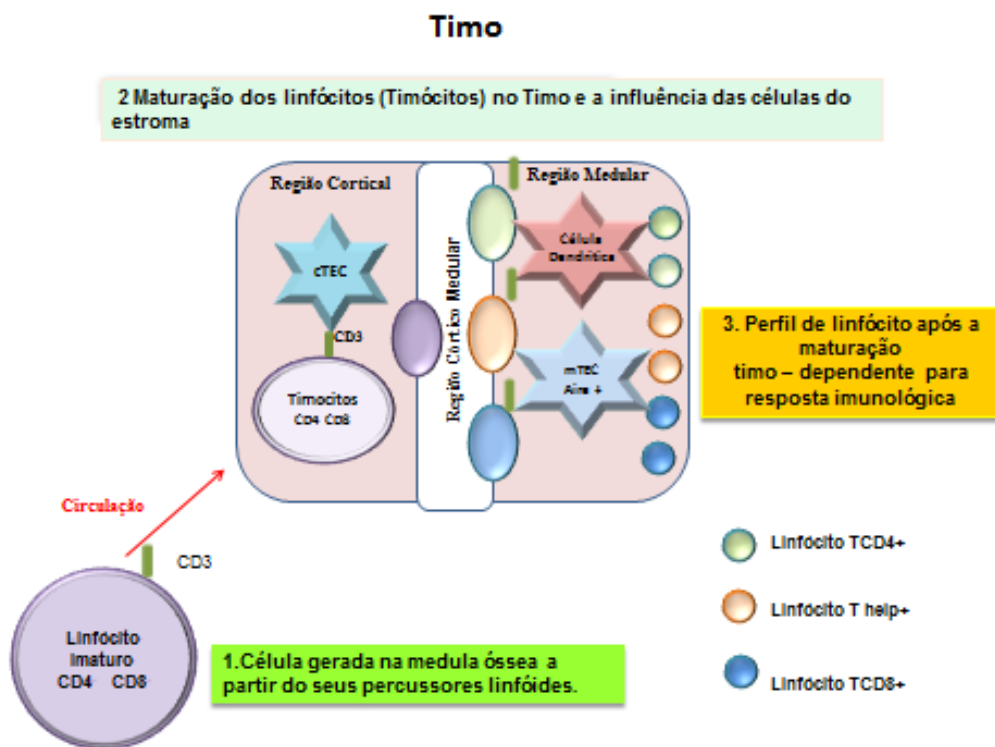


FIGURA 1. -ESQUEMA MATURAÇÃO DOS LINFÓCITOS T TIMO DEPENDENTES.

Elementos tímicos não linfóides como as células de epitélio tímico, desempenham um papel importante no desenvolvimento de linfócitos T, especialmente no desenvolvimento de reconhecimento de antígenos. O esquema representativo demonstra que: 1) após a ontogenia celular dos linfócitos T na medula óssea, estas células seguem na circulação como linfócitos imaturos até o timo, onde (2) ocorre a maturação timo-dependente, seguindo para o tecido pela zona subcapsular, onde ocorre a seleção positiva com os timócitos duplo negativos (DP). Estas células, (3) seguem no tecido para a região cortical, onde ocorre a seleção positiva, seguindo para a junção cortico-medular para dar início a seleção negativa de timócitos duplo negativos (DN) e, finalmente estas células migram para a medula tímica onde as células do epitélio tem expressão do *gene AIRE* ++, para concluir a seleção negativa. Desta forma, as células alo-reativas entram em apoptose, e as células eficientes que auxiliam as respostas imunológicas, migram do tecido tímico e retornaram para periferia (Dias A.S 2022).

1.1.4 DEPLETAÇÃO DO TECIDO TÍMICO

A engenharia de tecidos junto com a medicina regenerativa, atuam como ferramentas para reprodução do microambiente da matriz celular, a partir de tecidos após depleções. Técnicas de depletação vêm sendo aplicadas em diversos órgãos, a fim de diminuir a escassez para o transplante e contribuir para a substituição de animais em experimentos científicos (Tapias and Ott *et al.*, 2015; Zambon *et al.*, 2019). São técnicas

que, mantém as estruturas celulares tridimensionais do arcabouço tecidual e garantem a depletação celular do tecido, de maneira, que o arcabouço seja mantido a ponto de suportar a recolonização celular (Yan *et al.*, 2016).

Em um estudo de medicina regenerativa Market *et al.*, 2003, descrevem uma preparação de timo de doadores originados de timectomia, para transplante em síndrome de DiGeorge (SDG). Estes timos foram mantidos em cultura e após depleções parcialmente de timócitos e células leucocitárias. O protocolo utilizado foi através de sucessivas lavagens por gotejamento com meio de cultura durante 21 dias. O timo tratado foi posteriormente e transplantado em pacientes portadores de SDG, com sucesso (Dong *et al.*, 2010). Apesar desta técnica de lavagem não ter após depleção totalmente os timócitos, a ausência parcial dos linfócitos, foi o suficiente para que o enxerto do timo não apresentasse rejeição do implante no hospedeiro (Dong *et al.*, 2010).

Recentemente Yong Fan *et al.*, 2015, aplicaram uma técnica de depletação do timo de camundongo por meio de lavagens por agitação constante com detergentes iônicos (SDS ou Triton-X), eliminando assim um alto nível de células T.

1.2. SÍNDROME DE DIGEORGE (SDG)

A ausência total ou parcial do timo, pode ocorrer em doenças raras como a Síndrome de DiGeorge, uma síndrome de deleção 22q11.2, um transtorno de microdeleção comum que ocorre aproximadamente um em cada 1.000 fetos nascidos (McDonald-McGinn DM, 2015), e caracteriza-se pela ausência congênita de timo, hipoparatiroidismo e doença cardíaca congênita, descrita inicialmente por Dr. Angelo M. DiGeorge, em 1965. Esta desordem congênita é causada pelo defeito do desenvolvimento da terceira bolsa faríngea e do quarto arco faríngeo (Thomas *et al.*, 1987), como resultado, os defeitos são encontrados no timo, e por sua vez, podem produzir de leve a severa imunodeficiência pela produção insuficiente de células T (Jawad *et al.*, 2001).

A maioria dos pacientes com SDG possuem deleções monossômicas no braço longo do cromossomo 22, que pode representar uma variedade de fenótipos, incluindo a SDG e Síndrome Velocardiofacial (A de la Chapelle., 1981; Hacıhamdioglu *et al.*, 2015). A SDG parcial que atinge a maioria dos pacientes, possuem um timo pequeno permitindo a formação de um baixo número de células T, as quais têm funcionalidade normal (Pileri *et al.*, 2004). Estes pacientes, podem apresentar atividade tímica

avaliada pela co-expressão das moléculas CD45RA e CD62L em células T, com a presença do rearranjo de receptores TCR. Estes rearranjos formam círculos de excisão denominados TRECs (*T Cell Receptor Excision Circles*), em células T do sangue periférico, o que permite uma identificação dos linfócitos recém-emigrados do timo (Kong *et al.*, 1998).

Cerca de 1% dos pacientes com diagnóstico de SDG, podem apresentar ausência de timo funcional, o que caracteriza a forma completa da síndrome. Esta forma pode ser diagnosticada por meio de exames laboratoriais, pois exames físicos e de imagens podem não detectar a presença de uma pequena porção tímica do paciente na região do mediastino. A ausência de atividade tímica pode ser identificada no paciente que possuir menos de 50 linfócitos T virgens (nãive) (CD45RA+/CD62L+) por mm^3 de sangue periférico (valor normal $>1000/\text{mm}^3$) (Markert *et al.*, 2007). Alguns pacientes com SDG, não possuem quantidades detectáveis de células T, com menos que 100 TRECs/100.000 células T, o valor normal é 10.000 TRECs/100.000 linfócitos T (Markert *et al.*, 2003).

Embora reposição de imunoglobulinas e antibióticos como terapia profilática para *Pneumocystis spp* como reposição imunológica, seja atualmente o tratamento padrão em crianças que apresentam SDG completa, na maioria dos casos o comprometimento total da resposta imune resulta em mortalidade até os dois anos de idade (Markert *et al.*, 2003).

Essa síndrome também possui um fenótipo típico e outro atípico em pacientes com SDG completa, o primeiro é caracterizado por apresentar menos de 50 células linfócitos T $/\text{mm}^3$, sem *rash* cutâneo, e sem linfadenopatia atípica. Também é caracterizada por menos de 50 linfócitos T nãive $/\text{mm}^3$, *rash* associado com infiltração de células T na pele, linfadenopatia e circulação de células T oligoclonais. Acredita-se que a maioria das crianças portadoras de SDG completa, nascem com fenótipo típico, e em algum momento após o nascimento, adquirem o fenótipo atípico (Markerter *et al.*, 1999)

Também no fenótipo atípico, as células T no sangue periférico apresentam-se em 75% ou mais de oligoclonalidade representativa de clone único, falta da expressão do marcador de células T nãive CD45RA, expressão de receptor TCR $\alpha\beta$ e ausência de células T maternas. As células T oligoclonais podem ser CD4⁺ simples, CD8⁺ ou CD4⁻CD8⁻ (duplo negativo). Funcionalmente, essas células podem proliferar como reposta a

mitógenos, como a fitohemaglutinina, porém não são protetivas contra infecções oportunistas (Markert *et al.*, 2010).

1.2.1 APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DOS FRAGMENTOS TÍMICOS EM SÍNDROME DIGEORGE

O Ministério da Saúde na Organização de Doenças Raras definiu a Síndrome de DiGeorge (SDG) (portaria 199/2014 e Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) - Relatório nº 109), como uma das prioridades de conduta médica e terapêutica devido ao número significativo de óbitos em crianças portadoras dessa síndrome, que pode ser controlada através do sucesso no transplante de timo, como os enxertos de timo realizados por Louise Markert e seu grupo (Markert *et al.*, 1999; Markert *et al.*, 2003; Markert *et al.*, 2008a,b,c; Markert *et al.*, 2010), onde o enxerto de timo aumentou a sobrevivência destes pacientes.

1.2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO TÍMICO

A criopreservação utilizando meios crioprotetores, que incluem o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, além dos compostos como dextran-40, sacarose, hidroxietilamido), atuam sobre a viabilidade e funcionalidade de amostras de tecido e células humanas, submetidas ao congelamento em altas temperaturas. Shichkin *et al.*, 2017, avaliou o congelamento de fragmentos do tecido tímico sem a depleção das células leucocitárias e analisou a sua viabilidade e a expressão do CD326 (marcador de células epiteliais) em diferentes composições de meios crioprotetores, que incluíram componentes (DMSO, glicerol) penetrantes e não penetrantes (Dextran-40, sacarose, hidroxietilamido), definindo que o tecido mantido em baixa temperatura -196°C em nitrogênio líquido até 180 dias. O mesmo grupo de autores (Shichkin *et al.*, 2018), demonstraram um maior tempo de congelamento 360 dias com o mesmo protocolo de criopreservação, além da viabilidade e do fenótipo das células epiteliais (CD326) foram analisados os timócitos separados pelo protocolo de digestão enzimática, avaliando o perfil fenotípico dos mesmos durante o período de criopreservação do tecido. Seguindo essa mesma linha de raciocínio e com resultados de viabilidade satisfatórios de criopreservação do tecido tímico sem a depleção celular o autor Shichkin *et al.*, 2020, sugere a utilização desse material criopreservado para a expansão das células epiteliais tímicas, em novo protocolo de enxerto autólogo nos pacientes que necessitaram fazer a timectomia para a correção da cardiopatia congênita dessa criança.

