

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Felipe Henrique da Cunha Xavier

Estudos sobre GDF11 e seus receptores no timo e no baço de camundongos BALB/c

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

Profa. Dra. Déa Maria Serra Vilaverde

RIO DE JANEIRO

2018

Xavier, Felipe Henrique da Cunha.

Estudos sobre GDF11 e seus receptores no timo e no baço de camundongos BALB/c / Felipe Henrique da Cunha Xavier. - Rio de Janeiro, 2018.

xi, 68 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

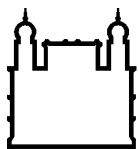
Orientador: Vinícius Cotta-de-Almeida.

Co-orientadora: Déa Maria Serra Vilaverde.

Bibliografia: f. 61-68

1. GDF11. 2. Timo. 3. Baço. 4. Alk. 5. Linfócitos T. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Felipe Henrique da Cunha Xavier

Estudos sobre GDF11 e seus receptores no timo e no baço de camundongos BALB/c

ORIENTADORES: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

Profa. Dra. Déa Maria Serra Vilaverde

Aprovada em: 30/10/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira - IOC - Fiocruz

Prof. Dr. Vinícius Frias – IOC - Fiocruz

Profa. Dra. Jacy Gameiro - UFJF

Prof. Dr. Joana Reis Oliveira - IFRJ

Profa. Dra. Mariana Waghbi – IOC - Fiocruz

Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2018

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo amor, educação e apoio. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação marca a conclusão de dois anos de mestrado. Conclusão dos meus dois primeiros anos de vida acadêmica após a graduação, em que busquei uma carreira de aprendizagem e pesquisa. Nesse tempo obtive conhecimento teórico e técnico, amadureci minha capacidade de análise crítica científica e amadureci profissionalmente como um todo. Amadureci também pessoalmente, ao mudar para uma nova cidade, cuidar da minha própria moradia e dividi-la com uma companheira. Entretanto não obtive essas conquistas sozinho. Por isso, primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Manoel e Diovanea, e a minha irmã, Carolina, por todo o apoio que obtive nesses anos. Sem eles provavelmente essa jornada não teria sido possível. Gostaria também de agradecer a minha grande companheira, Camilla, por todo o amor e por todas as coisas boas que compartilhamos e me fizeram seguir em frente todos os dias.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador, Vínicius, pela oportunidade de ser seu aluno, por me acolher no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, por estar sempre disponível, dentro e fora do laboratório, e por cultivar uma ótima relação comigo e com todos os seus alunos. Uma excelente pessoa, grande chefe e pesquisador, pelo qual eu tenho grande apreço. Agradeço também a todos os amigos do LPT que contribuíram de diversas maneiras na conclusão dessa etapa, me ensinando, ajudando e ouvindo. Agradeço em especial aos amigos, Arnon Jurberg, coorientador que me ensinou e acompanhou por todos os passos dessa dissertação, Larissa Vasconcelos e Pedro Viana, pela imensa ajuda na bancada e amizade fora do laboratório, Rômulo Galvani por estar sempre disposto a ajudar, ensinar e esclarecer qualquer dúvida e Adriana Bonomo, amiga e futura orientadora de doutorado, sempre disponível para discutir e transmitir conhecimento.

Impossível não agradecer também ao LPT, por ser um laboratório de excelência que proporcionou todo o suporte necessário para a realização desse trabalho. Agradeço também aos pesquisadores, alunos, tecnólogos e técnicos, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal, e que contribuem para o ótimo convívio existente no laboratório.

Agradeço também a segunda orientadora Déa, e a toda banca avaliadora por ter aceitado o convite de participar desse importante passo na minha vida acadêmica.

Por fim, agradeço a todos os amigos aqui não citados, os quais compartilho anos de amizade e sabem da grande importância que possuem em minha vida. Obrigado.

“Para mim, é muito melhor compreender o universo como ele realmente é, do que persistir na ilusão, por mais reconfortante que possa ser”

(Carl Sagan)

ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
ActRIIA	Receptor de activina do tipo II A – (do inglês, “Activin receptor, type IIA”)
ALK Kinases”)	Receptor de activina tipo quinase (do inglês, “Activin receptor-Like Kinases”)
AMH	Hormônios anti-Müllerianos (do inglês, “Anti-Müllerian hormone”)
APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês, “antigen presenting cell”)
BCR	Receptor de células B (do inglês, “B cell receptor”)
BMP	Proteína morfogênica óssea (do inglês, “Bone Morphogenetic Protein”)
BMPRII	Receptor de proteína morfogênica óssea do tipo II (do inglês, “Bone Morphogenetic Protein Receptor type II”)
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão Ética de Animais da Fundação Oswaldo Cruz
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cTECs	Células epiteliais tímicas corticais
DC	Células dendríticas
DN	Duplo-negativo, fenótipo CD4 ⁻ CD8 ⁻
DP	Duplo-positivo, fenótipo CD4 ⁺ CD8 ⁺
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês, “Epidermal Growth Factor”)
FM	Linfócito B folicular maduro
FMO	Fluorescência menos um (do inglês, “Fluorescence Minus One”)
FTOC	Cultura de órgão tímicos fetais (do inglês, “Fetal thymus organ culture”)
GDFs	Fatores de crescimento e diferenciação (do inglês, “Growth and Differentiation Factor”)
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
LAP	Peptídeo latente associado (do inglês, “Latency-Associated Protein”)
LC-MS	Cromatografia líquida-espectrômetros de massas (do inglês, “Liquid chromatography–mass spectrometry”)
MAPK	Proteínas kinases ativadas por mitógeno (do inglês, “Mitogen-activated protein kinases”)
MFI	intensidade de fluorescência mediana (do inglês, “median fluorescence intensity”)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, major histocompatibility complex”)
MIS	Substâncias inibidoras Müllerianas (do inglês, “Müllerian-inhibiting substance”)

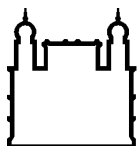
MSV	Moloney sarcoma vírus
mTECs	Células epiteliais tímicas medulares
MZ	Zona marginal
PCR reaction”	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, “Polymerase chain reaction”)
PMC	Córtex perimedular
RT-qPCR	PCR quantitativo por transcriptase reversa (do inglês “Reverse transcriptase–quantitative PCR)
S1P1	Receptor de esfingosina-1-fosfato
SFB	Soro fetal bovino
SGF	Fator de crescimento de sarcoma (do inglês, “Sarcoma Growth Factor”)
SP CD4	Simplex positiva, fenótipo CD4 ⁺ CD8 ⁻
SP CD8	Simplex positiva, fenótipo CD4 ⁻ CD8 ⁺
TCR	Receptor de célula T (do inglês, “T cell receptor”)
TGF Factor”)	fator transformador do crescimento (do inglês, “Transforming Growth Factor”)
TGF β 2 beta receptor II”)	Receptor de TGF- β do tipo II (do inglês: Transforming Growth Factor beta receptor II”)

Índice

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
EPÍGRAFE.....	vii
ABREVIATURA E SIGLAS.....	viii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Breve histórico sobre a superfamília de TGF-β	13
1.1.1. Vias de sinalização da superfamília do TGF- β	14
1.2. GDF11, um dos membros da superfamília do TGF-β.	15
1.2.1. Via de sinalização do GDF11.....	16
1.3. Regulação do sistema imune por membros da superfamília do TGF-β	17
1.4. O sistema imune	18
1.4.1. Timo e o desenvolvimento de linfócitos T.....	18
1.4.2. Baço.....	24
1.4.3. GDF11 e o sistema imune.....	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Animais	32
3.2. Moléculas utilizadas	32
3.3. Obtenção de células	33
3.4. Caracterização das populações celulares por citometria de fluxo	33
3.5. Caracterização de órgãos linfoides por microscopia confocal	34
3.6. Ensaio de morte celular	35
3.7. Estratégias de delimitação de subpopulações	37
3.8. Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Caracterização dos receptores para GDF 11 no timo	42
4.2. Caracterização dos receptores para GDF11 no Baço	43
4.3. Caracterização dos receptores para GDF 11 por imunofluorescência	46
4.4. Ensaio funcional	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE ALGUMAS MOLÉCULAS DA SUPERFAMÍLIA DO TGF-B.	17
FIGURA 1.2:	REPRESENTAÇÃO ANATÔMICA DO TIMO NO CORPO HUMANO.....	19
FIGURA 1.3:	CORTE HISTOLÓGICO DO TIMO DE CAMUNDONGO CORADO PELA TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	20
FIGURA 1.4:	SEQUÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS T NAS SETE SUB-REGIÕES TÍMICAS.....	22
FIGURA 1.5:	EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA, BASEADA EM DADOS DE TRANSCRIPTOMA, DE DIVERSOS MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DO TGF-B NOS DIVERSOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS TIMÓCITOS.....	23
FIGURA 1.6:	ESQUEMA ILUSTRATIVO DA LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DO BAÇO EM HUMANOS.....	24
FIGURA 1.7:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HISTOLOGIA DO BAÇO.....	24
FIGURA 1.8:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SEIO VENOSO.....	25
FIGURA 1.9:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA POLPA BRANCA.....	26
FIGURA 1.10:	DISTRIBUIÇÃO DE GDF11 NO TIMO DE CAMUNDONGO.....	29
FIGURA 1.11:	EXPRESSÃO DE RNAM PARA GDF11 (A), ALK4 (B), ALK5 (C) E ALK7 (D) EM TIMÓCITOS E LINFÓCITOS T MADUROS.....	30
TABELA 3.1:	LISTA DAS MOLÉCULAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DA VIA DE GDF11 EM TIMO E BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/C.	32
FIGURA 3.1:	ESTRATÉGIA DE REGIÕES DE ANÁLISE (GATING) PARA ANEXINA-V X 7-AAD.....	36
FIGURA 3.2:	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE PARA OS TIMÓCITOS.....	38
FIGURA 3.3:	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE PARA LINFÓCITOS T NO BAÇO.....	39
FIGURA 3.4:	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE PARA LINFÓCITOS B NO BAÇO.....	40
FIGURA 3.5:	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE PARA CÉLULAS DE ORIGEM MIELOIDE NO BAÇO.....	41
FIGURA 4.1:	FREQUÊNCIA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES TÍMICAS EXPRESSANDO OS RECEPTORES ALK4, ALK5 E ALK7	42
FIGURA 4.2:	INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA (MFI).....	43
FIGURA 4.3:	FREQUÊNCIA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES ESPLÊNICAS DE LINFÓCITOS T EXPRESSANDO OS RECEPTORES ALK4, ALK5 E ALK7.....	44
FIGURA 4.4:	FREQUÊNCIA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES ESPLÊNICAS DE LINFÓCITOS B EXPRESSANDO OS RECEPTORES ALK4, ALK5 E ALK7.....	45
FIGURA 4.5:	FREQUÊNCIA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES MIELOIDES ESPLÊNICAS EXPRESSANDO OS RECEPTORES ALK4, ALK5 E ALK7.....	45
FIGURA 4.6:	IMUNOFLUORESCÊNCIA DE BAÇO DE CAMUNDONGOS JOVENS.....	47
FIGURA 4.7:	IMUNOFLUORESCÊNCIA DE BAÇO E TIMO DE CAMUNDONGOS JOVENS.....	47
FIGURA 4.8:	LINFÓCITOS T CD4 ESTIMULADOS COM GDF11 RECOMBINANTE MARCADOS COM ANEXINA-V E 7-AAD.....	49
FIGURA 4.9:	LINFÓCITOS T CD8 ESTIMULADOS COM GDF11 RECOMBINANTE MARCADOS COM ANEXINA-V E 7-AAD.....	50
FIGURA 4.10:	TIMÓCITOS DUPLO POSITIVOS ESTIMULADOS COM GDF11 RECOMBINANTE MARCADOS COM ANEXINA-V E 7-AAD.....	51
FIGURA 5.1:	DIAGRAMA DEMONSTRANDO O FUNCIONAMENTO DA MARCAÇÃO ANEXINA-V VS 7AAD.....	57



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

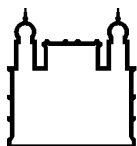
Estudos sobre GDF11 e seus receptores no timo e no baço de camundongos BALB/c

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Henrique da Cunha Xavier

Um controle refinado da proliferação, migração e diferenciação celular é crítico para o funcionamento apropriado de sistemas biológicos complexos e diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na sua regulação. Componentes da superfamília de TGF- β se destacam por ação relevante em processos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos, incluindo aqueles envolvidos na organização e função do sistema imunológico. Nesse contexto, o GDF11, um membro da superfamília de TGF- β , pode desempenhar papéis relevantes sobre as funções imunes. Embora as suas atividades ainda não tenham sido relacionadas a tal sistema, o GDF11 partilha receptores em comum com o TGF- β , que atua na diferenciação e controle da ativação de células imunes. Além disso, o GDF11 se mostrou importante na diferenciação, proliferação e migração de alguns tipos celulares, como progenitores tronco-neurais e células epiteliais sanguíneas, além de regular a osteoblastogênese. Somado a isso, o baço e timo de camundongos estão entre os principais órgãos de expressão gênica de GDF11. Estudos de mapeamento de expressão gênica em diversas subpopulações imunes, também demonstraram a presença de GDF11 nos timócitos em diversos estágios de maturação. Esses dados nos levaram a investigar a capacidade de tecidos linfoides e suas subpopulações celulares de responderem ao GDF11, com enfoque para sua capacidade de regular a viabilidade celular em timócitos. Para isso, caracterizamos a distribuição de GDF11 e seus receptores no timo e no baço através de imunofluorescência por microscopia confocal e imunofenotipagem por citometria de fluxo. A identificação dos receptores ALK4/5/7 em diferentes populações celulares, como timócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e B maduros, sugere que todas as células analisadas têm capacidade de responder ao GDF11. Também observamos que GDF11 induziu a morte celular de timócitos SP não estimulados em cultura. Porém, quando os timócitos foram ativados com anticorpo anti-CD3 ϵ na presença de GDF11, ele protegeu os timócitos SP CD4 da morte celular. Em conjunto, os nossos achados sugerem que o GDF11 atua no sistema imune e pode influenciar o amadurecimento de linfócitos T.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study about GDF11 and its receptors in thymus and spleen of BALB/c mice

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

Felipe Henrique da Cunha Xavier

A proper function of complex biological systems depends on refined control of cellular proliferation, migration and differentiation, and its regulation involves distinct molecular mechanisms. Diverse components of TGF- β superfamily are well known to organize and participate of immunological system function. In this context, a member of TGF- β superfamily, GDF11, share common receptors with TGF- β which acts on differentiation and regulation of immune cell activation. Besides, GDF11 is shown to have a crucial role on differentiation, proliferation and migration of certain cell subtypes, as neural stem cell progenitors, blood endothelial progenitor cells, and osteoblastogenesis regulation. In addition, spleen and thymus are the main organs expressing the GDF11 gene in mice. Studies about genomic expression in many immunological cell subpopulations also show the presence of GDF11 in maturation stages of thymocytes. This data leads us to explore the capacity of lymphoid tissues and its cell subpopulations in respond to GDF11 signaling, and also its capacity to regulate thymocytes viability. To answer this, we characterize GDF11 and its receptors distribution in mice spleen and thymus by confocal microscopy immunofluorescence and immunophenotyping by flow cytometry. Identification of Ak4/5/7 receptors in different cellular populations as thymocytes, macrophages, neutrophils and T/B lymphocytes, suggests that all analyzed cells have the capacity to respond to GDF11. We also noticed that GDF11 induced cellular death of SP thymocytes cultured in medium without activation. Although is also acted as a protector of cell viability in CD3e activated thymocytes. Altogether, our data suggests that GDF11 have a relation with immune system and has influence in T lymphocytes maturation.

1. INTRODUÇÃO

A liberação de fatores solúveis é um dos principais métodos de comunicação entre as células de um organismo. No que diz respeito ao sistema imunológico, as citocinas e quimiocinas, além de fatores de crescimento e hormônios, atuam desde o amadurecimento de precursores linfoides e mieloides na medula óssea até o recrutamento de células para o sítio inflamatório e estabelecimento da resposta imune efetora. Dessa forma, os fatores solúveis são objetos de estudo nas mais distintas abordagens, como infecções por patógenos, autoimunidade, alergias, resposta a transplantes e câncer, além de serem foco de estudos que visam desvendar novos papéis no funcionamento homeostático do organismo e o funcionamento do sistema imunológico (1). Um importante grupo de fatores solúveis, é a superfamília do TGF- β . Essa superfamília compreende moléculas chave, cruciais na manutenção da vida do organismo, promovendo um correto desenvolvimento embrionário do sistema esquelético, coração, pulmão e olhos. Possui também importante papel na regulação do sistema imunológico, agindo como um importante regulador do sistema imune adaptativo, evitando que este responda contra o próprio organismo. De forma geral, as moléculas da superfamília apresentam funções envolvendo a regulação de diversos mecanismos celulares, tais como ativação, morte, diferenciação e proliferação. Sendo assim, seu correto funcionamento é imprescindível para a homeostase do organismo, correta montagem da resposta imune efetora e posterior recuperação do organismo (2,3).

1.1. Breve histórico sobre a superfamília de TGF- β

O conhecimento sobre os membros da superfamília de TGF- β (fator transformador do crescimento - β) começou a se formar principalmente após 1978. Ao estudar como vírus eram capazes de induzir modificações tumorais, De Larco e Todaro purificaram um polipeptídeo secretado por fibroblastos transformados pelo vírus de RNA Moloney sarcoma vírus (MSV) e denominaram esse fator de SGF (fator de crescimento de sarcoma) (4). O SGF foi descrito na época como ligante do receptor de EGF (fator de crescimento epidermal) por competição. Porém, supunha-se que se tornava diferente do EGF após a atuação viral, uma vez que era capaz de transformar os fibroblastos e torná-los mais proliferativos. Dois grupos de pesquisa supuseram que haveria duas moléculas diferentes, uma responsável pela competição com o receptor de EGF e outra pela atividade proliferativa, ambas identificadas como sendo TGFs e que mais

tarde foram denominadas de TGF- α , ligante de EGFR, e TGF- β (5–7). Nessa mesma época já havia sido observado que uma molécula proveniente de células BSC-1, que mais tarde viria a ser identificada como TGF- β , assim como o TGF- β proveniente de plaquetas, possuíam ambos a capacidade de inibir o crescimento celular (8,9). Essa característica foi largamente comprovada nos anos seguintes e continua sendo uma das principais características pela qual o TGF- β é conhecido (7).

Ainda na década de 1980, com a necessidade de produção e consequente clonagem do TGF- β , foram identificados diferentes homodímeros do TGF- β , denominados TGF- β 1 e TGF- β 2, e TGF- β 3, que são codificados por diferentes genes, além do heterodímero TGF- β 1:TGF- β 2 (10,11). Logo após, partindo de projetos de clonagem de cDNA (DNA complementar obtido a partir de RNA mensageiro), diferentes laboratórios encontraram outras moléculas com sequências carboxi-terminais homólogas ao TGF- β e que possuíam sete das suas últimas nove cisteínas conservadas, identificadas mais tarde como sendo um ponto estrutural importante para essas moléculas (12,13). Finalmente, em 1988 foi isolada uma proteína de indução óssea, BMP (proteína morfogênica óssea), que também possuía sequência similar ao TGF- β . Porém, essa proteína apresentou funções distintas, como por exemplo a indução da diferenciação celular. Isso promoveu a base para a descoberta de novos BMPs (14).

Após os BMPs e com a sucessão de descobertas de novas moléculas homólogas ao TGF- β , definiu-se uma “superfamília” para agrupar essas moléculas. Hoje sabe-se que 33 genes codificam precursores de proteínas relacionadas ao TGF- β , sendo o número total de homodímeros ou heterodímeros funcionais ainda desconhecido. Essas moléculas podem realizar as mais diversas funções no organismo, como regulação do metabolismo, diferenciação e proliferação celular. Elas também agem como importantes reguladores do processo de desenvolvimento embrionário. Além dos TGF- β s e dos BMPs, esse grupo inclui os GDFs (fatores de crescimento e diferenciação), activinas, inibinas, Nodal, MIS (substâncias inibidoras Müllerianas), AMH (hormônios anti-Müllerianos) e Lefty (7).

1.1.1. Vias de sinalização da superfamília do TGF- β

Os ligantes dessa superfamília são produzidos como moléculas precursoras são capazes de formar homo ou heterodímeros. Elas precisam ter seu prodomínio N-terminal clivado, o que libera um peptídeo latente associado (LAP) e a molécula ativa

dimerizada. Esse dímero ativo então se liga a receptores transmembranares serina/treonina quinases do tipo II, tais como ActRIIA (receptor de activina do tipo II A), ActRIIB (receptor de activina do tipo II B), TGF β RII (receptor de TGF- β do tipo II) e BMPRII (receptor de BMP do tipo II), que recrutarão receptores transmembranares serina/treonina quinases do tipo I, denominados de ALK (receptor de activina tipo quinase), como por exemplo o ALK4 (também conhecido como ActRIA) e ALK5 (também conhecido como TGF β RI). Juntos, os receptores do tipo I e II formam um complexo capaz de fosforilar proteínas intracelulares, principalmente da família Smad, mas também podem fosforilar outras proteínas, como proteínas da classe MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno) ERK, JNK, p38, PI3k quinases e PP2A fosfatases. Ao ativarem a cascata de sinalização intracelular da família SMAD, forma-se um complexo transcricional contendo a proteína Smad4, que é capaz de se deslocar para o núcleo e modular a transcrição gênica (15–17).

1.2. GDF11, um dos membros da superfamília do TGF- β .

Dentre as moléculas dessa superfamília, o GDF11, também conhecido como BMP11, se tornou foco de estudos e controvérsia na última década. Primeiramente, ao redor dos anos 2000, o GDF11 foi identificado como um componente do desenvolvimento neural embrionário (18) e caracterizado como fundamental na padronização axial anteroposterior (19–21), na transição tronco-cauda durante o alongamento axial (22) e na formação renal de embriões de camundongo (23). Porém, novos interesses de estudo sobre essa molécula emergiram no meio acadêmico a partir de 2013, após um trabalho realizado por Loffredo et al. (24). Neste trabalho buscava-se encontrar algum fator sanguíneo que pudesse reverter a hipertrofia cardíaca normal associada à idade. Para isso, foi realizado um experimento de parabiose, em que a corrente sanguínea de um camundongo jovem foi ligada à corrente sanguínea de um camundongo idoso durante quatro semanas. Após esse tempo, foi observado que a hipertrofia cardíaca dos camundongos idosos havia sido revertida. Após extensa análise para saber quais proteínas possuíam níveis diferentes dependendo da idade, o GDF11 foi selecionado pelos autores, tendo sua eficácia confirmada *in vivo* e *in vitro*. Também foram realizadas diversas análises de expressão gênica, em diversos órgãos, através da quantificação de RNA mensageiro por RT-qPCR (PCR quantitativo por transcriptase reversa). Dentre os órgãos avaliados pelos autores, os que possuíam expressão mais alta de *GDF11* foram o baço, os olhos e o timo (24).

A proposta de colocar o GDF11 como um agente rejuvenescedor trouxe muita controvérsia nos anos seguintes. Alguns trabalhos apoiaram esta hipótese, confirmando-o como sendo um restaurador da integridade genômica associado ao envelhecimento de células satélites no músculo esquelético (25). Porém esses trabalhos foram largamente criticados por grupos de pesquisa que chegaram a resultados contrários, tanto em relação ao papel restaurador muscular, quanto às concentrações relativas à idade (26–30). A controvérsia estabelecida ocorreu devido à similaridade molecular de cerca de 90% entre GDF11 e GDF8 (também conhecido como miostatina) e o reconhecimento cruzado de ambas as moléculas pelo anticorpo utilizado (31–33). A controvérsia em relação às concentrações relativas à idade só seria resolvida mais tarde através da dosagem circulante de ambos por LC-MS/MS (cromatografia líquida atrelada a espectrômetros de massas), que demonstrou que o GDF8 diminui com a idade enquanto GDF11 continua constante, exceto em pacientes em pós-operatório ou doenças crônicas, onde o GDF11 se mostrou aumentado (34). Isso abriu uma nova porta para o GDF11 começar a ser considerado um marcador de risco em idosos (35).

Em relação a sua função muscular, ainda não existe consenso, com resultados a favor da sua função rejuvenescedora cardíaca (36,37) e outros não (38,39). Entretanto, o GDF11 se mostrou um importante regulador de outras funções celulares em outros tecidos, como por exemplo na homeostase de formação óssea (40,41), na vasculogênese cerebral, na neurogênese e na proteção contra a doença de Alzheimer (42–45), na estimulação da angiogênese arterial pulmonar (46), na eritropoiese tardia (47,48), na migração e diferenciação de células progenitoras endoteliais sanguíneas (49) e na migração e proliferação de células-tronco neurais (50).

1.2.1. Via de sinalização do GDF11

Assim como outras moléculas da superfamília do TGF- β , o GDF11 precisa estar na forma de homodímero para se ligar aos receptores transmembranares serina/treonina quinases do tipo II e I, sequencialmente. Mais especificamente, ele se liga aos receptores do tipo II ActRIIA e ActRIIB (21) e recruta os receptores do tipo I ALK4, ALK5 e ALK7 (19). Assim como o TGF- β e o GDF8, os receptores do tipo I são responsáveis por fosforilar duas proteínas intracelulares da família Smad, Smad2 e Smad3, que formam o complexo Smad2/3 fosforilado. Esse complexo ao se juntar com Smad4, é capaz de translocar-se para o núcleo e agir como um fator de transcrição (51) (Figura 1.1).

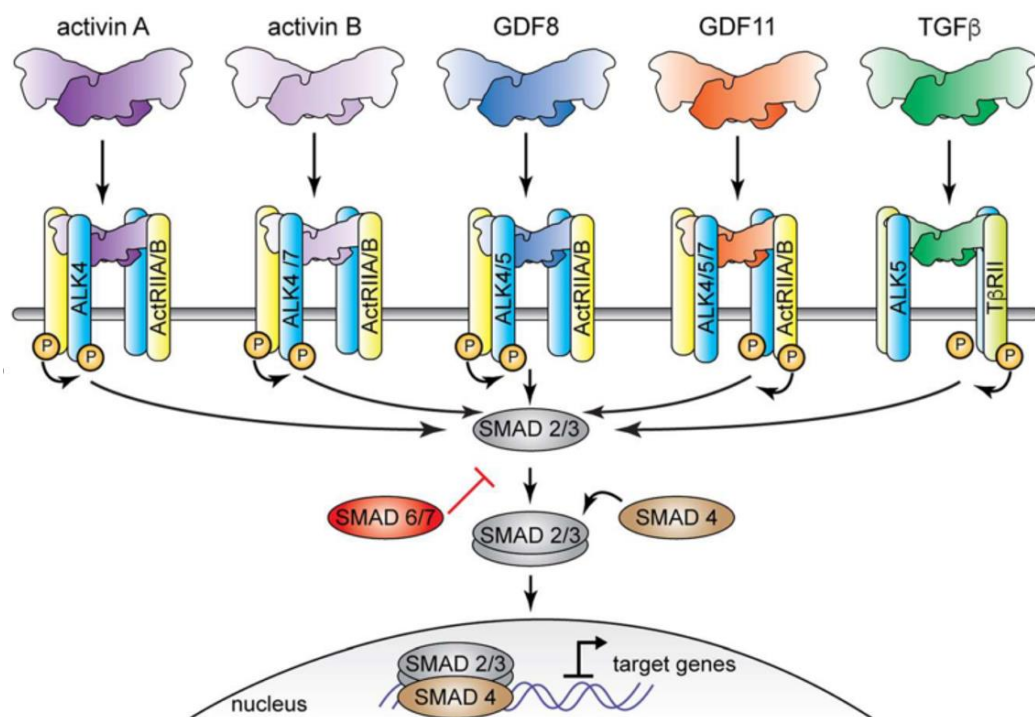


Figura 1.1: Representação esquemática da via de sinalização de algumas moléculas da superfamília do TGF- β . GDF11 possui receptores em comum com Activina A e B, GDF8 e TGF- β e a formação dos tetrâmeros de receptores do tipo I e do tipo II ativam a mesma cascata de sinalização intracelular. Figura adapta de WALKer, 2017 (51).

1.3. Regulação do sistema imune por membros da superfamília do TGF- β

Desde sua identificação, o TGF- β já apresentava efeitos distintos dependendo do tipo celular e do contexto a qual ele estava inserido, como por exemplo sua concentração, hora estimulando a proliferação de fibroblastos (4), hora inibindo o crescimento celular (9). Dessa forma, o ponto chave para o estudo da função do TGF- β no organismo envolveu a geração de camundongos deficientes para TGF- β . Entre os fenótipos mais evidentes, uma extensa inflamação multifocal e autoimunidade levam esses animais à morte logo após o nascimento, revelando um papel crucial do TGF- β na homeostase do sistema imune (52,53). Com isso, outros estudos focaram em desvendar o papel de outros membros dessa superfamília no sistema imune, assim como dos componentes a jusante da sua via de sinalização. Dentre as atividades observadas, por exemplo, a inibição de BMP2, BMP4 e BMP7 provoca a redução no tamanho do timo (54), enquanto a inativação de *BMP4* causa um atraso na colonização tímica (55). A inibição condicional de ALK3 altera a proporção de tímócitos imaturos (56) e a deleção condicional do *tgfbr1* revela, pela primeira vez, a necessidade de TGF- β para a formação de linfócitos T reguladores (Treg) (57). A deleção condicional de *Smad2* e *Smad3* se mostrou como essencial para o desenvolvimento de linfócitos Treg e Th1 (58), a inativação do *Actr2a* e *BMP2*

ocasiona um aumento da hematopoiese esplênica (59) e a inativação condicional de *TGF β 2* está relacionada a alta responsividade de linfócitos B e deficiência de IgA (60) e expansão de linfócitos T CD8 de memória (61). Muitas outras funções foram ainda descritas relacionadas às activinas A e B e suas funções em macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), e foram extensamente revisadas por WanJun Chen e Peter ten Dijke (2), o que nos confirma a participação dos membros da superfamília do TGF- β em diversas subpopulações celulares do sistema imune.