2. JUSTIFICATIVA

O protocolo de descellularização dos timócitos nos fragmentos tímicos, como proposto por Market *et al.*, 2010, utilizado atualmente nos enxertos dos pacientes com Síndrome de DiGeorge completa, necessitam de incubações e lavagens dos mesmos por 21 dias, para a completa eliminação dos timócitos no tecido tímico. Desta forma, um banco de tecido, previamente depletados de timócitos e leucócitos, teria uma ampla aplicação no tratamento dos pacientes com SDG, devido à rápida disponibilidade destes fragmentos para o enxerto.

3. HIPÓTESE

Os tecidos tímicos após depletação de timócitos e da linhagem de células leucocitárias (linfócitos pré-T, timócitos, linfócitos B e células dendríticas) e criopreservação, podem ser usados para restabelecer a função dos linfócitos T no sistema imunológico dos pacientes com Síndrome de DiGeorge.

4. OBJETIVO

Estabelecer um protocolo de congelamento para o armazenamento de tecido tímico após depleção durante 21 dias, de células leucocitárias e timócitos, criopreservados em nitrogênio líquido à -196°C por 30 dias e um ano.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliação do tecido tímico criopreservado por 30 dias e um ano, após a depleção das células leucocitárias e timócitos, observando a preservação e viabilidade do epitélio presente no arcabouço tímico.

-Recolonização do tecido tímico criopreservado por um ano.

-Avaliação do fenótipo dos timócitos previamente separados na coleta do tecido tímico e após a recolonização no tecido após depleção e criopreservado por um ano.

5. CASUÍSTICA

Foram analisados neste estudo, 35 timos retirados de pacientes, independente do sexo, com idades até 9 meses. Os pacientes portadores de cardiopatia congênita e submetidos a timectomia cardiotorácica. Estes pacientes foram tratados do Centro Cirúrgico no Hospital do Coração. Associação do Sanatório Sírio (HCor) de São Paulo.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq), (CAAE: 88220318.9.0000.0065) Anexo1 e do Hospital do Coração /Associação do Sanatório Sírio (Hcor-) (CAAE 88220318.9.3001.0060.) Anexo 2.

Os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram assinados pelos pais ou responsável legal do paciente, submetido ao procedimento de timectomia.

5.1 CRITÉRIOS

-Critérios de inclusão para doadores de timo

- Os doadores de timo com idade entre um dia após o nascimento a 9 meses de idade e teste negativo para Citomegalovírus (soro e urina).
- Os tecidos tímicos com teste negativo para vírus Epstein Barr.

- Critérios de exclusão para doadores de timo

- A mãe biológica do doador com testes positivo para HIV 1 e 2, HTLV 1 e 2, Hepatites B e C, Sífilis, Doença de Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovírus.
- Crianças com Síndrome de Down,
- Crianças que possuem pais ou irmãos com histórico de doenças autoimunes, e que tenham histórico familiar de homozigose do cromossomo 22q11.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os fragmentos dos tecidos tímicos analisados foram identificados neste estudo como:

- Controle (CTRL): fragmentos sem depleção e sem congelamento.
- Fragmentos (TD): fragmento tímico após depleção de timócitos e células leucocitárias por 21 dias.
- Fragmento (TDC): fragmento tímico após depleção de timócitos e células hematológicas por 21 dias e criopreservados por 30 dias (TDC 30 dias) ou um ano (TDC 1 ano) em nitrogênio líquido a -196C e posteriormente descongelados.

6.1. PREPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS TÍMICOS PARA OS ENSAIOS

As preparações dos 35 fragmentos tímicos para os ensaios foram realizadas em 4 etapas, como descritos nos itens 6.1.1 à 6.1.4, em condições estéreis na cabine de

segurança biológica, seguindo o protocolo estabelecido por Markert *et al.*, 1997 e 2007(Figura 1).

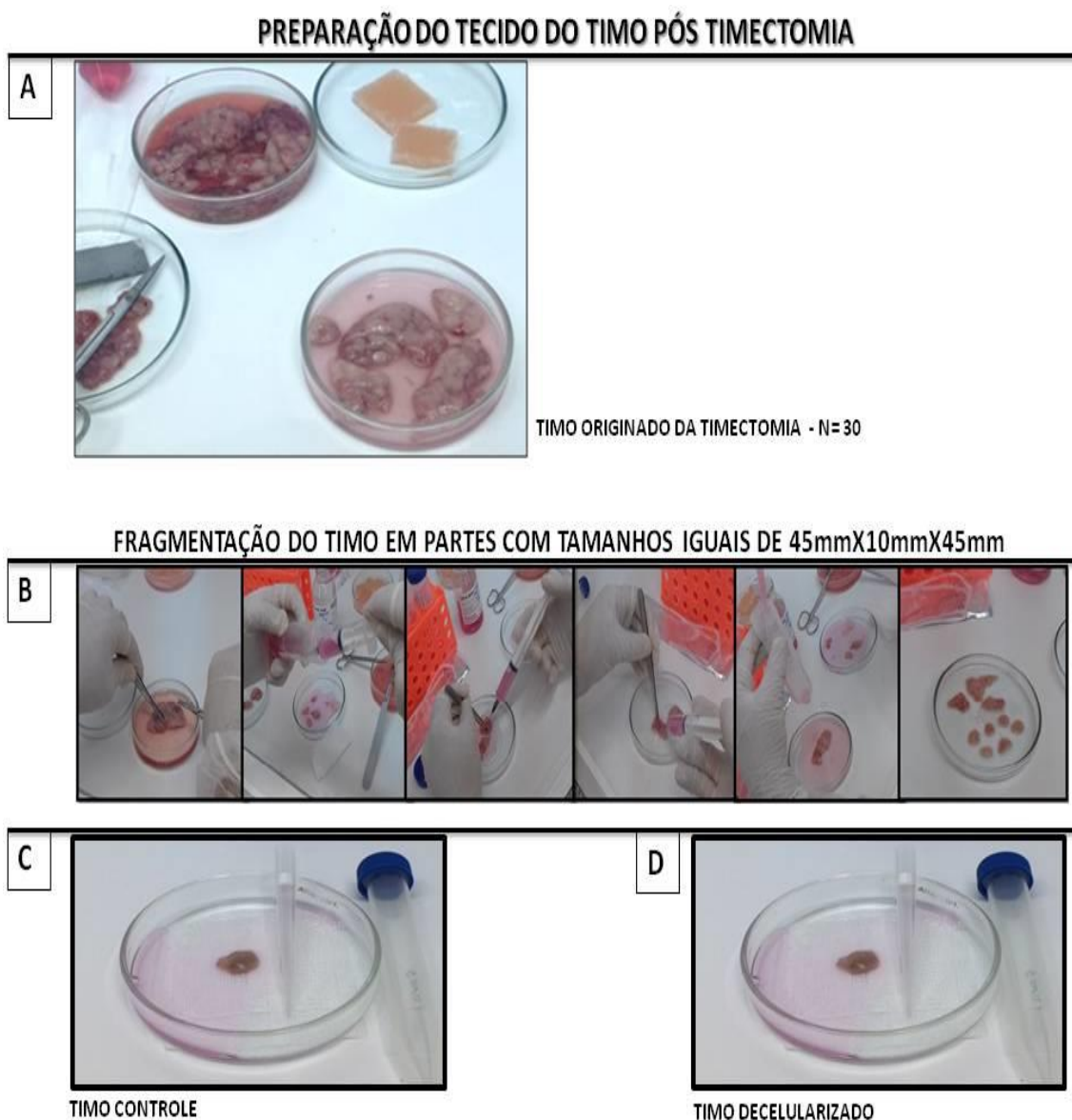


FIGURA 2 - PREPARAÇÃO DO TIMO PÓS-TIMECTOMIA

A) Lavagem do timo pós-timectomia com meio de cultura F12/Ham para remover coágulos e resíduos de tecidos. B) Etapas da fragmentação do timo em condição estéril em cabine de segurança biológica. C) e D) Separação dos fragmentos do timo em 2 partes iguais (fragmentos controles sem descelularizar e fragmentos de timo descelularizado). Os fragmentos serão mantidos em meio de cultura F12/Ham (Markert *et al.*, 2007) até o momento de uso.

6.1.1 ETAPA1- FRAGMENTAÇÃO DO TECIDO TÍMICO OBTIDO PÓS-TIMECTOMIA. SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS CONTROLES E DE ESTUDO

Após a timectomia, o timo foi lavado com meio de cultura F12 /Ham complexado com suplementos (Ham; Gibco, Grand Island, NY, USA.) suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), e os seguintes antibióticos 100µg/mL sulfato de estreptomicina (Gibco), 1µg/mL gentamicina (Gibco) e 100µg/mL do antifúngico Anfotericina B (Sigma-Aldrich), como descrito por Markert et al., 2007 e preparado em condições estéreis cabine de segurança biológica cada timo foi dividido em 15 fragmentos controles (CRTL) e 20 fragmentos usados para os ensaios. Estes fragmentos foram de 15 mm x 15mm x 15mm através do micrótomo manual Stadie Rigs-Tissue Slicer (Thomas Scientific©). Esses fragmentos foram utilizados como controle nos ensaios (timo 24 horas).

6.1.2 ETAPA 2- DEPLETAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE TIMO EM CULTURA

Os vinte fragmentos tímicos obtidos foram colocados em cultura para a depletação dos timócitos e linhagens de células hematológicas durante 21 dias, como descrito por Markert *et al.*, 1997. Estes fragmentos tímicos foram colocados sobre uma membrana polimérica em uma placa cultura contendo o meio de cultura meio de cultura F12 /Ham complexado com L- glutamina (Ham; Gibco, Grand Island, NY, USA.) suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1.34 mM deoxyguanosine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 25 mM HEPES (Gibco), 100µg/mL sulfato de estreptomicina (Gibco), 1µg/mL gentamicina (Gibco) e 100µg/mL do antifungicida Anfotericina B (*Sigma-Aldrich*). Os fragmentos foram cultivados em estufa com 0.5 % de CO₂ a 37°C, por 21 dias.

6.1.3 ETAPA 3- CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DOS FRAGMENTOS DE TIMO APÓS DEPLETAÇÃO

Os fragmentos em estudo (n=35) foram congelados com meio de congelamento contendo: F12 /Ham complexado com suplementos (Ham; Gibco, Grand Island, NY, USA.) suplementados com 5% de soro fetal bovino (Gibco), 5% de Dextran e 5% de

DMSO (dimetilsulfóxido) Sigma Aldrich. O congelamento foi realizado gradualmente (-20°C por 30 minutos, -80°C por 24 horas, armazenados em nitrogênio líquido -196°C). As amostras foram mantidas a -196°C durante diferentes períodos de 5, 10, 15 dias para padronização do meio criopreservante e estabelecido os tempos de 30 dias e um ano para a análise do protocolo.

Os fragmentos foram descongelados através da incubação por 48 horas em meio de descongelamento composto de: meio de cultura F12 /Ham complexado com L-glutamina (Ham; Gibco, Grand Island, NY, USA.) suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 25 mM HEPES (Gibco), 100µg/mL sulfato de estreptomicina (Gibco), 1µg/mL gentamicina (Gibco) e 100µg/mL do antifúngica anfotericina B (Sigma-Aldrich) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A troca de meio foi realizada a cada 24 h.