1.4.O sistema imune

O sistema imune evoluiu sob a pressão da relação com trilhões de microrganismos constituintes da microbiota normal e, simultaneamente, frente ao desafio de prover ao indivíduo um sistema de defesa a patógenos e agentes infecciosos, além de iniciar o processo de reparo e remodelamento necessário para restaurar e manter a homeostase dos tecidos (62). Historicamente, sua função foi separada didaticamente em dois tipos, a imunidade inata, responsável por ser a primeira linha de defesa do organismo, e a imunidade adaptativa, que funciona de forma mais refinada através da geração de células contendo receptores e anticorpos específicos para diferentes antígenos (63).

No desenvolvimento fetal, o sistema imune é originado a partir de células progenitoras provenientes do saco vitelínico. Primeiramente, essas células colonizam o fígado fetal e em seguida colonizam o timo e o baço. A partir da 11^a semana de gestação já são encontradas células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, que serão responsáveis pela produção e reabastecimento de células do sistema imune durante toda a vida do indivíduo (64). Em sua grande maioria, essas células provenientes da medula óssea já passam pelo estágio de amadurecimento nesse tecido, enquanto linfócitos passarão por um estágio de maturação em órgãos específicos. Os linfócitos T amadurecem no timo, enquanto os linfócitos B têm seus estágios de maturação na medula óssea, e o final do seu amadurecimento no baço. Ambos, quando maduros, serão responsáveis pela imunidade adaptativa, ou seja, pela resposta imune antígeno-específica e formação de memória imunológica (65,66).

1.4.1. Timo e o desenvolvimento de linfócitos T

O timo de mamíferos está localizado no tórax, no mediastino superior, em frente à traquéia, anteriormente aos grandes vasos que emergem do coração. Consiste em

dois lobos que surgem no embrião como primórdios separados de cada lado da linha média, mas que mais tarde se tornam intimamente ligados por tecido conjuntivo. O timo atinge o seu maior peso relativo no fim da vida fetal, porém seu peso absoluto continua a aumentar, alcançando 30 a 40 g na época da puberdade. Ele então começa a involuir até que, no adulto, o órgão seja, em grande parte, substituído por tecido adiposo (67) (Figura 1.2).

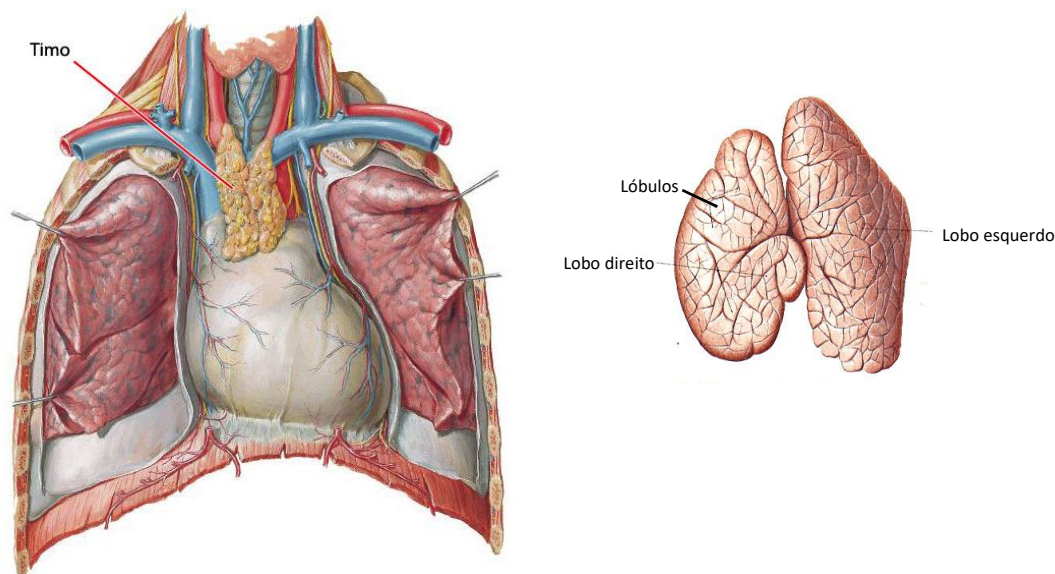


Figura 1: Representação anatômica do timo no corpo humano. Obtido em: <https://www.samaelaunweor.org/nociones-fundamentales-de-endocrinologia-y-criminologia/la-glandula-del-timo> acessado em 04/09/2018.

Os lóbulos são formados por quatro regiões distintas: a zona subcapsular, o córtex, a junção córtico-medular e a medula, constituídos por timócitos, as células T em desenvolvimento, bem como também por células epiteliais tímicas corticais (cTECs), células epiteliais tímicas medulares (mTECs), fibroblastos, células dendríticas e macrófagos. A esse conjunto se dá o nome de parênquima tímico (68). A região cortical, mais externa, é densamente populada por timócitos imaturos, enquanto a região medular, mais interna, é o local para onde se direcionam os poucos timócitos maduros que conseguiram sobreviver às etapas de maturação (Figura 1.3). Essas regiões e as sub-regiões presentes no córtex não são separadas estruturalmente. Elas são definidas pelo alcance histológico de cada progenitor linfóide, não sendo assim bem delimitadas, sofrendo extensiva sobreposição (Figura 1.4). Os mecanismos de maturação de timócitos já foram estudados e revisados extensivamente por diversos trabalhos (revisado por 53,57–59). Por essa razão, eles serão apresentados de forma resumida a seguir.

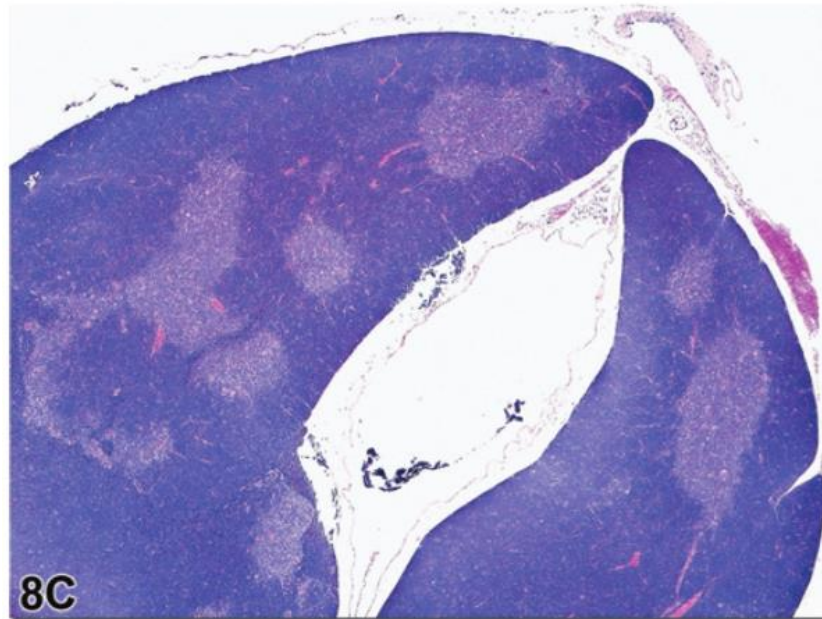


Figura 1: Corte histológico do timo de camundongo corado pela técnica de hematoxilina-eosina. Regiões mais claras são a medula, enquanto as mais escuras compõem o córtex (72). Essa compartimentalização representa o substrato morfológico das etapas de maturação de células T, com células imaturas em altas taxas de proliferação no córtex e um número bem menor de timócitos maduros que alcançam a medula após sobreviverem às etapas seletivas.

Embora o timo continue a gerar linfócitos T no decorrer da vida, ele não possui capacidade de gerar células precursoras por si mesmo, dependendo da colonização por precursores linfoides provenientes da medula óssea (73). Esses progenitores linfoides adentram o parênquima tímico através do córtex perimedular (PMC), uma região bem vascularizada que se encontra próxima à junção córtico-medular (exemplificada como Z-1 na figura 1.4) (74). Nessa região os progenitores multipotentes se expandem e são denominados de timócitos duplo-negativos no estágio 1 (DN1), devido à ausência das moléculas de superfície CD4 e CD8, características de linfócitos T maduros. Com isso, eles são caracterizados fenotipicamente como CD25⁻CD44⁺ (69). Na região Z-2 (córtex interno) os timócitos começam o rearranjo do receptor de células T (TCR), do tipo $\gamma\delta$, através da expressão dos genes *Rag1* e *Rag2*, responsáveis pela recombinação gênica que fará cada linfócito possuir um TCR único. Nesse estágio, os timócitos são denominados DN2 CD25⁺CD44⁺ (75). Continuando sua migração em direção à capsula, ao passar pelo córtex externo (Z-3), os timócitos DN2 passam a DN3 (CD25⁺CD44^{low}) ao se comprometerem definitivamente com a linhagem T. Isso ocorre ao terminarem o rearranjo da cadeia β do TCR, se separando entre timócitos $\gamma\delta$ ou β . Os timócitos DN3

passam pela seleção β , em que precisam sinalizar corretamente através do pré-TCR, que consiste no heterodímero formado pelo pré-T α associado à cadeia β (76,77). Passado esse estágio, a célula está totalmente comprometida com a linhagem T, passando pela região subcapsular Z-4 amadurecida em DN4 (CD25⁺CD44⁻).

Enquanto essas células retornam em direção à medula, após a sinalização pelo pré-TCR, ocorre uma extensa proliferação e também a regulação positiva da expressão de CD4 e CD8. Assim, nesse estágio elas começam a serem chamadas de timócitos duplo-positivos (DP). As células DP continuam migrando, rearranjam a cadeia α do TCR, formando um TCR $\alpha\beta$ pronto em Z-5, onde passarão pelo estágio de seleção positiva. Nessa seleção ocorre a apresentação de antígenos do próprio organismo pelas cTECs e pelas células dendríticas (DCs), através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I ou MHC II). Caso esse complexo MHC-antígeno próprio não seja reconhecido pelo TCR da célula DP, a célula é descartada. Caso o TCR tenha maior avides pelo complexo com MHC I, essa célula perde a expressão do CD4 e se torna uma célula CD8 simples-positiva (SP).; Caso a avides maior seja pelo complexo com MHC II, ela perde a expressão do CD8, se tornando uma CD4 SP (78). Os timócitos SP agora migram em direção à medula, passam por uma região rica em DCs em Z-6, e passam por outro estágio seletivo, a seleção negativa. Essa seleção permite eliminar timócitos SP que possuem alta afinidade por antígenos próprios, diminuindo a chance de gerar linfócitos que respondam contra o próprio organismo (79). Essas células SP continuam as etapas de maturação e seleção negativa em contato com as mTECs. Estas desempenham um papel central na regulação do desenvolvimento final dos timócitos. Além de serem fonte de quimiocinas, como a CCL21 e a XCL1, que promovem a migração de timócitos SP selecionados positivamente e DCs para a medula, as mTEC têm a propriedade de expressar ectopicamente a maior parte de todos os auto-antígenos (Abramson & Anderson, 2017). Essa expressão de grupos de antígenos de restrição tecidual (TRA; do inglês, *tissue-restricted antigen*) garante que a medula tímica proveja interações com afinidade muito alta entre os complexos peptídeo-MHC e os TCRs dos timócitos, com conseqüente deleção dessas células potencialmente autorreativas. As mTECs facilitam ainda a apresentação cruzada desses antígenos TRA por DCs medulares aumentando a eficiência do processo de seleção negativa dos timócitos. Cabe salientar também que as mTECs promovem a maturação de outras linhagens de linfócitos T, como as células $\gamma\delta$ e as células iNKT (células T *natural killer* invariantes e, ao proporcionarem interações de média a alta afinidade dos complexos peptídeo-

MHC com os TCRs, levam à diferenciação de timócitos CD4 SP em células T reguladoras (Treg) Foxp3⁺. Por fim, as subpopulações de timócitos SP selecionados e diferenciados ganham a expressão do receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P1) e perdem a expressão de CD69, o que faz com que essas células maduras se direcionem à corrente sanguínea (65,69–71,80).

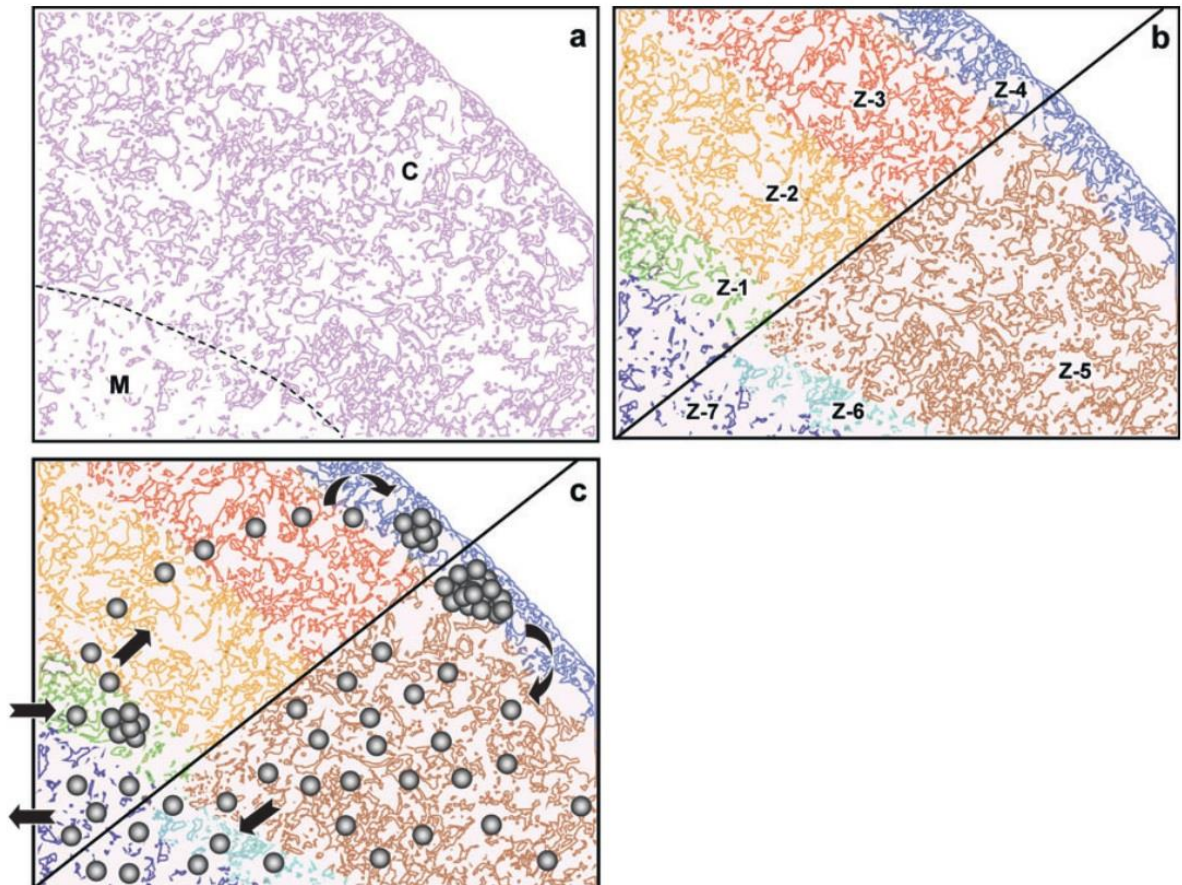


Figura 14: Sequência de desenvolvimento de linfócitos T nas sete sub-regiões tímicas. (a) representação esquemática do padrão de distribuição de citoqueratina através de secção transversal do timo, definindo o córtex (C) a medula (M) em de acordo com sua densidade. (b) sub-regiões enumeradas de Z-1 a Z-7. A linha diagonal separa as regiões mais externas, para onde as DN se direcionam (esquerda superior), das regiões internas, para qual as células DP e SP se direcionam (direita inferior). (c) Padrão de movimentação dos timócitos (69).

1.4.1.a. Timócitos e a superfamília do TGF- β

Membros da superfamília do TGF- β possuem grande influência na diferenciação de linfócitos T e na homeostase tímica. Eles podem agir tanto de forma parácrina, produzidos por células estromais e agindo no desenvolvimento dos timócitos, quanto de forma autócrina, produzidos pelos próprios timócitos. Sabe-se ainda que alguns desse fatores estão presentes de forma sistêmica, porém não é possível afirmar se concentrações sistêmicas são capazes de exercer função na timopoiese (15).

Pode-se observar a importância dos membros dessa família no desenvolvimento de timócitos, por exemplo, através da regulação da transição de DN1 para DN3 e de DN para DP pela sinalização por BMP2 e BMP4 via BMPRIA e BMPRIB (56,81,82). Activina A e inibina A também são capazes de regular a transição em estágios distintos. Mais especificamente, a activina A promove o acúmulo de uma população intermediária CD8⁺CD24^{hi}TCRβ^{lo}, enquanto a inibina A promove a transição de DN4 para DP (83). A inibição de TGFβRIII em cultura organotípica de timo fetal (FTOC; do inglês, *fetal thymus organ culture*) atrasa a transição de DN para DP, além da consequente diminuição de timócitos (84). Além disso, os componentes intracelulares de via de sinalização, Smad2/3 e Smad4, também foram encontrados em timócitos fetais e timócitos DN de adultos (85,86) e a inibição de Smad1, Smad5 e Smad8 também prejudicou a proliferação e a diferenciação de linfócitos T maduros (87).

Outro indicativo da influência dos membros dessa superfamília em timócitos ocorre ao estudar bases de dados de sequenciamento genômico. Isso nos permite observar a expressão de RNA e consequentemente a capacidade de produção que diversas células possuem em relação a diversas moléculas, inclusive em resposta à essa superfamília (88) (Figura 1.5).

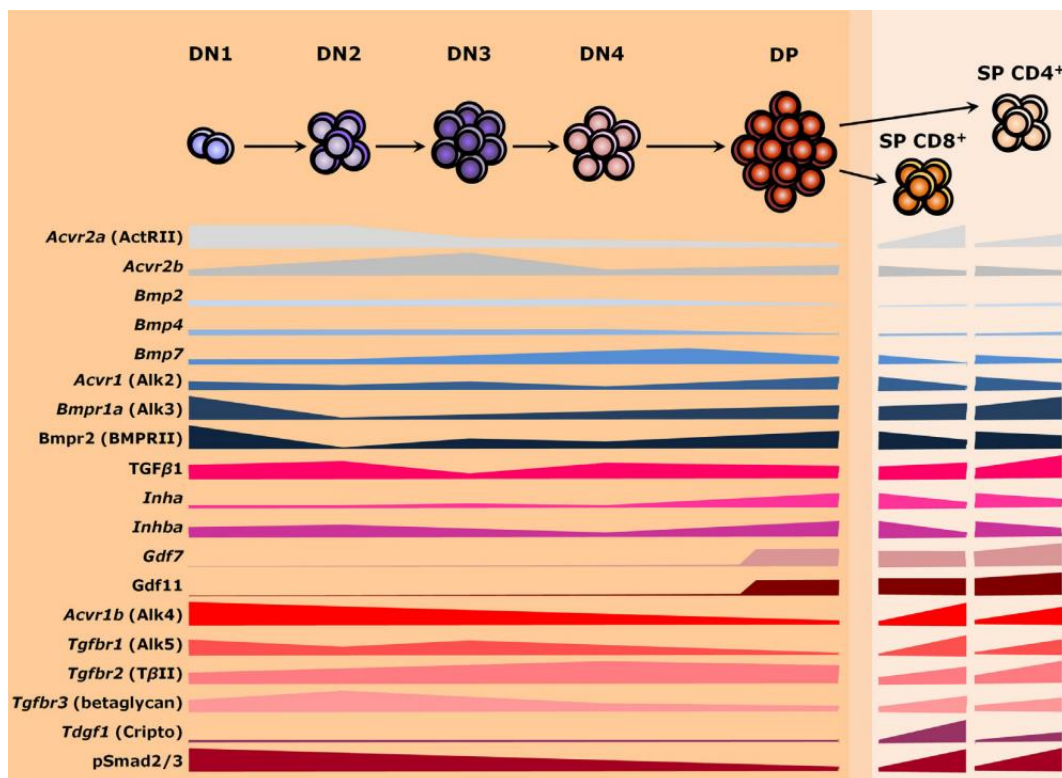


Figura 1: Expressão gênica relativa, baseada em dados de transcriptoma, de diversos membros da superfamília do TGF-β nos diversos estágios de desenvolvimento dos timócitos. Figura de Jurberg et. al. (15).

1.4.2. Baço

Localizado no lado esquerdo do abdômen, diretamente abaixo do diafragma e conectado ao estômago, o baço é largamente conhecido por sua capacidade de filtrar o sangue (Figura 1.6). Responsável por remover os eritrócitos alterados e restos celulares, é ainda considerado um órgão linfoide secundário do sistema imune, em que a imunidade inata e adaptativa funcionam organizadas de modo singular. Histologicamente, o baço pode ser dividido em duas regiões, a polpa branca e a polpa vermelha, sendo a região intermediária a elas denominada de zona marginal (Figura 1.7) (revisado em 78). É interessante salientar também que o baço é ainda responsável pelo desenvolvimento final de precursores de linfócitos B proveniente da medula óssea de camundongos (90).

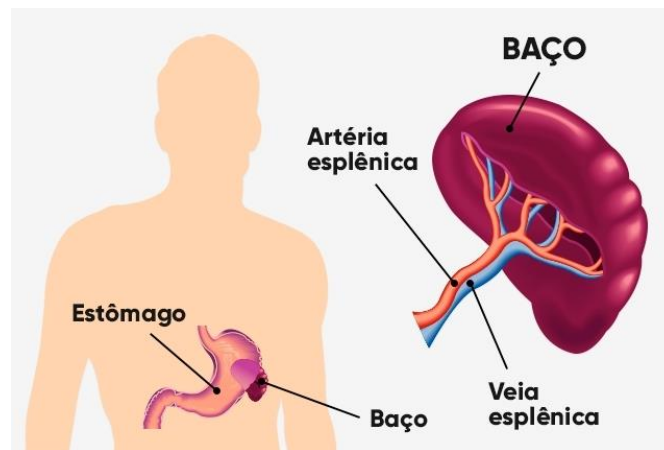


Figura 1 Esquema ilustrativo da localização anatômica do baço em humanos https://static.tuasaude.com/media/article/df/he/baco_26140_1.jpg acessado em 08/09/2018.

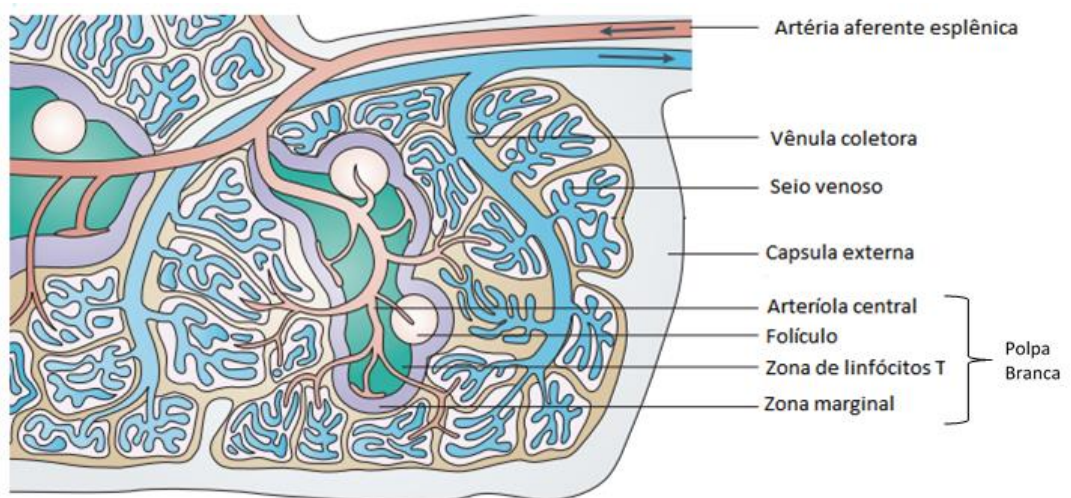


Figura 17: Representação esquemática da histologia do baço. Em vermelho, o sangue arterial adentra ao órgão se dirigindo primeiramente a polpa branca (em verde), delimitada pela zona marginal (roxo). Em branco dentro na polpa branca temos os folículos germinativos. O sangue após passar pela polpa branca, é filtrado pelos seios venosos da polpa vermelha (azul), seguindo para as vênulas coletoras e posterior saída do órgão. Adaptado de Mebius e Kraal (89).

A polpa vermelha consiste de um sistema sanguíneo aberto, sem delimitação endotelial. No seu lugar existem cordões de fibroblastos e fibras reticulares repletos de macrófagos que direcionam o sangue ao seio venoso. O seio venoso é formado por células endoteliais paralelas envolvidas por fibras, que possibilitam a formação de pequenas passagens entre as células endoteliais, por onde o sangue flui. Caso os eritrócitos estejam velhos, sua membrana mais rígida não permite que eles passem, sendo então fagocitados pelos macrófagos residentes ali presentes, responsáveis também pela reciclagem do ferro desses eritrócitos (Figura 1.8) (89,91).

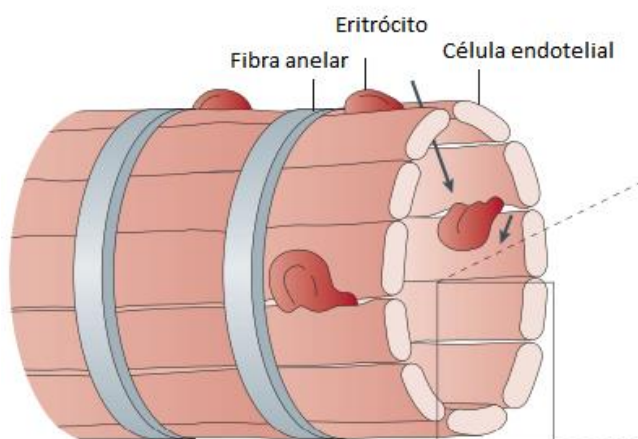


Figura 18: Representação esquemática do seio venoso. Eritrócitos que possuem a membrana celular mais rígida ficam retidos entre as células endoteliais. Adaptado de Mebius e Kraal (89).

A polpa branca é a região linfóide pela qual ocorre a chegada do fluxo sanguíneo pelas arteríolas centrais. Ela é predominantemente constituída de linfócitos T e linfócitos B, organizados em regiões separadas, de forma similar aos linfonodos. Essa organização é mantida devido à produção de quimiocinas produzidas por células estromais, como CCL21, quimiotática para linfócitos T e células dendríticas (92), e CXCL13, quimiotática para linfócitos B (Figura 1.9) (93). Essa chegada contínua do fluxo sanguíneo é uma maneira eficiente de triagem de patógenos e antígenos, ocorrendo primeiramente na zona marginal, antes de chegar na polpa branca. A zona marginal possui dois tipos diferentes de macrófagos: os macrófagos de zona marginal, que formam um anel externo à zona marginal, e os macrófagos metalofílicos de zona marginal, que fazem um anel interno à zona marginal (94,95). Entre esses dois anéis de macrófagos, existem os linfócitos B de zona marginal (MZB; do inglês, *marginal zone B cells*) e as DCs (96).

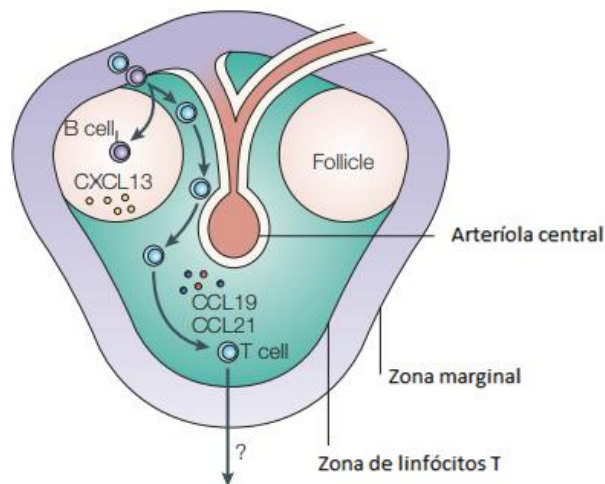


Figura 19: Representação esquemática da polpa branca. Linfócitos migram para a polpa branca através da zona marginal devido a sinalização por citocinas. CXCL13 atrai os linfócitos B para os folículos enquanto CCL21 e CCL19 atraem os linfócitos T para sua respectiva zona. Não é claro como os linfócitos T saem da polpa branca. Adaptado de Mebius e Kraal (89).

Com o constante monitoramento do fluxo sanguíneo pela zona marginal, caso ocorra a identificação de algum patógeno, os macrófagos residentes produzem interferon- α e interferon- β , duas citocinas inflamatórias características da imunidade inata (97). Os linfócitos MZB também são capazes de identificar patógenos na corrente sanguínea, possuindo um receptor de células B (BCR) muito menos específico, que possibilita uma ligação com múltiplos patógenos e uma resposta rápida, quase que inata, mesmo que seja através da produção de IgM. Essas células MZB e alguns linfócitos T com as mesmas características são consideradas linfócitos “innate-like” (96,98). As células MZB regulam negativamente S1P, o que as permite responder à CXCL13, quimiocina reguladora da formação dos folículos de órgãos linfóides, e migrar em conjunto com as DCs para a polpa branca, atuando como célula apresentadora de antígeno (APC) e ativando linfócitos T CD4⁺ (99). Esse evento marca um importante passo para a iniciação da resposta imune adaptativa. Após as DCs provenientes da periferia apresentarem antígenos para os linfócitos B foliculares, esses sofrem expansão clonal, aumentando o tamanho dos folículos e se transformam em plasmócitos, linfócitos B especializados na produção de anticorpos. A interação entre os linfócitos T CD4⁺ ativados com os linfócitos B ativados dos folículos ocasionará a mudança de isotipo do anticorpo produzido pelos linfócitos B e esses então migrarão para a polpa vermelha na forma de plasmócitos (100–102).