6.1.4 ETAPA 4- ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ESTRUTURA DO TECIDO TÍMICO POR COLORAÇÃO HEMATOXILINA/EOSINA

Os fragmentos coletados e fixados em formol a 10% foram incluídos em parafina sintética Histoplast ®- Shandon ®, seguindo a metodologia habitual. Após inclusão, as amostras foram submetidas a cortes de 3 µm de espessura num micrótomo automático Leica® RM 2255. Após secagem, as amostras foram desparafinados em xilol, hidratados numa série de álcoois com decrescentes concentrações, procedendo-se à coloração convencional com hematoxilina-eosina (HE), para posterior análise histopatológica. Os núcleos dos tímócitos e células hematológicas foram corados com hematoxilina (roxo) e o citoplasma com células epiteliais foram corados com eosina (vermelho ou rosa) realizadas no Laboratório da Patologia da Faculdade de Medicina de São Paulo- FMUSP.

As características estruturais normais do tecido tímico controle (sem depletação), e fragmentos após a depletação e sem congelamento, foram avaliados e comparados por 3 patologistas independentes.

A coloração de HE foi realizada nos tecidos, também após cada etapa de descongelamento e após a recolonização do timo descongelado com células hematológicas e tímócitos.

Os tímócitos utilizados para a recolonização do timo foram retirados do timo após depleção antes do congelamento e mantidos em nitrogênio líquido a -196°C.

6.1.5 AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO ARCABOUÇO TÍMICO E CÉLULAS ENDOTELIAIS DOS VASOS TÍMICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

O arcabouço tímico e as proteínas envolvidas no desenvolvimento e maturação do timo, assim como as células endoteliais dos vasos tímicos foram analisados através da técnica de imuno-histoquímica no Laboratório de Imuno-Histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP.

As amostras de timo antes e após a depleção e congelamento por 30 dias e 1 ano, foram analisados com os anticorpos primários descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de Anticorpos Policlonais para a técnica de imuno-histoquímica

Anticorpo	Expressão
CD34	Glicoproteína de adesão celular atua mediando a ligação célula tronco-células estromais e de vasos
CK-PAN	Proteína presente na membrana das células de epitélio
CD3 ζ	Sinalização de cadeia de pré-T e complexo do receptor de antígeno de timócitos e células T maduras
CD31	Glicoproteína IIa, é expressa em células T, células endoteliais. Pode mediar a adesão de células T.

Para imunomarcção dos cortes histológicos, foram utilizadas as técnicas de marcações estreptavidina biotina (Assis et al., 2005). As lâminas contendo secções histológicas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e soro albumina bovinas a 10% (p/v), em câmara úmida, a 37°C durante 30 e 15 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e de aderências inespecíficas, respectivamente. Os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida, a 37°C durante 40 minutos com o anticorpo primário. A seguir, as lâminas foram cobertas com anticorpo anti-IgG de coelho, biotilado (Thermo Scientific, Califórnia, USA), e incubados nas mesmas

condições de umidade e temperatura por 30 minutos. Após esse processo, as lâminas foram expostas a estreptavidina conjugada com peroxidase durante 30 minutos. Essas etapas foram intercaladas com três lavagens em PBS de cinco minutos cada.

Para revelação dos complexos imunes foram utilizados, o cromógeno 3,3 tetrahidrocloreto diaminobenzidina- DAB (Thermo Scientific, Califórnia, USA), o tempo de imunomarcção foram determinados pela avaliação visual da marcação das lâminas cobertas com metade da concentração de anticorpos padronizadas. Os cortes histológicos foram então contra corados com a corante hematoxilina por 20 segundos e visualizados ao microscópio de luz comum.

As determinações da sensibilidade dos anticorpos primários nos cortes histológicos das amostras foram utilizadas, com as seguintes diluições: 1:10, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000 e 1:8.000. Após as diluições selecionadas que permitiram a melhor imunomarcção dos antígenos.

O teste de reatividade negativa do anticorpo primário foi realizado substituindo-se a etapa de incubação do anticorpo primário pela incubação com tampão –fosfato salino (PBS).

Ao término da etapa de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (1X) e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário polivalente (Thermo Scientific, Califórnia, USA), por 10 minutos. As lavagens com tampão PBS (1X) foram realizadas por mais duas vezes, intercalando-se com a incubação com estreptoavidina peroxidase, (Thermo Scientific, Califórnia, USA), por 10 minutos e revelação com DAB (DAKO, EUA), 10 minutos. A seguir foi realizada a conta coloração de HE. As lâminas foram então lavadas em água ultrapura por 2 minutos, finalizando com o processo de desidratação. Esta etapa foi repetida, por 3 vezes com a série de diferentes concentrações de etanol (50%, 70% e 100%) (Merck, Darmstadt, Germany), e, xilol (Merck, Darmstadt, Germany).

6.2 DISSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS DO ESTROMA TÍMICO PARA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

O tecido foi macerado sobre um filtro **com 70µm de** diâmetro (*Cell Strainer*, BD Falcon, CA, EUA), para a remoção de agregados e restos de tecido não digeridos, com auxílio de um êmbolo de seringa estéril (10 mL). Após este processo, as células em suspensão foram tratadas com tampão de lavagem 1 (50mL de RPMI 1640 [*Gibco*]

/0,1mg/mL de colagenase A [Roche Applied Science] / 0,02mg/mL de DNase I [Roche Applied Science]) pré-aquecido a 37°C e centrifugadas a 540xg por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante obtido foi desprezado e o precipitado celular ressuspenso novamente com o tampão de lavagem 1, centrifugado a 540xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi lavado por duas vezes com tampão de lavagem 2 (PBS 1x pH 7.8 [Sigma Aldrich] /5mM EDTA [Sigma Aldrich] /0,02mg/mL DNase I [Roche Applied Science] / 5% SBF [Life Technologies]) e centrifugado a 540xg por 5 minutos a 4°C. Novamente, o precipitado foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 [Gibco] e ajustado para a concentração de $0,5 \times 10^6$ células/ mL. Após esta etapa, as células coletadas foram analisadas por citometria de fluxo.

6.3 AVALIAÇÃO DA DEPLETAÇÃO CELULAR NO EPITÉLIO TÍMICO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após a dissociação do tecido as células de linhagem leucocitária (CD45+) com concentração de $0,5 \times 10^6$ /mL foram marcadas com 1µL de anticorpo monoclonal anti-CD45 Alexa Fluor 700 (Bd Bioscience) e a marcação dos tímócitos (CD3+) com anticorpo monoclonal anti-CD3 PE-Texas Red (Bd Bioscience). As células foram lavadas 1X com tampão PBS e então incubadas com 200µL de tampão de marcação, com os respectivos anticorpos separadamente. As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de marcação, e ressuspenso em 200 µL de tampão de fixação paraformaldeído 1% e $0,5 \times 10^6$ células. Estas amostras foram adquiridas no citometro de fluxo BD FORTESSA LSR2 (BD Bioscience), e analisadas utilizando o software FlowJo 10.0.

6.4. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS cTEC E mTEC DO ESTROMA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para analisar as células cTEC e mTEC presentes no estroma tímico dos fragmentos controle, após depletação e antes / após o congelamento, foram utilizados o painel com os anticorpos para as populações celulares: para as células cTEC (CD45⁻, CD326⁺, HLA-DR⁺, CD249⁻, UEA-1^{hi}) e mTEC (CD45⁻, CD326⁺, HLA-DR⁺, CD249^{low}, UEA-1^{low}) (Tabela 2).

Para as marcações foram utilizados os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos anti-: CD326 APC, CD45 Alexa Fluor 700, CD249 PE, HLA-DR

Brilhan Violet 421 (*BD Bioscience*), e UEA-1 FITC biotilado (Vector Laboratories).

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na avaliação do epitélio tímico pelo método de citometria de fluxo

Anticorpo/Fluorocromo	Expressão
CD45 Alexa Fluor 700	Células de linhagem leucocitária
CD249 PE	Glicoproteína de marcação de células do epitélio tímico.
UEA-1 FITC	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária, proteína envolvida na transmigração de leucócitos, angiogênese
HLA-DR Brilhan Violet 421	MHC-II nas células apresentadoras de antígeno, células T ativadas e células epiteliais tímicas.
CD326 APC	Células epiteliais tímicas e do corpúsculo de Hassal.

As células foram lavadas com 1X PBS e preparadas como análise como descrito acima no item 6.3.0.

6.4.1. RECOLONIZAÇÃO DO TECIDO TÍMICO

As amostras de tecido tímico criopreservados após a depleção das células leucocitárias e tímócitos foram recolonizadas com 1×10^6 células /mL, 2×10^6 células / mL e 3×10^6 células / mL retiradas de um fragmento do tecido tímico antes da depleção celular, a técnica desenvolvida para a recolonização do tecido tímico depletado e criopreservado foi desenvolvida durante a presente dissertação, no Laboratório de Investigação Médica LIM 36 do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -FMUSP.

Para a dissociação das células do tecido tímico, utilizou-se o seguinte protocolo com digestão enzimática descrito no item 6.2.0 e posteriormente passado em solução de Ficoll-Paque com densidade 1.077 (Cytiva- Suécia AB) na proporção do volume de 1:3

de células / Ficoll-Paque. A seguir, a amostra foi centrifugada a 2700 RPM em 30 minutos, o precipitado de células mononucleares foi lavado com meio de cultura suplementado (F-12 DEMEN Gibco com 5% de SFB) em um volume de 10mL por 1500 RPM em 10 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes. O precipitado de células foi ressuspensão em 2 mL de meio de cultura suplementado, e uma concentração de 1×10^6 /mL foram utilizados para infusão e imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo para determinação da população celular de timócitos.

A recolonização do fragmento tímico, foi realizado sobre malha sintética em uma placa de cultura de 6 poços, e 1×10^6 timócitos/mL foram injetados via intratímica em distribuídos entre 5 campos diferentes dos lobos direito e esquerdo. O fragmento recolonizado foi mantido 10 dias em estufa de com 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período o tecido foi dissociado por digestão enzimática (item 6.2.0), lavadas e posteriormente marcadas com anticorpos monoclonais para a determinação da maturação e fenótipo das células após a recolonização.

6.4.2. AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DOS TIMÓCITOS RECOLONIZADOS NO TECIDO TIMICO APÓS DEPLEÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO POR 1 ANO

Para avaliar a eficiência da recolonização, os timócitos antes e após a recolonização no estroma tímico dos fragmentos TDC 1 ano, foram utilizados o painel com os anticorpos para identificação das subpopulações de timócitos/linfócitos: timócitos/linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+), timócitos/linfócitos T citotóxicos (CD3+, CD8+) timócitos /linfócitos T duplo positivos (CD3+, CD4+, CD8+) e timócitos /linfócitos T duplo negativos (CD3+, CD4-, CD8-).

Para as marcações foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-: CD3 *PE-CF594*, CD4 *Brilhant Violet 421*, CD8 *APC-H7 (BD Bioscience)*, e (Tabela 3).

Tabela 3: Anticorpos monoclonais utilizados para marcação dos timócitos recolonizados no tecido após a depleção e criopreservação avaliadas pelo método de citometria de fluxo.

Anticorpo/Fluorocromo	Expressão
CD3 CF594	Linfócitos T e Timócitos
CD4 Brillant Violet 421	Linfócitos T e Timócitos auxiliares
CD8 APC-H7	Linfócitos T e Timócitos citotóxicos

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade foi aplicado aos dados coletados e a análise paramétrica e não paramétrica, utilizando (Teste t Student) ou o (teste de comparação múltipla de Newman-Keuls). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Os cálculos foram realizados com o pacote estatístico do software GraphPad Prisma.9.3.4.

8. RESULTADOS

8.1. AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO CELULAR COM OS MARCADORES CD45 E CD3 NO TECIDO TÍMICO

A avaliação da completa depleção de células leucocitárias e timócitos do tecido tímico utilizando o protocolo de Market *et al.*, 1999, foi realizada no controle e TD, através da expressão dos marcadores células da linhagem leucocitárias (CD45) e timócitos (CD3) (Figura 3A e 3D), como descrito em materiais e métodos. Os resultados da análise da população celular (CD45+) demonstrou a presença de aproximadamente 96,2% de células leucocitárias no controle. E após 21 dias de depleção do tecido tímico, o estroma tímico apresentou diminuição significativa de células leucocitárias da população fenotípica com 1,80% de células CD45+ em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 3B).

Em relação a população específica de timócitos (CD3 +), foi possível observar no controle, a presença de 62% de timócito (CD3+), enquanto que, o tecido tímico após depleção por 21 dias, apresentou uma redução significativa desta população para 0,31% de CD3 + ($p \leq 0,05$) (Figura3D). Estes resultados sugerem os tecidos após depleções neste estudo estão após depleções de células leucocitárias e os timócitos, permitindo que este tecido possa ser utilizado para futuros enxertos.

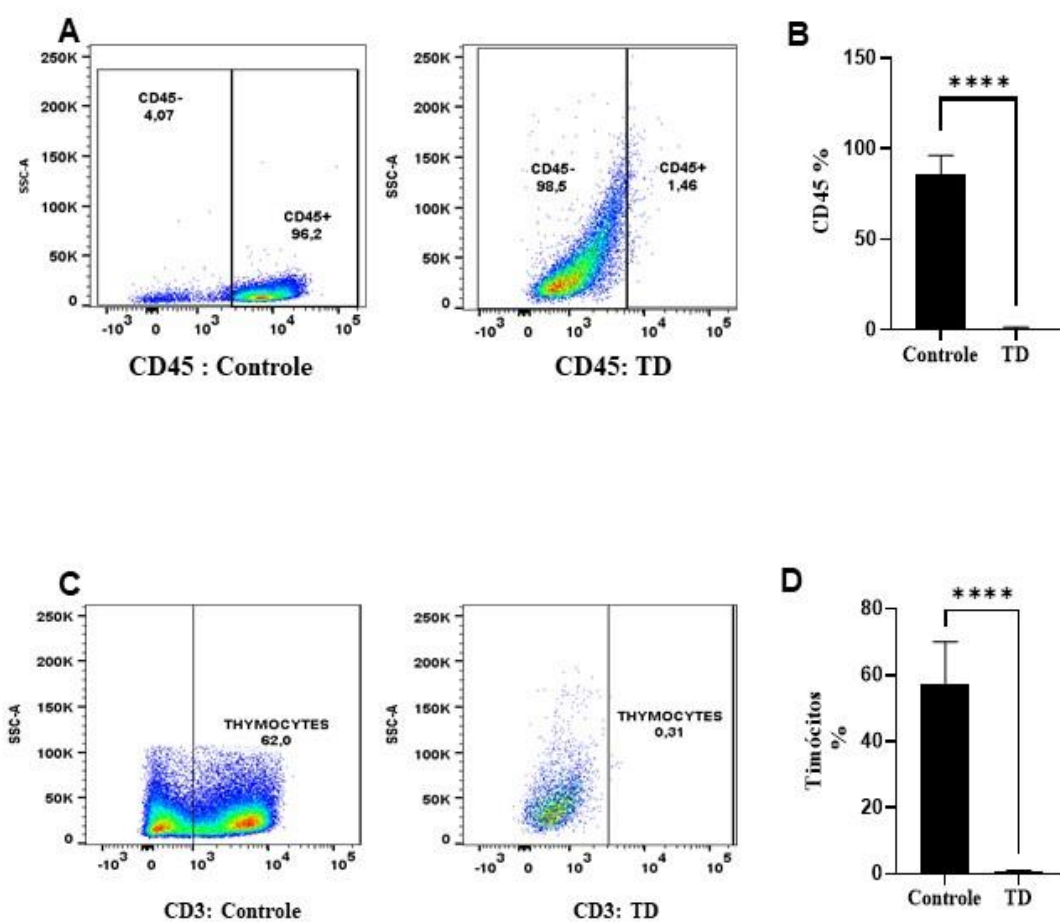


FIGURA 3- AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE CD45 E CD3 DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS E TIMÓCITOS NOS TECIDOS TÍMICO APÓS DEPLEÇÃO POR 21 DIAS

A e C)- Dot-plot da estratégia de análise das células de linhagem leucocitária (CD45 +) e thymocytes (CD3 +), respectivamente. Os valores relativos (%) de cada população de

células foram quantificados por citometria de fluxo. B e D). Os valores relativos das populações de CD45 + e CD3 + de tecido do timo de 21 dias após depleção (TD) em comparação com tecido tímico (controle), respectivamente. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Student não pareado bicaudal, os gráficos mostram a média +/- erro padrão, **** p <0,001. Foram analisadas 15 amostras do controle e 15 amostras do tecido tímico após depleção.

8.2 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO TECIDO TÍMICO ANTES, APÓS A DEPLEÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO POR 30 DIAS E 1 ANO

A integridade do epitélio tímico nas amostras CTRL, TD e TDC 30 dias e TDC 1 ano foram avaliados por análise histológica na coloração de hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica (CKPan, CD34 e CD 31) (Fig.4 e 5). Análise histológica com fragmentos do timo CTRL mostrou córtex tímico basofílicos densamente compactado devido a presença de timócitos pequenos e imaturos, medula mais eosinofílica levemente corada devido ao menor número de timócitos. Presença de corpúsculos de Hassall típicos eosinofílicos.

Os fragmentos TD e TDC 30 dias e TDC 1 ano corados com HE, apresentaram células epiteliais do córtex e da medula íntegras e eosinofílicas, com alguns núcleos apoptóticos devido a morte celular ou degradados durante 21 dias de cultivo ou óbito e seus núcleos dissolvidos. Além do corpúsculo de Hassall bem definido e eosinofílico (Figura 4A).

As células epiteliais mTEC, as células epiteliais cTEC e os corpúsculos de Hassall, também foram analisados com o anticorpo citoqueratina (CKPan) (Figura 4B) e as células endoteliais que constituem os vasos tímicos foram marcadas com CD31 e CD34 (Figura 5A-B).A marcação de CD31 é mais característica em células endoteliais de região medular do tecido tímico como descrito por Kieran D. James *et al.*, 2021 e a marcação de CD34 é mais característica em microvasos em todas regiões do tecido tímico e também caracterizado por evidenciar a angiogênese no tecido.

Os resultados observados nas amostras TD e TDC 30 dias e TDC 1 ano comparados com o controle e coradas com HE, assim como marcadas por imunohistoquímica com CKPan, CD31 e CD34, mostraram a integridade das células epiteliais no córtex e estroma medular, bem como nas células que formam os corpúsculos de Hassall, sugerindo que o protocolo de criopreservação estabelecido neste estudo, permite a manutenção da estrutura do arcabouço tímico após longo período de congelamento e descongelamento. Estes resultados também demonstraram a integridade

das células endoteliais que constituem os vasos tímicos, e desta maneira, estes vasos permitirão uma nova vascularização e recolonização das células T imaturas que necessitem da maturação timo dependente.

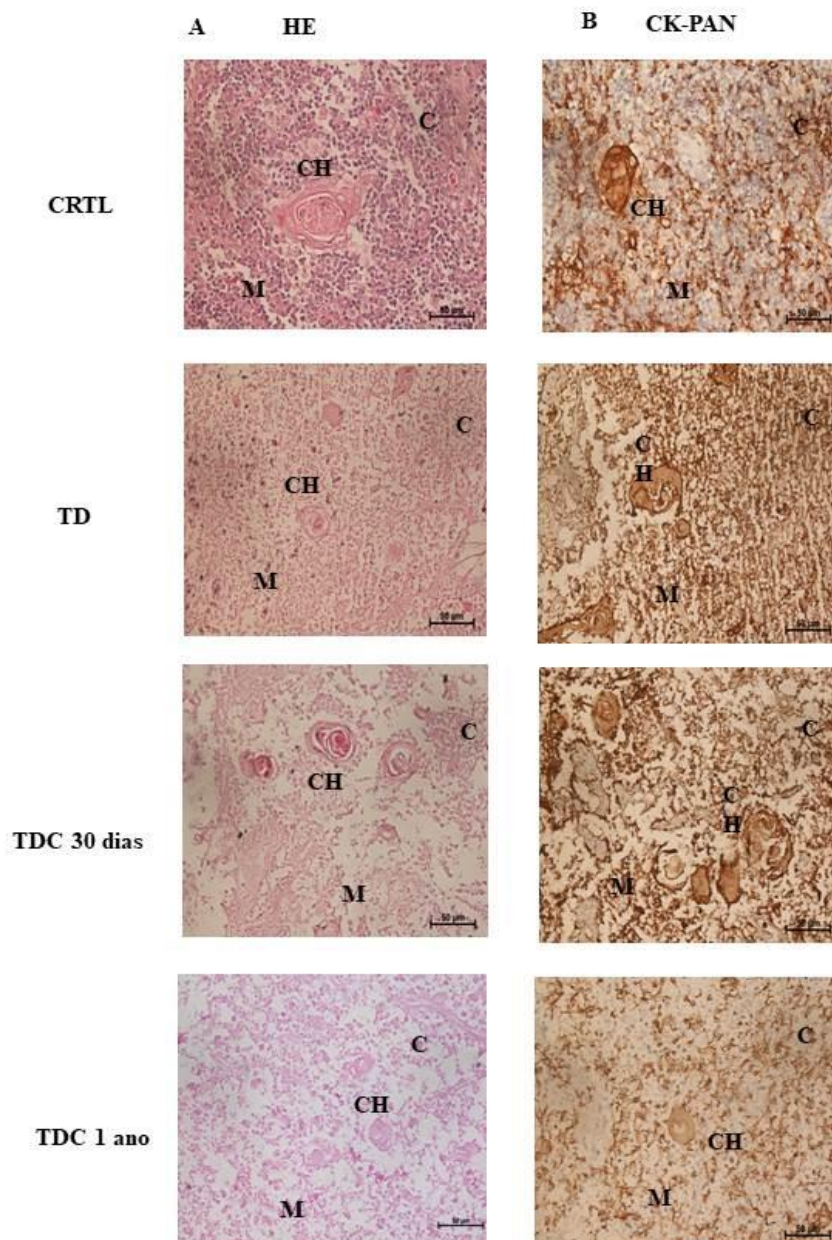


FIGURA 4-HISTOPATOLOGIA DO TECIDO TÍMICO DURANTE O PROCESSO DE DEPLETAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS FRAGMENTOS TÍMICOS CORADOS POR

HEMATOXILINA E EOSINA (HE) E IMUNO-HISTOQUÍMICA COM OS MARCADORES PAN-CITOQUERATINA (CKPAN).

As análises histológicas (HE) mostram fragmentos tímicos controle (CTRL), TD (fragmento tímico com células leucocitárias e células de timócitos depletadas após 21 dias), e TDC 30 dias e TDC 1 ano (fragmentos tímicos com células leucocitárias e células de timócitos depletadas após 21 dias e criopreservados e descongelados por 30 dias e 1ano, respectivamente) com as arquitetura típicas do timo constituídas pelo córtex tímico com timócitos basofílicos e medula tímica e corpúsculo de Hassall com marcação eosinofílica (Fig. 4A). C: denota o córtex, M: denota a medula, CH: denota os corpúsculos de Hassall. A imuno-histoquímica com o marcador CKPan. A marcação com CKPan mostrou a integridade das células epiteliais que constituem o estroma tímico (Fig.4B). Barra de escala: 50 μ m. Ampliação de 40 \times . As figuras são representativas de 35 experimentos independentes, com cada timo examinado em três seções.