É importante ressaltar ainda um pouco do papel do baço na maturação final de linfócitos B em camundongos. Linfócitos B imaturos entram na circulação provenientes

da medula óssea já com o seu rearranjo genético realizado. Essas células adentram o baço como linfócitos B transitórios, que podem ser diferenciados entre transitórios do tipo 1 ou do tipo 2 com base na expressão de CD24 e CD21 (103). Os linfócitos B transitórios do tipo 2 são capazes de se diferenciar em MZB ou linfócitos B foliculares. Embora tanto os linfócitos MZB quanto os linfócitos B foliculares se diferenciem em plasmócitos após o contato com antígeno, os linfócitos MZB se tornam plasmócitos de vida curta, com produção de anticorpos de afinidade mais baixa do que os plasmócitos de vida longa, que são provenientes dos linfócitos B foliculares. Esses últimos podem ainda se transformar em linfócitos B de memória, que são responsáveis, juntamente com os linfócitos T de memória, por uma das características mais importantes da imunidade adaptativa, a memória imunológica (revisado pela referência 79).

1.4.3. GDF11 e o sistema imune

O número de estudos sobre a função celular do GDF11 aumentou consideravelmente após 2013, devido ao trabalho de Loffredo et al. (24) que o indicava como agente rejuvenescedor do tecido muscular cardíaco. Neste trabalho, é interessante ressaltar, foi realizado quantificações de RNA mensageiro por RT-qPCR que demonstraram o baço e o timo, ambos órgãos do sistema imune, como estando entre os três principais órgãos com expressão para seu RNA (Figura 1.10). Assim, esses dados apresentaram a indicação relevante de que o GDF11 pode estar sendo produzido nesses órgãos, com sugestão de potencial função no sistema imune.

De fato, em estudo experimental de doença de Alzheimer, Wang et al. (2015) demonstraram que a transferência intravenosa de esplenócitos de um camundongo jovem para um camundongo doente foi capaz de aumentar os níveis séricos de GDF11 e foram capazes de reverter os sintomas da doença (42). O papel do GDF11 neste caso foi confirmado em outro trabalho mais recente em que o GDF11 se mostrou novamente como rejuvenescedor da estrutura vascular cerebral em modelo de doença de Alzheimer (104). Porém, em relação ao sistema imune, é curioso que no primeiro trabalho o aumento do nível sérico de GDF11 foi devido aos esplenócitos transferidos, o que indica que GDF11 pode ser produzido ativamente por essas células no baço. Somado a esses fatores, estudos de mapeamento de expressão de proteínas, baseados em transcriptômica quantitativa e imunistoquímica, confirmam os elevados níveis de GDF11 no baço (105). Em sua maior parte, macrófagos e linfócitos, parecem

ser seus principais produtores. Possuímos, inclusive, dados preliminares posteriores a esse projeto, que indicam a produção de GDF11/8 por alguns macrófagos F4/80⁺ no timo de camundongos (Figura 1.10).

No caso do timo, ao lançar mão de base de dados de expressão gênica (15) como foi possível observar na Figura 1.5, *GDF11* parece ser expresso em timócitos DP e SP. Em relação aos seus receptores, a expressão de *Acvr1b* (ALK4) parece diminuir com o grau de desenvolvimento de DN1 para DP, aumentando novamente nas células SP, principalmente CD8⁺. Algo similar ocorre com *TGFbr1* (ALK5), com exceção do estágio de DN3, que apresenta um pequeno aumento de expressão para esse receptor (15).

Nesse contexto, realizamos uma pesquisa mais detalhada na base de dados do ImmGen (*Immunological Genome Project*), uma plataforma de dados de expressão gênica em células do sistema imune de camundongos (106). Mais especificamente, dentro desta plataforma foi utilizada a base de dados *Gene Skyline*, exclusiva para o sequenciamento de RNA (RNA-Seq), visando o mapeamento da expressão de GDF11 e seus receptores, em diversas células do sistema imune. Com isso, podemos observar, por exemplo, que entre os timócitos, o *GDF11* tem alta expressão em células SP, principalmente CD4⁺ SP, porém possuindo expressão em todos os estágios de desenvolvimento (Figura 1.10-A). Nós observamos que *Acvr1b* (ALK4) é bem expresso nos primeiros estágios de desenvolvimento DN1 e DN2, porém, o que chama atenção é o alto nível de expressão em células T CD4⁺ naive do baço (T.4.Nve.Sp; Figura 1.10-B). Por outro lado, o receptor ALK5 (*TGFbr1*) possui expressão comparativamente constante em todos os estágios de maturação, destacando-se positivamente as células DP (Figura 1.10-C). Por fim, o gene *Acvr1c* (ALK7) possui baixa expressão em todos os estágios de desenvolvimento, novamente sendo as células CD4⁺ SP as que se destacam positivamente (Figura 1.10-D).

Através de dados da literatura e do uso de base de dados de sequenciamento genético, é possível realizar algumas pontuações. Os membros da família do TGF- β , incluindo o GDF11, exercem funções indispensáveis para o correto funcionamento do organismo. O sistema imune está envolvido diretamente, visto que as activinas, os TGFs e os BMPs possuem funções em diversas células imunes, como timócitos e linfócitos T e B maduros. O GDF11 é capaz de desempenhar funções celulares importantes, como ativar ou inibir osteoblastos, estimular a vasculogênese cerebral e neurogênese, inibir a eritropoiese, regular a migração e a diferenciação de células progenitoras endoteliais sanguíneas, bem como a migração e a proliferação de

células-tronco neurais (25,40,41,43,45–50,105). Somado a isso, ele possui ainda alta concentração de RNAm no timo e baço, e seus receptores ALK4, ALK5 e ALK7 têm expressão de RNAm positiva em diferentes subgrupos celulares de maturação tímica. Temos ainda forte indício de que existe produção de GDF11/8 no timo. Esses dados sugerem que possa haver uma relação entre GDF11 e o sistema imune, principalmente no que se relaciona com a maturação de timócitos e função de linfócitos T.

O sistema imune é um complexo sistema celular, do qual eventos de ativação, proliferação e migração celular, fazem parte do seu correto funcionamento. Sendo assim existe constante interesse sobre o estudo de moléculas solúveis capazes de modular o funcionamento do sistema imune. Possuímos fortes indicativos de que o GDF11 é uma dessas moléculas, principalmente em relação aos timócitos e linfócitos T. Entretanto não existem atualmente estudos publicados na literatura que visam investigar a relação do GDF11 com sistema imune e seus subgrupos celulares. Sendo assim esse trabalho procura investigar os tipos celulares que possuem a maquinaria necessária para qual o GDF11 poderia exercer algum tipo de ação, e se ele é capaz de modular a viabilidade dessas células.

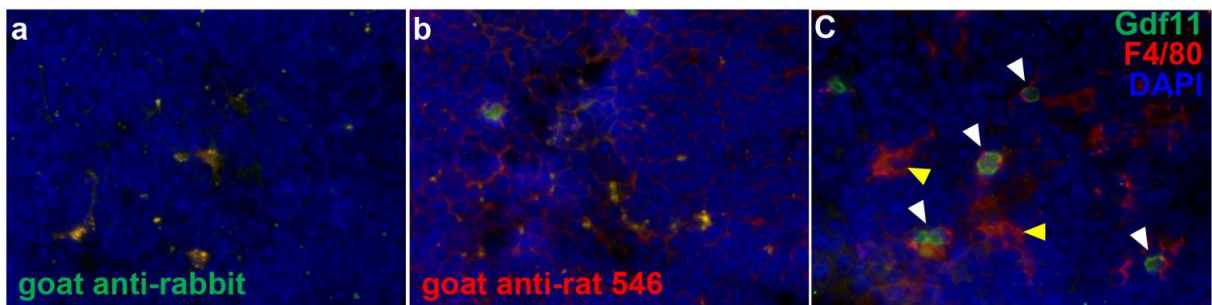


Figura 1.10: Distribuição de GDF11 no timo de camundongo. Microscopia de Imunofluorescência convencional. (A,B) Controle dos anticorpos secundários. (C) Alguns macrófagos F4/80⁺ são capazes de produzir GDF11/8, setas brancas, enquanto outros não, setas amarelas. Dado preliminar não publicado realizado por Jurberg A.

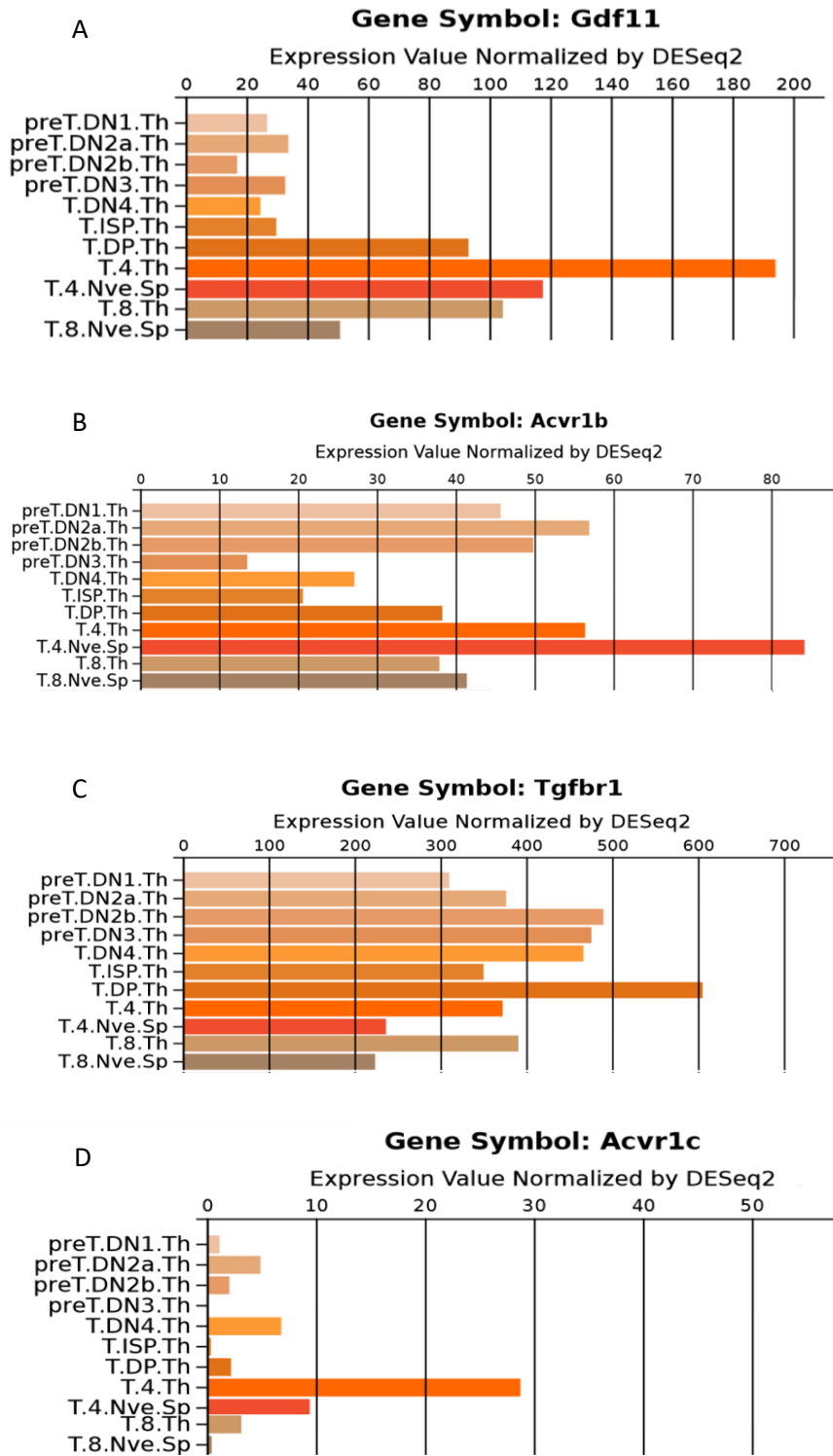


Figura 111: Expressão de RNAm para GDF11 (A), ALK4 (B), ALK5 (C) e ALK7 (D) em timócitos e linfócitos T maduros. Células precursoras proveniente da medula óssea levam a sigla “preT”, seguido do estágio de desenvolvimento (DN1, DN2 ou DN3). Células comprometidas com a linhagem T possuem somente “T” no início, seguido pelo tipo celular (DP, 4, ou 8). “Nve” indica linfócitos *naive*, “Th” indica que a célula ainda está no timo e “Sp” que é um linfócito T maduro. Dados obtidos por sequenciamento de RNA (RNA-Seq) analisados pela ferramenta DESeq2, que realiza uma análise diferencial da expressão gênica baseada em uma distribuição negativa não binomial. Genes foram pesquisados em <http://rstats.immgen.org/Skyline/skyline.html> acessado pela última vez em 08/10/2018.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto é investigar o papel da sinalização por GDF11 em órgãos linfoides e a sua influência sobre a função de células do sistema imunológico. Buscaremos desvendar a potencial função dessa sinalização em tecidos linfoides tímico e esplênico e, mais especificamente, em populações de linfócitos T. Assim, nossos objetivos específicos são:

- 1) Caracterizar a presença de GDF11 e seus receptores (ALK4, ALK5 e ALK7) no timo como órgão linfoide primário gerador de linfócitos T, com análise das subpopulações de timócitos;
- 2) Realizar a caracterização da expressão de GDF11 e seus receptores no baço, como exemplo de órgão linfoide secundário, avaliando as subpopulações linfoides e mieloides;
- 3) Avaliar o papel de GDF11 como possível regulador de viabilidade celular, especificamente nos estágios de maturação de linfócitos T.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Utilizou-se camundongos BALB/c com idade de 2 a 4 meses. A utilização desses animais está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e sob aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA), licenciado pelo número L-046/2015. Os animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

3.2. Moléculas utilizadas

Tabela 3.1: Lista das moléculas empregadas na caracterização da via de GDF11 em timo e baço de camundongos BALB/c.

Anticorpos primários ou conjugados				
Anticorpo	Clone	Conjugado com:	Fabricante	Código
anti-CD3	145-2C11	APC	BD	555335
anti-CD4	GK1.5	APC-Cy7	BD	552051
anti-CD8	53-6.7	PE	BD	553033
anti-CD8	53-6.7	PE-Cy7	eBioscience	2008182
anti-CD11b	M1/70	APC	eBioscience	170111281
anti-CD11c	N418	Percp-Cy5.5	eBioscience	45011480
anti-CD19	1D3	Percp-Cy5.5	BD	551001
anti-CD21	7G6	APC	BD	558658
anti-CD23	B3B4	PE	Biolegend	101607
anti-CD24	M1/69	PE-Cy7	BD	560536
anti-Ly6G	RB6-8C5	PE	BD	553128
anti-ALK4	EPR4815	Não conjugado	Abcam	EPR4815
anti-ALK5	policlonal	Não conjugado	Millipore	AFB17
anti-ALK7	policlonal	Não conjugado	Thermo Fisher Scientific	PA5-13884
anti-GDF8/GDF11	EPR4567	Não conjugado	Abcam	ab124721
anti-GDF11	polyclonal	Não conjugado	R&D Systems	AF1958
anti-F4/80	CI:A3-1	Não conjugado	Abcam	ab6640
Anticorpos secundários				
Anticorpo	Clone	Fabricante	Código	
Cabra anti-coelho IgG AlexaFluor 488	policlonal	Molecular Probes	A11008	
Cabra anti-rato IgG AlexaFluor 546	policlonal	Molecular Probes	A11081	
Burro anti-cabra IgG AlexaFluor 633	policlonal	Invitrogen	A21082	
Cabra anti-coelho IgG AlexaFluor 633	policlonal	Invitrogen	A21070	

Outros		
GDF11 recombinante	Peprotech	120-11
7-AAD	BD	559925
Anexina V-FITC	R&D Systems	NX50

3.3. Obtenção de células

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e, em seguida, foi retirado o timo e o baço de cada animal. Os timos foram macerados em tecido *voil*, que funciona como filtro, utilizando placas de petri de 3,5 cm (Jet Biofil®) e 1 mL de meio RPMI + 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich). As células foram passadas para um tubo Falcon® de 15mL e o volume foi completado com mais 4 mL de RPMI + 10% SFB. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4° C (Thermo Scientific, SORVALL ST16R) e os sobrenadantes desprezados. As células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI + 10% SFB e mantidas no gelo.