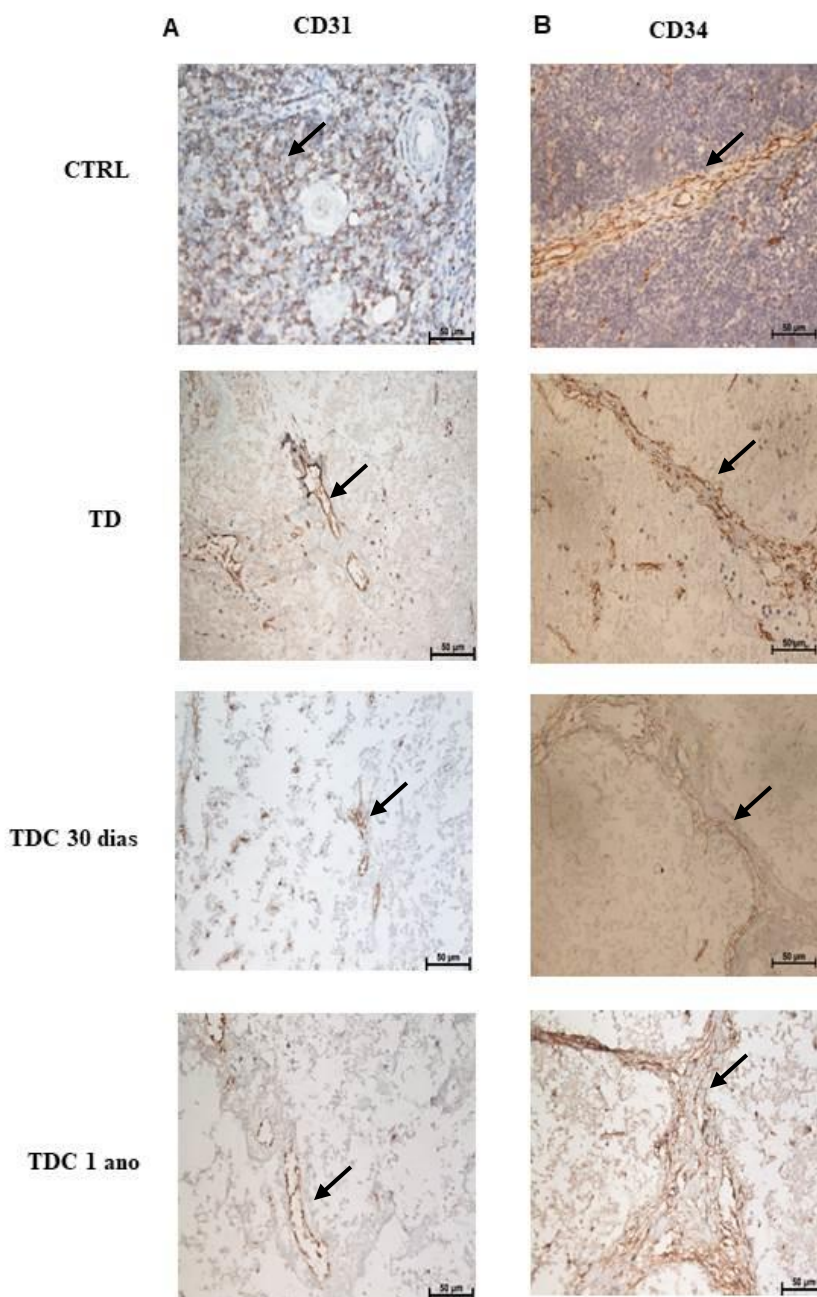


Figura 5-HISTOPATOLOGIA DO TECIDO TÍMICO DURANTE O PROCESSO DE DEPLETAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO. ANÁLISE DOS FRAGMENTOS TÍMICOS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA COM OS MARCADORES CD31 E CD34. As análises por imuno-histoquímica mostram fragmentos tímicos controle (CTRL), TD (fragmento tímico com células leucocitárias e células de timócitos depletadas após 21 dias), e TDC 30 dias e TDC 1 ano (fragmentos tímicos com células leucocitárias e células de timócitos depletadas após 21 dias e criopreservados e descongelados por 30 dias e 1 ano, respectivamente) com CD31 e CD34. A marcação com anti-CD31 e anti-CD 34, mostrou a estrutura das células do endotélio que constituem os vasos tímicos (seta). Barra de escala: 50 μ m. Ampliação de 40 \times . As

figuras são representativas de 35 experimentos independentes, com cada timo examinado em três seções.

8.3- ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO TECIDO TÍMICO TD, TDC 30 DIAS E TDC 1 ANO

O efeito da depleção de células leucocitárias e timócitos e do tempo de armazenamento na viabilidade das células epiteliais tímicas foram analisados imediatamente após o descongelamento com três marcadores diferentes: Coloração de Visibilidade Fixa (FVS) (BD Bioscience), Kit de Detecção Anexina-V-PE (BD Bioscience) para verificar as vias de morte celular por apoptose e 7-AAD (BD Bioscience), usados para avaliar as vias de necrose celular. Os gráficos são representativos das análises de citometria de fluxo controle, tecido do timo após depleção por 21 dias e tecido do timo após depleção por 21 dias / criopreservado por 30 dias e 1 ano descongelado (Figura 6 A).

A viabilidade das células epiteliais do timo usando FVS foi mantida em 91,4% no controle, 90,4% no tecido do timo TD, 86%. A expressão da Anexina-V mostrou 91,5% de viabilidade das células epiteliais do timo no controle, 89,5% no fragmento TD e 85%. A viabilidade celular avaliada por 7-AAD mostrou 91,5% no controle, 89,5% no fragmento TD e 85% nos fragmentos TDC 30 dias E TDC 1 ano, respectivamente (Figura 6 B-D). Os resultados mostraram que a viabilidade das células epiteliais do timo TD , TDC 30 dias E TDC 1 ano, não foram afetadas durante o período de depleção ou armazenamento a -196°C . Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao controle ($p \geq 0,05$). Desta forma, é possível observar que a solução criopreservante proposta neste estudo (5% Dextran FP 40, 5% Me₂SO, 5% SFB), mantém a viabilidade celular das células do epitélio tímico, durante o congelamento a -196°C e impede o rompimento celular durante o processo de descongelamento.

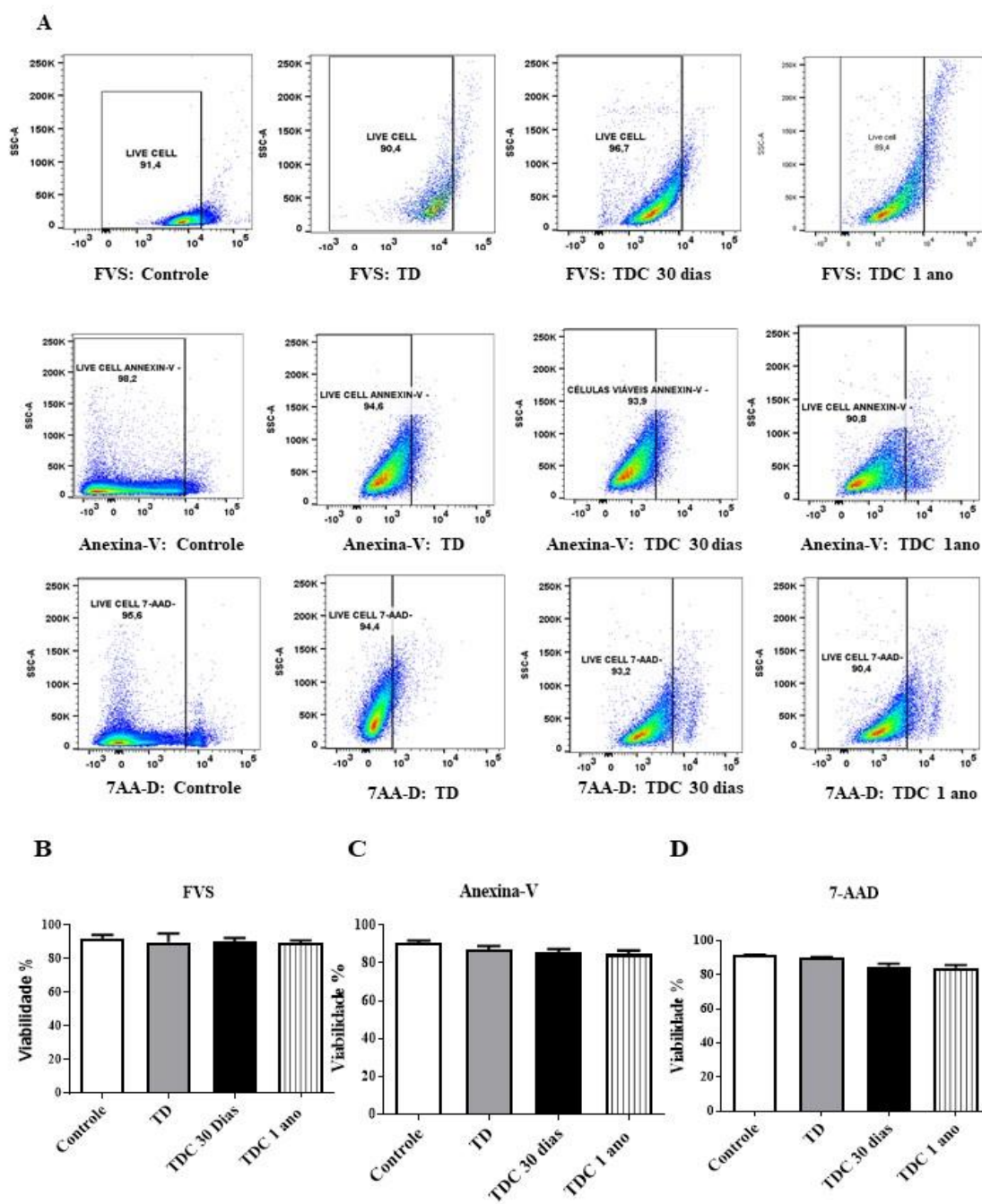


FIGURA 6-ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO TECIDO TÍMICO TD, TDC 30 DIAS E TDC 1 ANO.

A) Gráficos de dot plot representativos da viabilidade do tecido timo, mostram no *gate* de LIVE CELL de cada marcador: células do tecido tímico a fresco, usado como controle (CTRL), células tímicas após 21 dias de depleção de células timócitos e células leucocitárias (TD), células TD criopreservadas por 30 dias (TDC 30 dias) e células TD criopreservadas por 1 ano (TDC 1 ano). (B-D) A porcentagem das populações de FVS, 7-AAD e Anexina-V, analisados pelo método estatístico de múltiplas comparações de Newman-Keuls, são apresentados. Não houve diferença estatística nas marcações de FVS, 7AAD e Anexina-V, entre os grupos em comparação com os controles ($p > 0,05$).

Os dados mostram a média \pm SE para 15 amostras de células tímicas frescas não depletadas (controle), 15 amostras de células tímicas depletadas por 21 dias (TD) e 15 amostras de células tímicas depletadas e criopreservadas por 30 dias (TDC 30 dias) e 1 ano ((TDC 1 ano) descongeladas).

8.4 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS cTEC E mTEC NOS FRAGMENTOS TDC 30 DIAS E TDC 1 ANO

Para a identificação de populações de células epiteliais nas amostras originadas dos fragmentos TD e TDC 30 dias e TDC 1 ano, foi utilizado painel fenotípico com estratégias de análise, como descrito em material e métodos (Figura 7A), sendo que para a determinação das células mTEC foi avaliada a expressão da dupla marcação UEA-1 + / CD249^{hi}, e para células cTEC UEA-1 + / CD249^{low}, como mostrado na (Figura 7B).

A população de mTEC, expressando UEA-1+ / CD249^{hi} foi observada em 20,2% nas amostras TD, nas amostras 19,4% TDC 30 dias e 16,8%TDC 1 Ano (Figura 7B). A expressão da população cTEC UEA-1+ / CD249^{low}, foi encontrado em 70,6% da população TD, 71,4% da população TDC 30 dias e 69,6% da população em TDC 1 ano. A fenotipagem das células de epitélio tímico mTEC e cTEC não apresentaram diferença estatística $p < 0,05$ durante o protocolo (Figuras 7C e 7D).

Durante o período de cultura tímica das células dos fragmentos TD, houve um aumento na proporção de células epiteliais (TECs). O aumento observado nas populações do epitélio tímico é devido a depleção das células leucocitárias e tímócitos, tornando mais visível esta população (Figura 7B). Os resultados sugerem ainda que a população de células epiteliais nas regiões cortical e medular não foram afetadas pelo congelamento durante 30 dias e 1 ano.

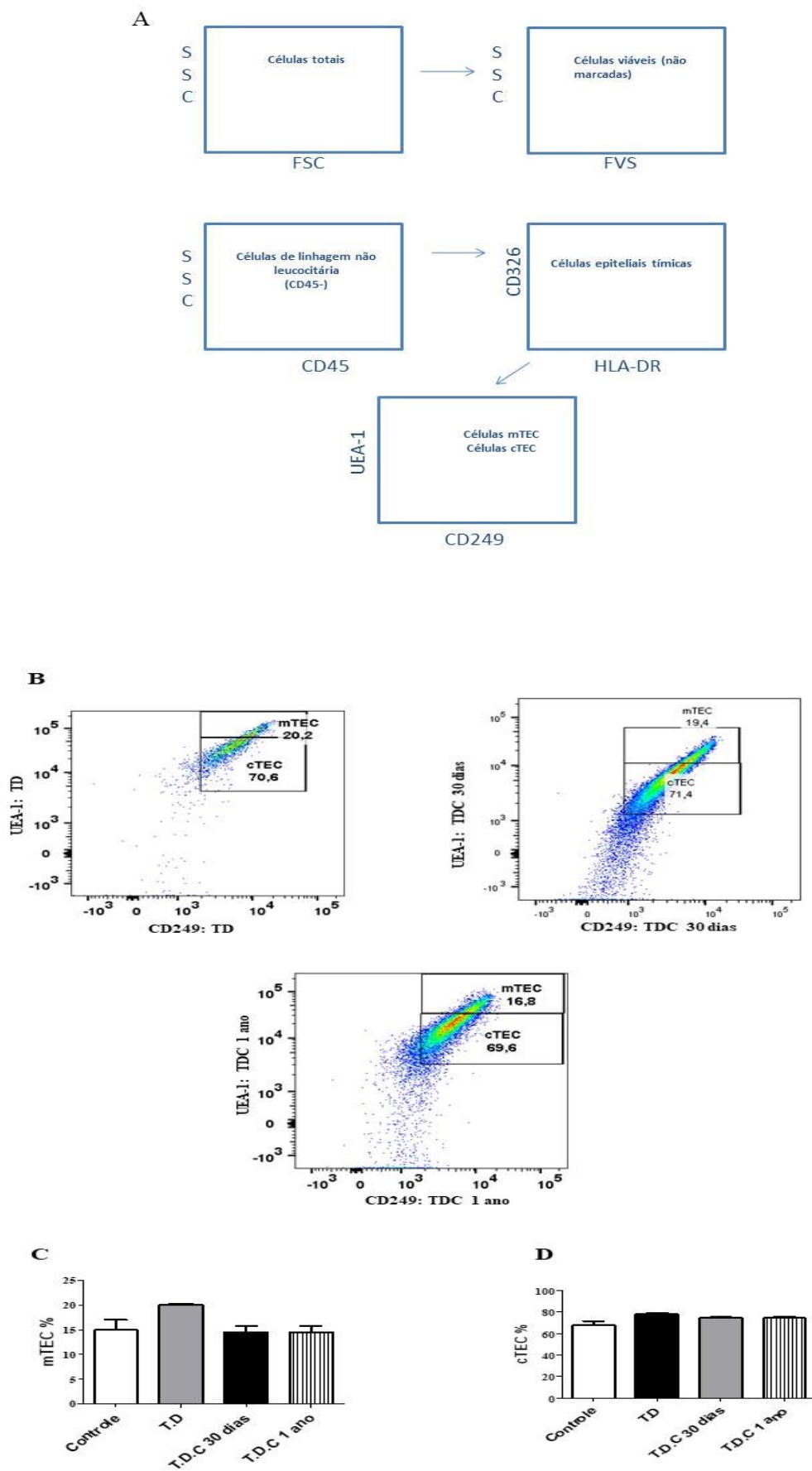


FIGURA 7- AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS CTEC E MTEC NOS FRAGMENTOS TDC 30 DIAS E TDC 1 ANO. Amostras do timo sem depleção de células tímicas (controle), TDC 30 dias e TDC 1 ano foram dissociados como descrito em materiais e métodos. A análise foi realizada com células $0,5 \times 10^6$ usando a técnica de citometria de fluxo. A) Gráficos em dot-plot representativos da população de células epiteliais tímicas com análise fenotípica de células epiteliais tímicas medulares (mTec) (UEA-1 + / CD249 +, +^{hi}) e células epiteliais tímicas corticais (cTec) (UEA-1 + / CD249 +^{low}). A frequência de células em porcentagem em cada gráfico está indicada. B-C). A frequência das populações mTEC e cTEC foi demonstrada em células tímicas TD, TDC 30 dias e TDC 1 ano, comparados com o controle. Os dados mostrados são os valores relativos (%) observados na citometria de fluxo. Os gráficos de barras representam a média + SEM 10 amostras, determinado por ANOVA de dois fatores seguido pelo teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Não há diferenças significativas entre os grupos de dados ($p > 0,05$). Os dados foram agrupados a partir de mais de três experimentos independentes.

8.5 AVALIAÇÃO DA RECOLONIZAÇÃO DO TECIDO TÍMICO CRIOPRESERVADO POR 30 DIAS E 1 ANO COM TIMÓCITOS/LINFÓCITOS (CD3)

Para avaliar o potencial funcional dos fragmentos de timo criopreservados, 15 fragmentos de timo TDC 1 ano foram recolonizados com 3×10^6 injeções intratímicas de 3×10^6 timócitos CD3+ por mL, distribuídos nos lobos tímicos direito e esquerdo e analisados através de ensaio de imuno-histoquímica utilizando a marcação com anticorpo anti-CD3 (Figura 8A). A viabilidade dos timócitos foi analisada através da coloração de 7-AAD e citometria de fluxo. Esta análise foi realizada em células de timócitos, antes da recolonização (controle) e após 10 dias de cultura de timócitos em TDC 1 ano (denominado de TR) (Figura 8B).

A marcação do anticorpo anti-CD3 confirmou a presença de células T nas amostras de TDC 1 ano após 10 dias de cultura (TRCD3+) (Figura 8B), sugerindo que, o estroma tímico do fragmento de timo após depleção de timócitos e congelados e descongelados após 1 anos, continua a manter a capacidade de proliferação e maturação funcional dos linfócitos T.

A frequência de timócitos CD4 e CD8 nas amostras de um ano de TDC foi avaliada antes e após a recolonização. A frequência dos estágios de timócitos antes da recolonização foi: CD4+ 26,4%, CD8+ 10,2%, timócitos duplo-positivos (DP) 59,6% e timócitos duplo-negativos (DN) 3,84% (Figura 8B). Entretanto, no décimo dia da

recolonização, a frequência foi: CD4+ 29,8%, CD8+ 14,2%, DP 53,0% e DN 3,05% (Figura.8B). Esses resultados mostraram um aumento na frequência de timócitos/linfócitos maduros CD4+ e CD8+ e diminuição no perfil de células imaturas. Assim, além da expressão de moléculas de CD4 e CD8 na superfície dos timócitos, foi possível também observar, a seleção positiva dos timócitos, que entraram em contato com MHC (complexo de histocompatibilidade principal) próprios, apresentados pelas células epiteliais do estroma tímico.

Desta maneira, é possível sugerir que o protocolo com a solução criopreservante (5% Dextran FP 40, 5% Me2SO, 5% SFB), mantém a viabilidade celular das células do epitélio tímico e não afeta a capacidade funcional do timo, podendo ser utilizado na construção de um biobanco de timo.

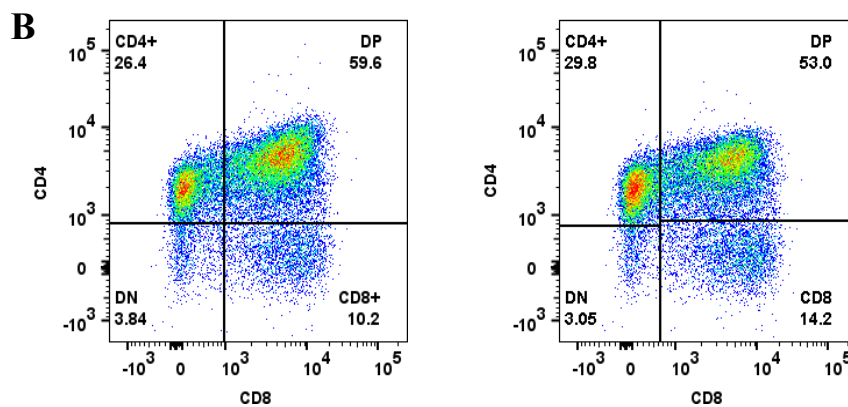
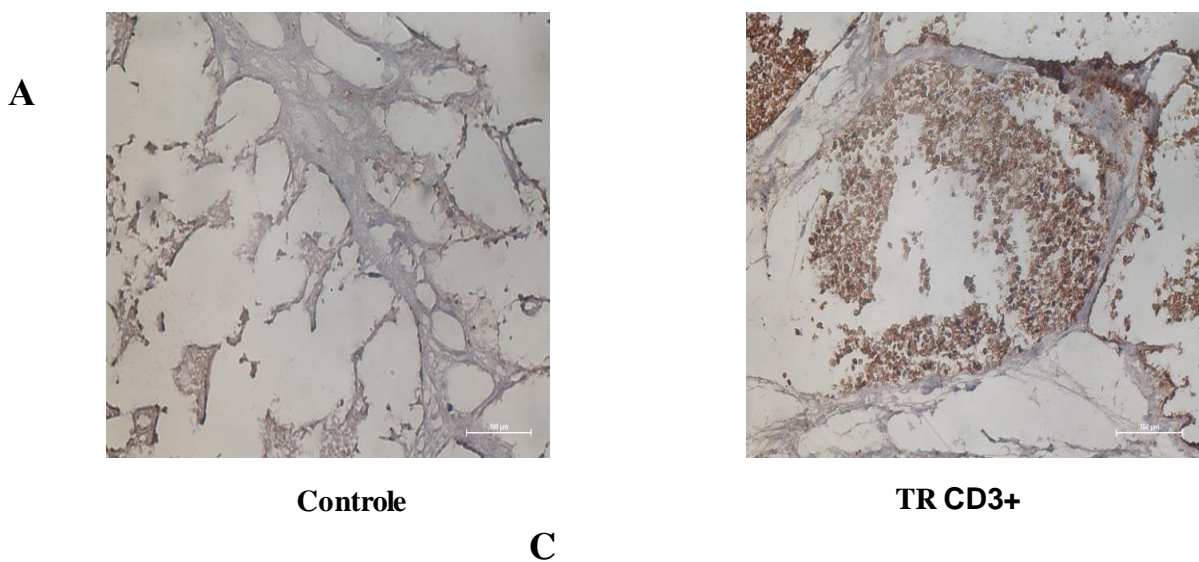


FIGURA 8-RECOLONIZAÇÃO TÍMICA DO FRAGMENTO TDC 1 ANO.