Os baços foram macerados em tecido *voil* utilizando placas de petri de 3,5 cm e 1 mL de solução salina (PBS). As células foram passadas para um tubo Falcon® de 15 mL e o volume foi completado com mais 4 mL de PBS. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4° C e os sobrenadantes desprezados. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise de hemáceas (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™ R7757) por 1 min. Após esse tempo o volume foi completado com mais 9 mL de PBS + 10% SFB e os tubos foram centrifugados novamente a 400 g por 5 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram desprezados e as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI + 10% SFB e mantidas no gelo. As suspensões celulares foram utilizadas para os ensaios que envolveram citometria de fluxo.

3.4. Caracterização das populações celulares por citometria de fluxo

Para a realização das marcações, utilizamos placas de PVC com 96 poços de fundo em “U” (Alfa®, São Paulo, Brasil), onde plaqueamos 1 x 10⁶ células por poço. Foram adicionados 100 µL de RPMI + 10% SFB em cada poço e as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4° C. Para bloquear as ligações inespecíficas, foi adicionado às células 50 µL de PBS + 2% soro normal de camundongo (SNC) por 15 min., com posterior adição de 100 µL de PBS e centrifugação a 400 g por 5 min. a 4° C. Em um primeiro momento, a marcação utilizando anticorpos não conjugados a fluoróforos, conforme indicado na Tabela 3.1, foi realizada pela adição de 10 µL por poço de solução de PBS + 5% SFB contendo os anticorpos diluídos. As placas foram

incubadas a 4-8° C no escuro, por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com 100 µL de PBS e a marcação indireta, utilizando anticorpos secundários conjugados a fluoróforos conforme indicado na Tabela 3.1, foi realizada. Os anticorpos secundários foram então diluídos em solução de PBS + 5% SFB, e 10 µL dessa solução foi adicionado por poço. As células foram mantidas a 4-8° C, no escuro, por 30 minutos. Depois dessa incubação, elas foram lavadas com 100 µL de PBS, por três vezes. A marcação indireta foi realizada primeiramente que os anticorpos conjugados, afim de eliminar qualquer possível ligação inespecífica entre os anticorpos secundários utilizados e os anticorpos primários conjugados utilizados por último. Dessa forma, em seguida a marcação com os anticorpos conjugados a fluoróforos foi realizada pela adição de 10 µL por poço de solução contendo os mesmos, diluídos em PBS + 5% SFB. As células foram mantidas a 4-8° C, no escuro, por 30 min. Depois da incubação, as células foram lavadas com 100 µL de PBS, ressuspensas em 200 µL de PBS após a última lavagem e então analisadas por citometria de fluxo com o citômetro FACS Canto II (Becton Dickinson, New Jersey, E.U.A). Para ajuste da voltagem dos detectores e controles de cor para compensação, foram utilizadas células sem marcação e células com marcações simples de cada fluoróforo, além de controles de FMO (fluorescência menos um) para o correto posicionamento das regiões de análise (*gates*). Foram adquiridos 100.000 eventos dentro da região correspondente à população linfóide majoritária em gráfico bidimensional com os parâmetros de dispersão frontal (FSC; *forward scatter*) e dispersão lateral (SSC; *side scatter*) da luz incidente. As análises dos dados adquiridos foram realizadas no programa Flow Jo (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, E.U.A).

3.5. Caracterização de órgãos linfóides por microscopia confocal

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e, em seguida, foram retirados o timo e baço de cada animal. Os órgãos inteiros foram colocados em moldes de plástico e embebidos em Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura, Torrance, EUA), sendo em seguida congelados em gelo seco. Os blocos congelados foram posteriormente armazenados em freezers -80° C. Essa matriz contendo o órgão foi então seccionada em cortes de 5 µm em criostato (Leica 1350, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) à temperatura de -15° C e as secções obtidas foram dispostas em lâminas de vidro para histologia. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 30 min e em seguida foram fixadas em acetona a 100%, previamente gelada, por 10 min. Essas lâminas foram armazenadas por até 2 semanas a -20° C.

Para realização da marcação, foi utilizado o método de imunofluorescência indireta. As lâminas foram retiradas do freezer e os cortes histológicos foram circulados utilizando caneta hidrofóbica. Em seguida, os cortes foram reidratados em PBS por 5 min. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com uma mistura de PBS + 2% de leite em pó desnatado Molico Nestlé® + 2,5% albumina de soro bovino – BSA + 8% SFB) por 15 min. Os cortes foram lavados três vezes em PBS por 5 min./cada antes da adição dos anticorpos conjugados diluídos em PBS (em quantidade suficiente para cobrir o órgão – cerca de 30 µL a 50 µL), conforme indicado na Tabela 3.1. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida, por 1 hora. Elas foram então lavadas três vezes para posterior marcação com os anticorpos primários não-conjugados, também listados na Tabela 3.1, sendo incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes para posterior marcação com os anticorpos secundários correspondentes (Tabela 3.1). Eles foram incubados à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 min., sendo em seguida lavados em PBS por três vezes. Por fim, as lâminas foram secas e montadas com meio de montagem ProLong™ Gold Antifade contendo DAPI (Thermo Fisher Scientific) para marcação nuclear. As lâminas montadas permaneceram à temperatura ambiente e no escuro por 72 h para secagem do meio de montagem e então foram armazenadas a -4° C. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio confocal (Leica TCS SP8 - Leica Microsystems, Wetzlar - Alemanha).

3.6. Ensaio de morte celular

Os timócitos foram obtidos conforme descrito no item 3.2 e corados em solução de azul de Trypan diluída 1:100 para contagem em câmara de Neubauer. Algumas células foram coletadas logo em seguida (t_0) para análise *ex vivo* de anti-CD4, anti-CD8, anexina V e 7-AAD por citometria de fluxo (Tabela 3.1), conforme descrito a seguir. Para avaliarmos o papel de GDF11 recombinante (rGDF11) na morte dos timócitos, nós realizamos uma cinética de ativação por CD3e em placas de PVC com 96 poços de fundo chato, onde plaqueamos 1×10^6 células por poço. As placas foram previamente revestidas com 30 µL do anticorpo diluído a 10 µg/mL em PBS e incubadas a 37° C por 2 h, para que ocorresse a aderência do anticorpo ao fundo. Em seguida, elas foram lavadas com PBS para a remoção do anticorpo não-ligado. Para os controles não-estimulados, nós utilizamos poços contendo apenas PBS. Assim, grupos não-estimulados e estimulados por CD3e, na presença ou não de 10 ng/mL

ou 100 ng/mL de rGDF11 diluído em 80 µL de meio RPMI + SFB a 10%, foram cultivados a 37° C por 12 e 24 h. Após os períodos indicados de cultura, as células foram transferidas para placa de PVC de 96 poços, com fundo “U”, onde foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com 10 µL por poço de solução de PBS + SFB a 5%, contendo anticorpos conjugados diluídos contra os marcadores de superfície CD4 e CD8 (Tabela 3.1). As células foram mantidas a 4-8° C, no escuro, por 30 minutos. Depois, elas foram lavadas com 100 µL de PBS e ressuspensas em 100 µL de tampão para anexina V contendo 2 µL anexina V-FITC e e 3 µL de 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) (Tabela 3.1). As células foram incubadas no gelo por 15 min. e então analisadas por citometria de fluxo. Tais moléculas possibilitaram a identificação de três grupos distintos de viabilidade celular. Para tal, nós primeiramente realizamos a exclusão de *doublets* (Figura 3.1A) e retirada de *debris* (restos celulares) a partir da análise morfológica (Figura 3.1B). Após identificarmos as diferentes populações de timócitos (Figura 3.1C), nós realizamos a análise de morte celular por anexina-V x 7-AAD em cada subgrupo. As regiões de interesse, nomeadas anexina-V⁻7-AAD⁻, anexina-V⁺7-AAD⁻, anexina-V⁺7-AAD⁺, foram inicialmente identificadas na população de células totais nos tempos de 0, 12 e 24 horas (Figura 3.1D-F, respectivamente).

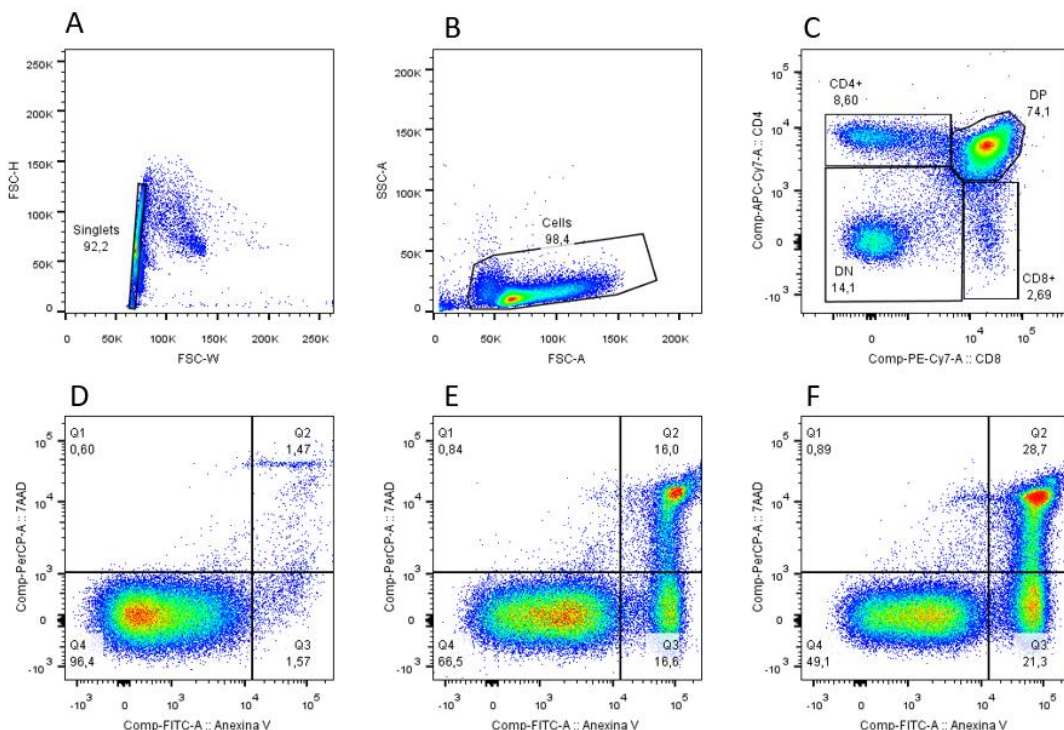


Figura 31: Estratégia de regiões de análise (*gating*) para Anexina-V x 7-AAD. (A) Exclusão de *doublets*. (B) Exclusão de *debris*. (C) Definição de subpopulações de maturação tímica através da marcação de CD4 vs. CD8. Progressão da apoptose e morte celular em função do tempo (D) 0 horas, (E) 12 h e (F) 24 h de cultura.

3.7. Estratégias de delimitação de subpopulações

Para realizar a caracterização dos receptores para o GDF11 em diversas subpopulações celulares tímicas e esplênicas, utilizamos diferentes estratégias de análise (*gating*). Em todos os casos, começamos pela exclusão de pares de células (*doublets*) e *debris* pela análise de FSC-H e FSC-W, parâmetros de análise dos pulsos de dispersão frontal (Figura 3.2A). A partir dessa estratégia, selecionamos um *gate* de células viáveis com base nos parâmetros SSC-A e FSC-A, indicativos na granulidade e tamanho, respectivamente (Figura 3.2B).

Para o estudo de timócitos, analisamos as subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, duplo positivas e duplo negativas através das marcações simultâneas contra CD4 e CD8 (Figura 3.2D). Em cada subpopulação, analisamos a presença dos receptores ALK4, ALK5 e ALK7 pela imunomarcagem indireta com AlexaFluor 488 (Tabela 2.1). Na figura 3.2C-G, pode-se observar o controle FMO para cada subpopulação. Como foram utilizados anticorpos não conjugados, esse controle FMO possui juntamente o anticorpo secundário AlexaFluor 488, visando observar qualquer marcação inespecífica e assim orientar na escolha da região (*gate*) positiva para os receptores.

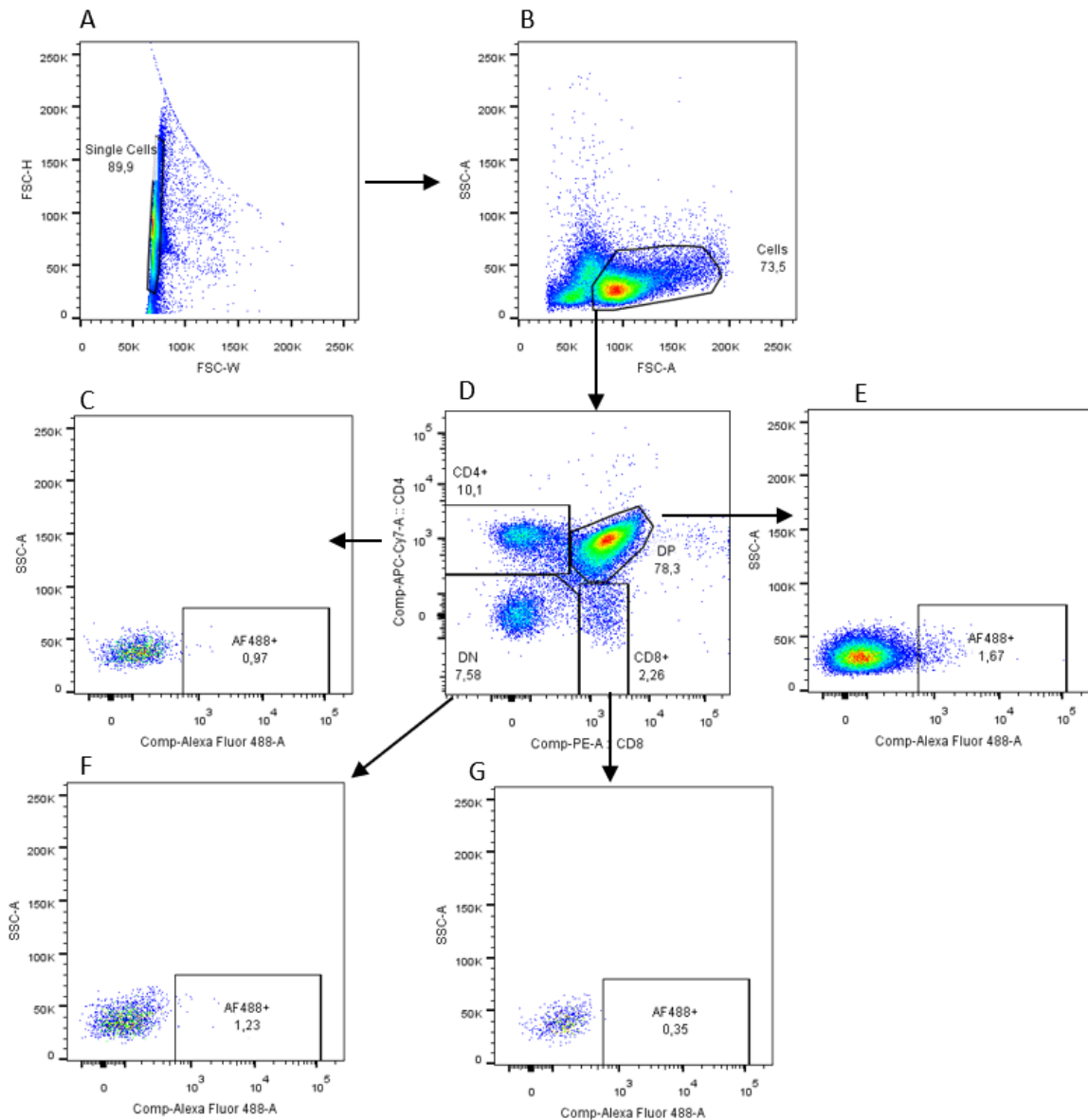


Figura 32: Estratégia de análise para os timócitos. (A) Exclusão de *doublets* e *debris*. (B) Definição de timócitos por análise morfológica. (D) Definição de subpopulações de maturação tímica através da marcação de CD4 vs. CD8. (C,E,F;G) Controles FMO com anticorpo secundário AlexaFluor488 para cada subpopulação.