Recolonização tímica por injeção intratímica de 3×10^6 timócitos nos lobos tímicos direito e esquerdo de fragmentos TDC 1 ano e incubados com meio suplementado por 10 dias a 37°C com 5% de CO_2 , como descrito em material e métodos. A) Fragmentos TDC 1 ano marcado com anti-CD3 sem a injeção intratímica de 3×10^6 timócitos de (CRTL) e Fragmentos TDC 1 ano marcado com anti-CD3 após a injeção intratímica de 3×10^6 timócitos (TRCD3+). A presença de timócitos marcados com CD3+ são indicados por seta. Barras de escala: 50 μm . B-C) Análise por citometria de fluxo de timócitos de populações CD4+, CD8+, PD (CD4+CD8+) e DN (CD4-CD8-) coradas com 7-AAD. B) Células de timócitos antes e (C) células de timócitos após (TR) recolonização do tecido do timo. A porcentagem de células CD3+, CD4+, CD8+, PD (CD4+CD8+) e DN (CD4-CD8-) são indicadas.

9. DISCUSSÃO

Estudos realizados por Davies et al., (2017) e Market et al., (2018), demonstraram uma sobrevida dos pacientes com Síndrome DiGeorge completa após o enxerto do timo. Durante um período de acompanhamento de 12 meses, 7 dos 10 pacientes transplantados com enxerto tímico sobreviveram (Davies et al., 2017). Esta sobrevida apresentou uma resposta imunológica boa em 72% pacientes estudados em 4 anos (Markert et al., 2018. CIS- Clinical Immunology Society).

Entretanto, o protocolo de depletação dos timócitos dos fragmentos tímicos, como proposto por Market et al., 2010, utilizados atualmente nos enxertos dos pacientes com Síndrome de DiGeorge completa, necessitam previamente da completa eliminação dos timócitos dos fragmentos tímicos que serão utilizados para os enxertos, imediatamente após esta preparação. Para tanto, a preparação destes fragmentos, necessita de uma incubação e repetidas lavagens com meio de cultura específico durante 21 dias. Desta forma, um biobanco com tecido tímico previamente após depleção, teria uma ampla aplicação no tratamento dos pacientes com Síndrome de DiGeorge, e pacientes que tenham dificuldades de maturação de células T levando a inúmeras infecções como os pacientes com Imunodeficiência Primária devido a rápida disponibilidade destes fragmentos, que já estariam prontos para o enxerto. Para a construção do biobanco também é primordial, a manutenção dos fragmentos criopreservados por um longo período. Os protocolos atuais de criopreservação do tecido tímico são de apenas 30 dias e utilizam o fragmento sem a depleção das células leucocitárias (Shichkin et al., 2018, Ross et al., 2018), o que não evidenciaria o uso desse fragmento sem a depleção pois as células alo-reativas timócitos/ linfócitos T se fazendo presentes aumentariam a chance de uma possível doença enxerto/ hospedeiro. Assim uma possível rejeição do tecido é um fator crucial para a não realização do transplante do fragmento tímico.

No presente estudo, foram utilizados 35 tecidos tímicos, deletados por 21 dias. Como observado, houve uma diminuição nestes tecidos das populações leucocitárias (CD45+) e principalmente dos timócitos/linfócitos (CD3+). A ausência dessas células leucocitárias e timócitos no tecido tímico é muito importante para que, o tecido possa ser utilizado futuramente em transplante, diminuindo a rejeição do enxerto e não provocando complicações ligadas ao efeito de reconhecimento das células do sistema imunológico do paciente (rejeição enxerto/hospedeiro). Como estabelecido neste

trabalho, os fragmentos foram criopreservados com a solução de criopreservação composta de 5% Dextran FP 40, 5% Me2SO, 5% SFB e mantidos em nitrogênio líquido a -196°C por 30 dias e 1 ano. Os resultados demonstraram que a solução de criopreservação proposta, manteve *in vitro*, as células epiteliais medulares e células epiteliais corticais viáveis por longo tempo, apesar da baixa temperatura, sem afetar a estrutura do arcabouço. Os resultados encontrados no protocolo proposto de criopreservação e mais especificamente sobre a solução criopreservante evidenciam que o uso do Dextran-40 que é um carboidrato junto com o soro fetal bovino nutriente proteico auxiliam a preservação do tecido após o protocolo de depleção celular.

Isto foi demonstrado mais claramente através dos ensaios de histopatologia, onde as regiões do córtex e medular, assim como, o corpúsculo de Hassal coradas por HE, mostraram estas estruturas bem definidas, características encontradas em timo antes da depleção. E os ensaios de imuno-histoquímica, onde observou-se a integridade tanto dos vasos tímicos (células endoteliais) marcados com anti-31 e anti-CD34 que marcam proteínas de endotélio em estruturas distintas como arteríolas e pequenos vasos responsáveis pela irrigação do tecido, assim como, o das células do epitélio que constituem o estroma tímico marcados por anti-CK PAN determinando a integridade da membrana celular. A eficiência da solução crioprotetora evitou a morte celular, mantendo a viabilidade das células de 85-90% após o período de congelamento de 30 dias e 1 ano, respectivamente, quando marcados com Anexina-V marcador específico de morte induzida pelo processo de apoptose, 7AA-D marcador específico de morte celular induzida por necrose e FVS corante de amina expostas pela falta de integridade da membrana celular quando a célula morre sem ser específico por qual via de morte celular ocorreu na célula. A marcação fenotípica do anti-CD326 e os marcadores anti-CD249 e anti-UEA-1 de, mostraram uma frequência das populações, presentes nestes fragmentos após a depleção celular e os tempos de criopreservação de 30 dias e 1 ano. Estas frequências são de aproximadamente 20-16 % das células mTEC (anti-CD326 +anti-CD249^{hi} /anti-UEA-1^{hi}) e de 70% das células cTEC (anti-CD326 +anti-CD249^{low} /anti-UEA-1^{low}), respectivamente. Estes resultados mostraram uma eficiência muito próxima a encontrada por Market *et al.*, 2010. Além disto, as condições do tecido tímico após o descongelamento, permitiram observar, a manutenção destes tecidos para a diferenciação do linfócito T, uma das mais importantes funções do timo.

Observando-se também a capacidade funcional destes fragmentos. Estes dados, também identificaram, além do aumento na frequência de timócitos/linfócitos maduros

CD4+ e CD8+ e diminuição no perfil de células imaturas (células duplo-positivas), uma seleção positiva dos timócitos, que entraram em contato com as moléculas de MHC I / II que apresentam antígenos próprios na membrana das células epiteliais do estroma tímico.

Quando observamos a alta viabilidade, marcação de proteínas específicas das células do arcabouço tímico e uma possível maturação de células T com a perda da expressão de células T/ timócitos duplo-positivas (CD4+/CD8+) após o protocolo desenvolvido podemos propor a avaliação de genes e proteínas essenciais para manutenção do arcabouço como *FOXN1* para a maturação e diferenciação das células T/timócitos e *AIRE* que auxilia a manutenção do tecido para evitar a geração de células T/timócitos alo-reativos e uma futura autoimunidade já descrita por Market *et al.*, 2010.

Assim, o protocolo proposto nestes trabalhos, aumenta a possibilidade de uma construção de um biobanco de fragmentos tímicos prontos para futuros enxertos possibilitando também mais testes para a triagem do melhor fragmento de tecido já disponível para os pacientes com diagnóstico de imunodeficiência primárias celulares de células T, como Síndrome de DIGEORGE, agilizando desta maneira o tratamento destes pacientes.

10. CONCLUSÃO

Esses resultados demonstraram que os fragmentos tímicos após depleção e criopreservados na solução contendo 5% Dextran FP40, 5% Me2SO e 5% FBS por 30 dias ou um ano preservaram a arquitetura e função do TEC com a expressão de proteínas específicas presentes nas células de arcabouço durante a criopreservação de 30 dias e um ano para maturação das células T e timócitos. Como também a viabilidade do arcabouço tímico.

Foi possível observar a maturação das células pré-T provenientes da medula óssea e timócitos com a perda da população imatura dupla positiva (CD4+/CD8+) durante a recolonização do tecido criopreservado por 30 dias e um ano.

Essa técnica abre a possibilidade de congelar e armazenar grandes volumes de tecido do timo para transplante imediato em pacientes com síndrome de DiGeorge e fenótipo atípico (semelhante ao de Omenn) e pacientes com Imunodeficiência Primária de maturação de células T .

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK & Lichtman AH (2005). *Imunologia Celular e Molecular*. 5a Edição. W. B. Saunders Company. Philadelphia Penn. USA. Ed. Elsevier, 576p.
- Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol*. 2012;33(6):256-63.
- Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(2):78-81.
- Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönning JS, Boehm T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature*. 2006;441(7096):992-6.
- Boehm T, Swann JB. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat Rev Immunol*. 2013;13(11):831-8.
- Bonati A, Zanelli P, Ferrari S, Plebani A, Starcich B, Savi M, et al. T-cell receptor beta-chain gene rearrangement and expression during human thymic ontogenesis. *Blood*. 1992;79(6):1472-83.
- Cheunsuk S, Lian ZX, Yang GX, Gershwin ME, Gruen JR, Bowlus CL. Prss16 is not required for T-cell development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):789-96.
- Chidgey AP, Boyd RL. Thymic stromal cells and positive selection. *APMIS*. 2001;109(7-8):481-92.
- Davies et al. Thymus transplantation for complete DiGeorge syndrome: European experience. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140:1660-70.
- DiGeorge AM. Maldevelopment of the thymus. *Pediatr Pathol*. 1994;14(1):178; author reply 9-80.
- Domínguez-Gerpe L, Rey-Méndez M. Evolution of the thymus size in response to physiological and random events throughout life. *Microsc Res Tech*. 2003;62(6):464-70.
- Fomin AB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM.
- DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):865-9.
- Gordon J and Manley NR: Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 138: 3865-3878, 2011.
- Hacıhamdioğlu B, Hacıhamdioğlu D, Delil K. 22q11 deletion syndrome: current perspective. *Appl Clin Genet*. 2015; 8:123-32.
- Hamazaki Y, Fujita H, Kobayashi T, Choi Y, Scott HS, Matsumoto M, et al. Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol*. 2007;8(3):304-11.
- Haynes BF, Heinly CS. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med*. 1995;181(4):1445-58.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2020 – Incidência de Câncer no Brasil*. - INCA, Rio de Janeiro, 2019.
- Kato S. Thymic microvascular system. *Microsc Res Tech*. 1997;38(3):287-99.
- Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):377-91.
- Kong F, Chen CH, Cooper MD. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity*. 1998;8(1):97-104.
- Kwun J, Li J, Rouse C, Park J.B, Farris A. B, Kuchibhatla M, Turek J. W, Knechtle S. J, Kirk A. D and Markert M. L, Cultured thymus tissue implantation promotes donor-specific tolerance to allogeneic heart transplants *JCI Insight*. 2020;5(11): e129983. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129983>.

- Li W, Kim MG, Gourley TS, McCarthy BP, Sant'Angelo DB, Chang CH. An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity*. 2005;23(4):375-86.
- Luther C, Wienhold W, Oehlmann R, Heinemann MK, Melms A, Tolosa E. Alternatively spliced transcripts of the thymus-specific protease PRSS16 are differentially expressed in human thymus. *Genes Immun*. 2005;6(1):1-7.
- Markert ML, et al.,. The human thymic microenvironment during organ culture. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;82(1):26-30.
- Markert, LM et al., .Transplantation of Thymus Tissue in Complete DiGeorge Syndrome .*N Engl J Med* 1999; 341:1180-1189.
- Markert ML, Sarzotti M, Ozaki DA, Sempowski GD, Rhein ME, Hale LP, et al.,. Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood*. 2003;102(3):1121-30.
- Markert ML, Marilyn J. Alexieff, Jie Li, Marcella Sarzotti. Postnatal thymus transplantation with immunosuppression as treatment for DiGeorge syndrome M. *blood*, 2004; 104, (8)2574-2581.
- Markert ML, Devlin BH, Alexieff MJ, Li J, McCarthy EA, Gupton SE, et al.,. Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood*. 2007;109(10):4539-47.
- Markert LM et al., Thymus Transplantation.Thymus Gland Pathology. 2008a : 255–267.
- Markert ML, Devlin BH, Chinn IK, McCarthy EA, Li YJ. Factors affecting success of thymus transplantation for complete DiGeorge anomaly. *Am J Transplant*. 2008b;8(8):1729-36.
- Markert ML, Li J, Devlin BH, Hoehner JC, Rice HE, Skinner MA, et al.,. Use of allograft biopsies to assess thymopoiesis after thymus transplantation. *J Immunol*. 2008c;180(9):6354-64.
- Markert ML, Devlin BH, McCarthy EA. Thymus transplantation. *Clin Immunol*. 2010;135(2):236-46.
- Markert ML, Marques JG, Neven B, Devlin BH, McCarthy EA, Chinn IK, et al.,. First use of thymus transplantation therapy for FOXP1 deficiency (nude/SCID): a report of 2 cases. *Blood*. 2011;117(2):688-96.
- McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 2011;90(1):1-
- McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JA, et al.,. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15071.
- Moutouou MM, Pagé G, Zaid I, Lesage S and Guimond M (2018) Restoring T Cell Homeostasis After Allogeneic Stem Cell Transplantation; Principal Limitations and Future Challenges. *Front. Immunol*. 9:1237.
- Mutti CF, Cruz VG, Santos LF, Araújo D, Cogo SB, Neves et al.,. Perfil Clínico-epidemiológico de Crianças e Adolescentes com Câncer em um Serviço de Oncologia. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2018; 64(3): 293-300
- Park HJ, Kim MN, Kim JG, Bae YH, Bae MK, Wee HJ, et al.,. Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(9):1462-72.
- Pileri LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*. 2004;103(3):1020-5.

- Rice HE, Skinner MA, Mahaffey SM et al. Thymic transplantation for complete DiGeorge syndrome: Thymic transplantation for complete DiGeorge syndrome: medical and surgical considerations. *J Pediatr Surg.* 2004;39(11):1607-15.
- Rode I, Boehm T. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3463-8.
- Rodewald HR, Paul S, Haller C, Bluethmann H, Blum C. Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature.* 2001;414(6865):763-8.
- Roosen J, Oosterlinck W, Meyns B. Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;20(1):101-6.
- Ross S, Cheung M, Lau C, Sebire N, Burch M, Kilbride P, Fuller B., Morris G. J, Davies E. G and Crompton T, Transplanted human thymus slices induce and support T-cell development in mice after cryopreservation, *European Journal of Immunology*, 2018. 48: 716–719.
- Sano H, Hilinski JA, Qayed M, Applegate K, Newton JG, Watkins B, et al., Early blood stream infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a risk factor for acute grade III-IV GVHD in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(2).
- Skogberg G, Lundberg V, Berglund M, Gudmundsdottir J, Telemo E, Lindgren S and Ekwall O: Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. *Immunol Cell Biol* 93: 727-734, 2015.
- Steinmann GG, Müller-Hermelink HK. [Age-related changes in the thymus-dependent immune system]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1985;110(34):1300-7.
- Sunjara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med.* 2000;191(6):1051-6.
- Shichkin V.P, Gorbach O. I, Zuieva O.A and Martsenyuk O. P. Optimization of quality parameters for human thymic cell samples stored in liquid nitrogen. *Trends in Transplant*, (2018). Volume 11(1): 1-11.
- Shichkin V. P, Antica M. Thymus Regeneration and Future Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports* (2020) 16:239–250.
- Thomas RA, Landing BH, Wells TR. Embryologic and other developmental considerations of thirty-eight possible variants of the DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet Suppl.* 1987;3:43-66.
- Tajima A , Pradhan I ,Trucco M, Fan Y, Restoration of Thymus Function with Bioengineered Thymus Organoids. *Curr Stem Cell Rep* (2016) 2:128–139.
- Tuan L. Phan, Joshua C. Pritchett, et al., HHV-6B infection, T-cell reconstitution, and graft-vs-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2018) 53:1508–1517.
- Ucar A, Ucar O, Klug P, Matt S, Brunk F, Hofmann TG, et al., Adult thymus contains FoxN1(-) epithelial stem cells that are bipotent for medullary and cortical thymic epithelial lineages. *Immunity.* 2014;41(2):257-69.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 2005;436(7054):1181-5.
- Yan et al., Decellularized scaffolds in regenerative medicine. *Oncotarget*, 2016: 7;36.58671-683.
- Yu Y, Alkhawaji A, Ding Y, Mei J. Decellularized scaffolds in regenerative medicine.

Oncotarget. 2016;7(36):58671-83.

-Yong F et al., Bioengineering Thymus Organoids to Restore Thymic Function and Induce Donor-Specific Immune Tolerance to Allografts. Mol Ther. 2015 Jul; 23(7): 1262-1277

-Zambon PJ, Atala A, Yoo JJ. Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. Methods. 2019 Oct 10. pii: S1046-2023(18) 30445

11. ANEXOS

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE ARMAZENAMENTO E RECOLONIZAÇÃO DO TECIDO TÍMICO DESCELULARIZADO: ESTUDOS

Pesquisador: Estela Maria Novak

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 88220318.9.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO PRO-SANGUE HEMOCENTRO DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.822.488

Apresentação do Projeto:

Trata-se de submissão de novo TCLE, agora contendo as informações necessários de descarte do timo pelo cirurgião e uso após descarte para a execução do projeto, garantindo que a coleta do órgão será feita após sua retirada inevitável determinada pelo cirurgião no ato cirúrgico.

Objetivo da Pesquisa:

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE ARMAZENAMENTO E RECOLONIZAÇÃO DO TECIDO TÍMICO DESCELULARIZADO: ESTUDOS PRELIMINARES

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos adicionais, uma vez que o timo foi descartado pelo cirurgião após esgotar as possibilidades de sua conservação na criança e só então ele foi disponibilizado para consulta a família de seu uso no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada e meritória, desde que apenas timos impossíveis de manutenção na criança serão utilizados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo corrigido está adequado.

Recomendações:

Aprovação

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

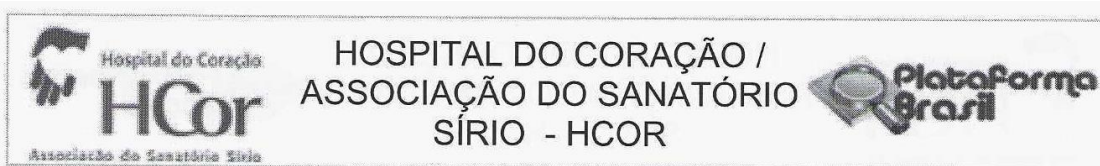
CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br



HOSPITAL DO CORAÇÃO /
ASSOCIAÇÃO DO SANATÓRIO
SÍRIO - HCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABELECIDO DE PROTOCOLO DE ARMAZENAMENTO E RECOLONIZAÇÃO DO TECIDO TÍMICO DESCELULARIZADO: ESTUDOS

Pesquisador: Estela Maria Novak

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 88220318.9.3001.0060

Instituição Proponente: Hospital do Coração/ Associação do Sanatório Sírio

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.888.922

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo experimental e comparativo, prospectivo, cujo objetivo é avaliar em uma primeira etapa, as características do arcabouço do tímico após descclularização e congelamento do timo a -196°C . E, em uma segunda etapa, após 1 mês de congelamento do tecido tímico descclularizado, estabelecer um protocolo de recolonização do tecido tímico com células de medula óssea de doadores e avaliar a maturação dos linfócitos T.

As amostras serão avaliadas no tempo zero pré-congelamento, em relação aos diferentes períodos de armazenamento. Serão avaliados 30 timos retirados durante cirurgias cardíacas por timectomia em pacientes cardiopatas congênitos do Hospital do Coração – Associação Sanatório Sírio de São Paulo (Hcor). Para a recolonização serão utilizadas 0,1mL de medula óssea do doador. Serão utilizadas 30 amostras de doadores do banco de medula do Serviço de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HCFMUSP/ Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo. Espera-se que o tecido descclularizado e descongelado seja viável a ponto de suportar a recolonização celular, o que pode garantir uma ferramenta para auxiliar no tratamento de crianças que necessitem do transplante timo, sejam crianças imunologicamente comprometidas pela ausência desse órgão, ou aquelas submetidas ao tratamento para Leucemias e Cânceres.

Endereço: Rua Abrão Dib, 50 - Térreo

Bairro: Paraíso

CEP: 04.004-030

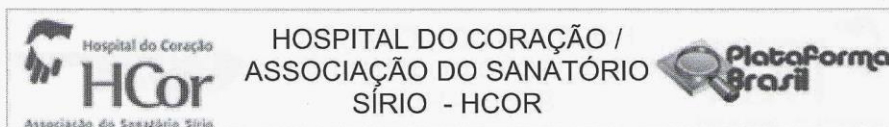
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3886-4688

Fax: (11)3886-4689

E-mail: etica.pesquisa@hcor.com.br



Continuação do Parecer: 2.888.922

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver inicialmente o protocolo de preparo do tecido tímico do doador em cultura e sua manutenção viável para avaliações específicas do arcabouço e células do timo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há desconfortos ou riscos, uma vez que o procedimento da timectomia se fará obrigatoriamente para acesso cirúrgico ao coração e/ou vasos da base do coração das crianças anestesiadas do HCor. E a coleta de líquido da medula óssea será aproveitada da doação para o Banco de Medula óssea do Serviço de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular do HCFMUSP.

Benefícios:

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de projeto de pesquisa para permitir o avanço do conhecimento científico sobre o funcionamento do sistema imune que poderá no futuro, beneficiar e até salvar a vida de crianças que nasçam sem o timo defesa no organismo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto com proposta inovadora no tratamento de pacientes imunologicamente deprimidos, com possibilidade de novos tratamentos, visando estabelecer recuperação da resposta imunológica em diversas patologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sugere-se adequação do TCLE item "Quais são as intervenções e procedimentos do estudo?", deixar mais claro o termo "filho ou familiar" na retirada do timo.

Recomendações:

Adequação do TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado mediante recomendação acima.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP HCor informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de	TCLE_Hcor_29_08_2018_lana.doc	29/08/2018	Denise Fidalgo	Aceito

Endereço: Rua Abrão Dib, 50 - Térreo
 Bairro: Paraíso CEP: 04.004-030
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3886-4688 Fax: (11)3886-4689 E-mail: etica.pesquisa@hcor.com.br