Para o estudo de linfócitos T no baço, a partir da exclusão de *doublets* e *debris* e delimitação de células viáveis, como descrito anteriormente (Figura 3.3-A,B), selecionamos as células CD3⁺ para em sequência realizar a identificação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ através da análise simultânea das duas marcações (Figura 3.3C-F). Para cada subpopulação, analisamos a presença dos receptores ALK4, ALK5 e ALK7 pela imunomarcagem indireta com AlexaFluor488, que foi demonstrada na Figura 3.3D,E pelo controle FMO.

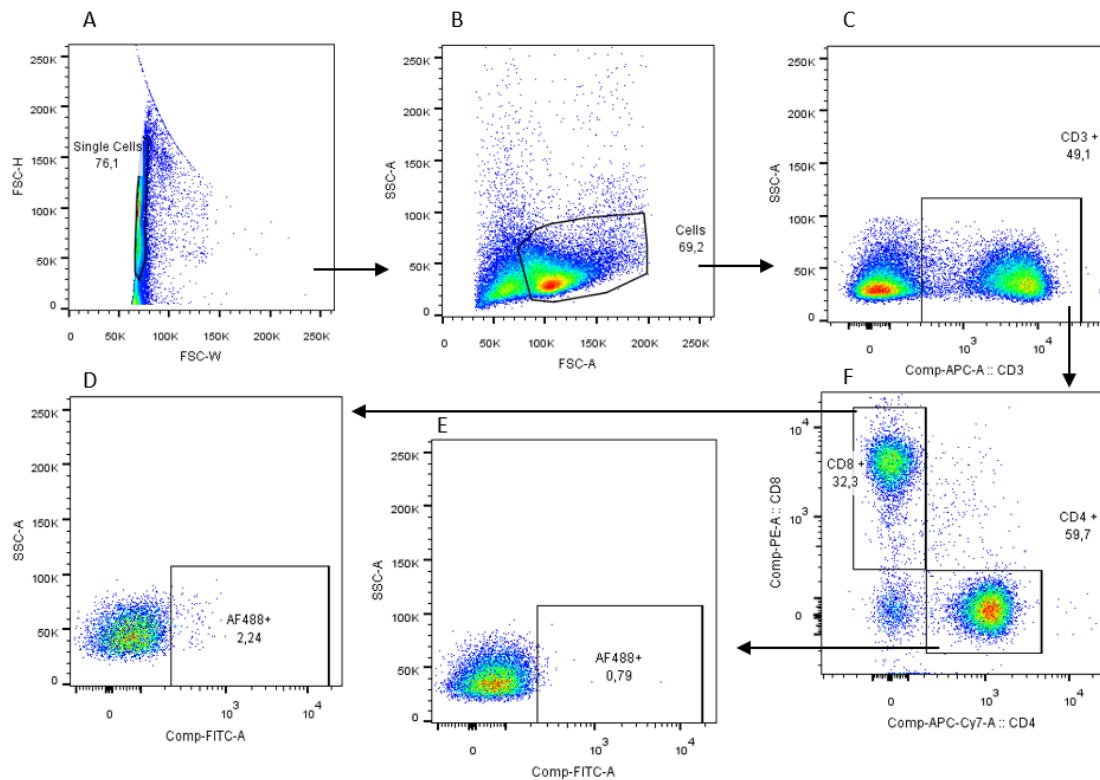


Figura 33: Estratégia de análise para linfócitos T no baço. (A) Exclusão de *doublets* e *debris*. (B) Definição de esplenócitos segundo análise morfológica. (C) Exclusão de células CD3⁻. (F) Definição de subpopulações de células simples positivas maduras no baço através da marcação de CD4 vs. CD8. (E;D) Controles FMO com anticorpo secundário AlexaFluor488 para cada subpopulação.

Para o estudo de linfócitos B no baço, a partir da exclusão de *doublets* e *debris* e delimitação de células viáveis como descrito anteriormente (Figura 3.4A,B), separamos a população de linfócitos B com base na marcação de CD19⁺ (Figura 3.4C). Em seguida, definimos os linfócitos B transicionais T1, transicionais T2/MZ (zona marginal) e FM (folicular maduro) com base na expressão de CD24 e CD21 (Figura 3.4-E). Posteriormente, separamos os linfócitos B T2 dos MZ com base na expressão de CD21 (Figura 3.4-F). Nas figuras 3.4-D;G;H;I temos os controles FMO da imunomarcação indireta com AlexaFluor488.

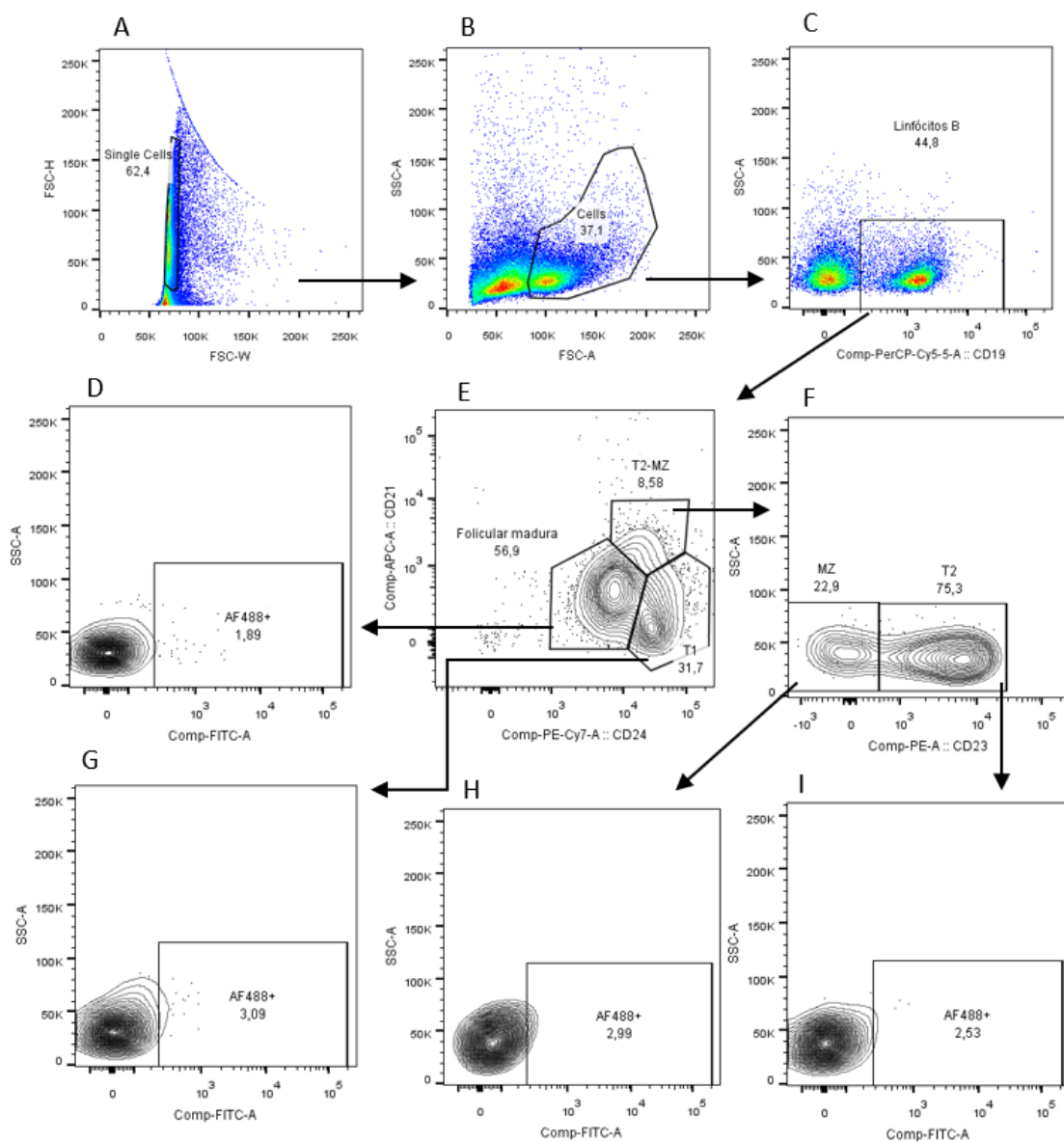


Figura 34: Estratégia de análise para linfócitos B no baço. (A) Exclusão de *doublets* e *debris*. (B) Definição de esplenócitos segundo análise morfológica. (C) Exclusão de células CD19⁻. (F) Definição de subpopulações de linfócitos B no baço através da marcação com CD21 vs. CD24. (F) Diferenciação entre linfócitos de zona marginal (MZ) e transitórios do tipo 2 (T2). (D;G;H;I) Controles FMO com anticorpo secundário AlexaFluor488 para cada subpopulação.

Para o estudo de células de origem mieloide no baço, a partir da exclusão de *doublets* e *debris* e delimitação de células viáveis (Figura 3.5A,B), selecionamos as células CD11b⁺, de origem mieloide (Figura 3.5C), para a análise das suas diferentes subpopulações a partir da expressão de CD11c e Ly6G (Figura 3.5D). Dessa forma identificamos células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺Ly6G⁻), macrófagos (CD11b⁺CD11c⁻Ly6G⁻) e granulócitos (CD11b⁺CD11c⁻Ly6G⁺). A Figura 3.5E representa o controle FMO referente a todas as células CD11b⁺.

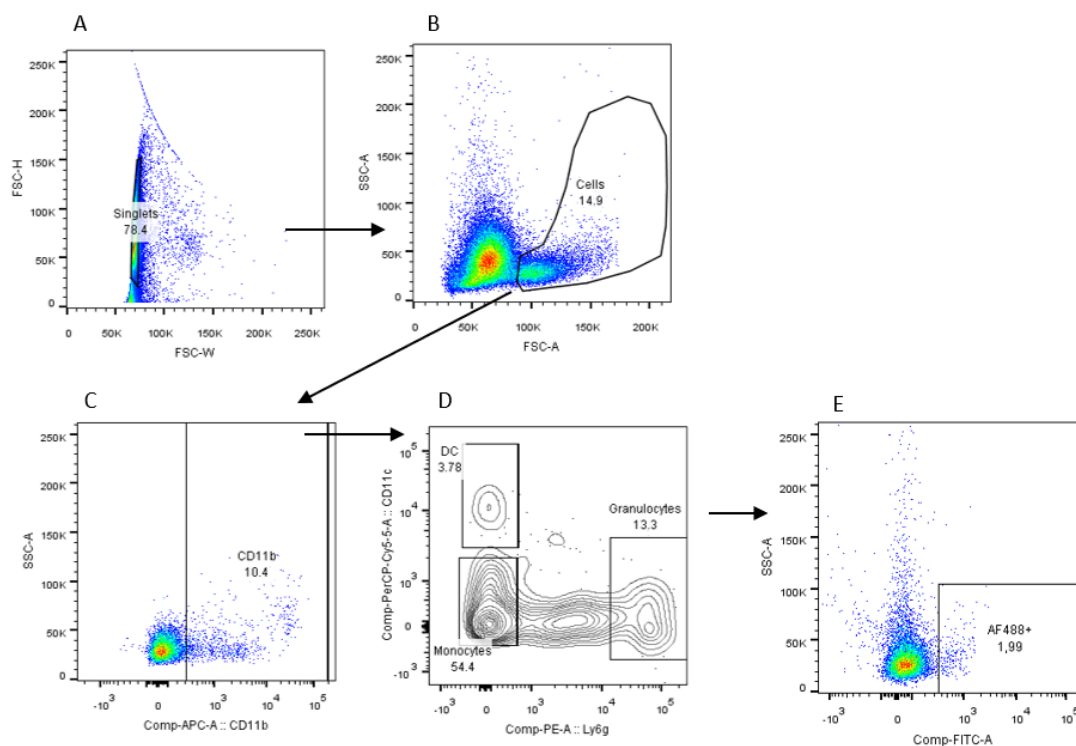


Figura 35: Estratégia de análise para células de origem mieloide no baço. (A) Exclusão de *doublets* e *debris*. (B) Definição de esplenócitos segundo análise morfológica. (C) Exclusão de células CD11b-. (D) Diferenciação entre células dendríticas, monócitos e granulócitos pela marcação de CD11c vs. Ly6g. (E) Controles FMO com anticorpo secundário AlexaFluor488 da população CD11b⁺ total.

3.8. Análise estatística

O programa GraphPad Prism, versão 7.0 foi utilizado para a elaboração dos gráficos e análise estatística. Nos dados sobre morte celular, as diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas por análise de grupos utilizando o método two-way ANOVA com posterior teste de Tukey. Para os dados de caracterização dos receptores de superfície, quando há comparação entre mais de três grupos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis com posterior teste de Dunn para comparações múltiplas. Quando comparados apenas dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (*) e 0,001 (***). As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão ou 95% de intervalo de confiança para a mediana (mediana 95% CL).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos receptores para GDF 11 no timo

Utilizamos citometria de fluxo para caracterizar a sinalização intracelular disparada por GDF11 em tecidos linfoides. Para tal, obtivemos timócitos totais e realizamos marcações para ALK4, ALK5 ou ALK7 em conjunto com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 para a identificação de subpopulações. As células DN (duplo-negativas) $CD4^-CD8^-$, DP (duplo-positivas) $CD4^+CD8^+$ e SP (simples-positivas) $CD4^+CD8^-$ ou $CD8^+CD4^-$ foram analisadas individualmente, como indicadoras da sequência de amadurecimento dos timócitos.

Com isso, observamos que as células DN possuem as menores proporções positivas para qualquer um dos três receptores avaliados (Fig. 4.1). Já os timócitos DP apresentaram as maiores proporções de células positivas para cada um dos receptores, enquanto as células SP exibiram frequências intermediárias entre DP e DN (Fig. 4.1). Esse padrão foi observado para todos os três receptores investigados, porém com frequências distintas. Ao analisarmos a proporção de células positivas para cada receptor, o ALK5 é a molécula mais presente entre os timócitos, seguido por ALK7 e ALK4, respectivamente (Fig. 4.1). Visando estudar se havia diferença entre a quantidade de ALK4, ALK5 e ALK7 presentes em cada subtipo celular, utilizamos a intensidade de fluorescência mediana (MFI; do inglês, median fluorescence intensity) em cada subgrupo de timócitos. Dessa forma, podemos sugerir uma relação onde, quanto maior a quantidade de fluorescência emitida após excitação, maior o número de moléculas por célula. Assim observamos que, embora a proporção de células positivas seja menor entre as células DN do que nas células DP (Fig. 4.1), o MFI de ambas é similar (Fig. 4.2). Entre as células SP, ambas possuem um menor MFI, sendo a CD8 a que possui o menor índice entre todos os estágios de maturação dos timócitos (Fig. 4.2).

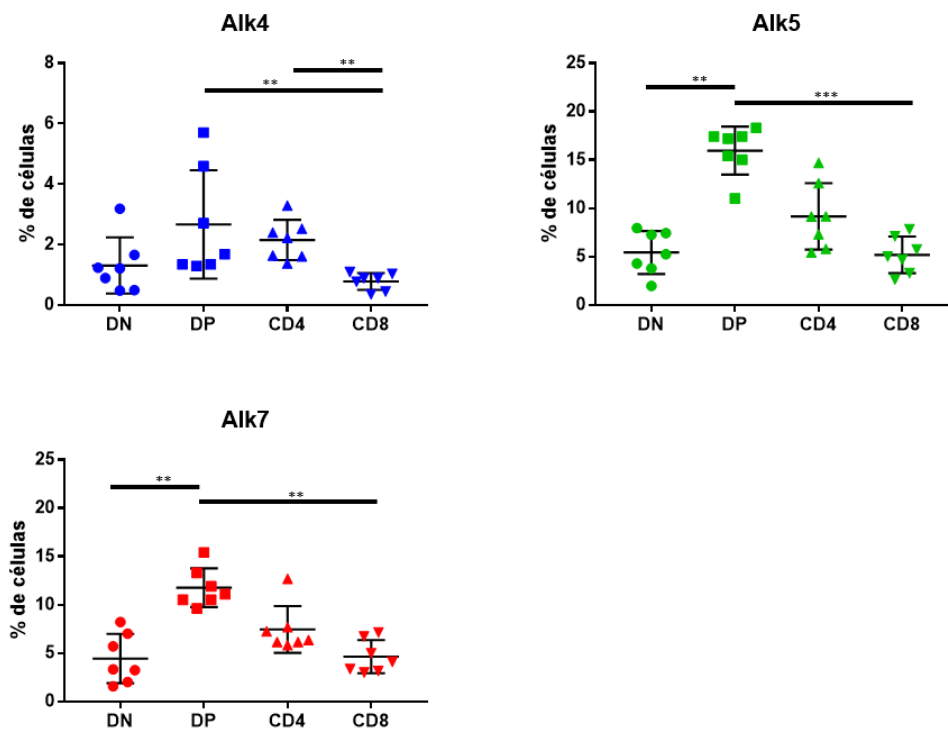


Figura 4.1 Frequência celular das subpopulações tímicas expressando os receptores ALK4, ALK5 e ALK7. As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). N=7; Exp=2.

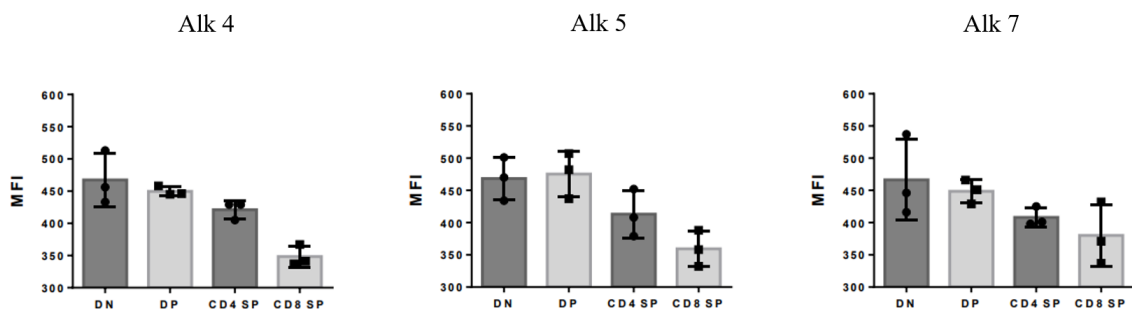


Figura 4.2. Intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pela marcação para ALK4, ALK5 e ALK7 em cada estágio de maturação de tímicos. (***). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para a mediana (mediana 95% CL). N=3; Exp=1

4.2. Caracterização dos receptores para GDF11 no Baço

Nós também caracterizamos a distribuição dos receptores de GDF11 (ALK4, ALK5 e ALK7) no baço de camundongos jovens por citometria de fluxo. As subpopulações de esplenócitos totais foram identificadas pela imunomarcagem com anti-CD3, -CD4 e -CD8 para linfócitos T. Já os anticorpos anti-CD19, -CD21, -CD23 e -CD24 foram utilizados para a identificação de linfócitos B transicionais T1 e T2, linfócitos B, FM e linfócitos B MZ. Por sua vez, os anticorpos anti-CD11b, -CD11c e -Ly6G foram empregados para a identificação de células da linhagem mieloide. Com

isso, nós identificamos diferentes subpopulações celulares e suas frequências de expressão de ALK4, ALK5 ou ALK7. Dentre os linfócitos B, ressaltamos que a sequência de maturação envolve a passagem de células T1 para T2 e em seguida o amadurecimento em FM ou MZ.

De forma geral, observamos que os receptores ALK4, ALK5 e ALK7 estão presentes em uma proporção maior de linfócitos T CD4⁺ do que de linfócitos T CD8⁺ (Fig. 4.3). Entre os linfócitos B, observamos que ambas as populações imaturas de transição, T1 e T2 possuem uma maior frequência de células positivas para cada um dos receptores, quando comparadas com as células FM (Fig. 4.4). Já os linfócitos B MZ apresentaram as maiores proporções de células positivas para todos os receptores, com destaque para ALK5 (Fig. 4.4). Entre as populações mieloides, as proporções de células dendríticas, monócitos e neutrófilos positivos para ALK4 aparentam ser menor que as proporções de células positivas para ALK5 e ALK7, respectivamente. Em particular, os monócitos são o tipo celular com as menores frequências de células positivas para os receptores de GDF11 entre os tipos mieloides observados (Fig. 4.5).

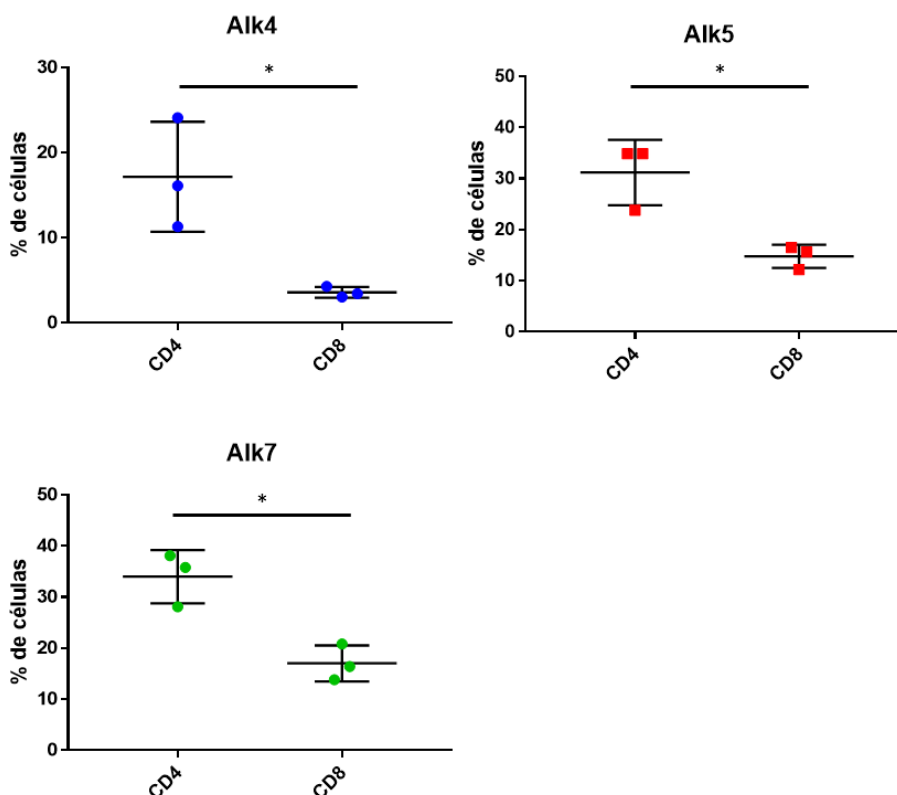


Figura 4.3. Frequência celular das subpopulações esplênicas de linfócitos T expressando os receptores ALK4, ALK5 e ALK7. As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). N=3; Exp=1.

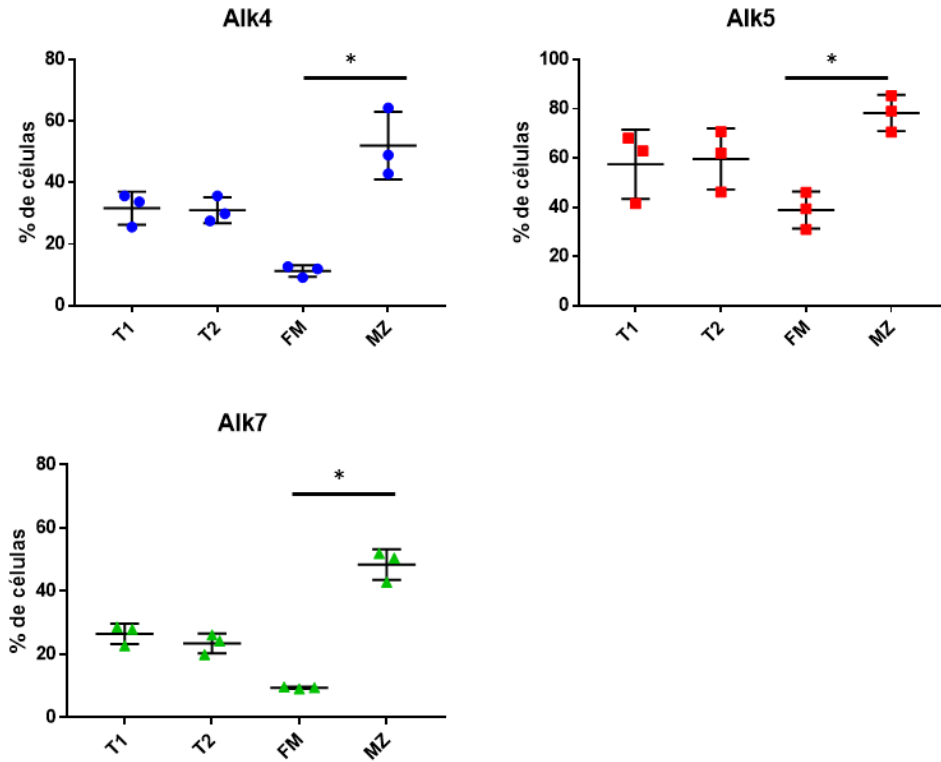


Figura 4.4. Frequência celular das subpopulações esplênicas de linfócitos B expressando os receptores ALK4, ALK5 e ALK7. As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). N=3; Exp=1.

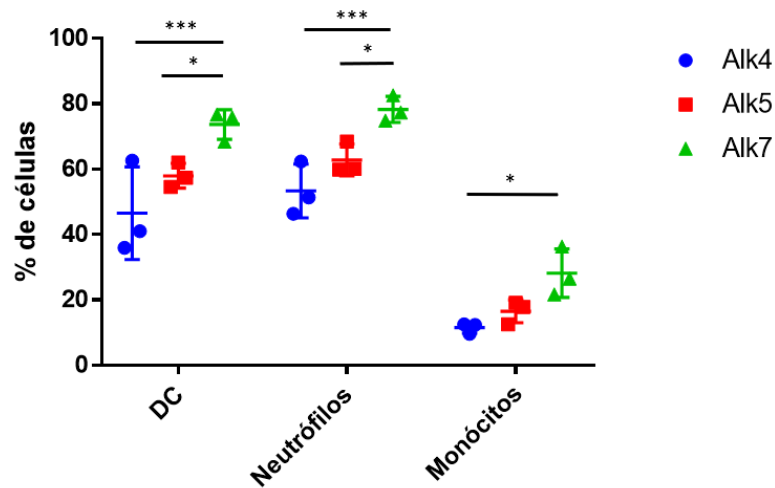


Figura 4.5 Frequência celular das subpopulações mieloides esplênicas expressando os receptores ALK4, ALK5 e ALK7. As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). N=3; Exp=1.

4.3. Caracterização dos receptores para GDF 11 por imunofluorescência

Ainda, caracterizamos a distribuição tecidual das células esplênicas expressando ALK4, ALK5, ALK7 ou GDF11 por imunofluorescência. Todavia, o anticorpo anti-GDF11 empregado também reconhece a proteína homóloga miostatina/GDF8 (51). Assim, referiremos a essa marcação como GDF11/8. A marcação com F4/80 nos permitiu identificar a polpa vermelha, contendo grande quantidade de macrófagos e hemácias, e uma região negativa, chamada de polpa branca. Nela, se concentram os linfócitos T e B. Entre essas duas polpas existe a zona marginal, onde há a presença de células dendríticas, linfócitos B e macrófagos negativos para F4/80 (Fig. 4.6). Na análise dessas imagens, podemos observar que a marcação com ALK4 se mostrou positiva na zona marginal, entre a polpa branca e a polpa vermelha (Fig. 4.6a,e). Não visualizamos células ou regiões positivas para ALK5 por imunofluorescência (Fig. 4.6b,f). Nas marcações contra ALK7, observamos algumas grandes células poligonais positivas na polpa vermelha, circundadas por outras células (Fig. 4.6c,g). A marcação contra GDF11/8 também revelou células salpicadas na polpa vermelha (Fig. 4.6d,h) que aparentemente não são as mesmas células poligonais positivas para ALK7. Todavia, essas imunomarcações não permitiram ainda a definição da identidade dessas células ALK7⁺.

Para confirmar a marcação com GDF11 e continuar com o trabalho de caracterização dessas moléculas, realizamos uma nova marcação com o anticorpo anti-GDF11/8, desta vez no timo e novamente no baço. Em ambos os órgãos, observamos algumas células positivas aparentemente similares. Elas parecem seguir o mesmo padrão de organização tecidual, sendo encontradas tanto em pequenos conjuntos de células positivas para GDF11/8 ou espalhadas pelo tecido (Fig. 4.7)

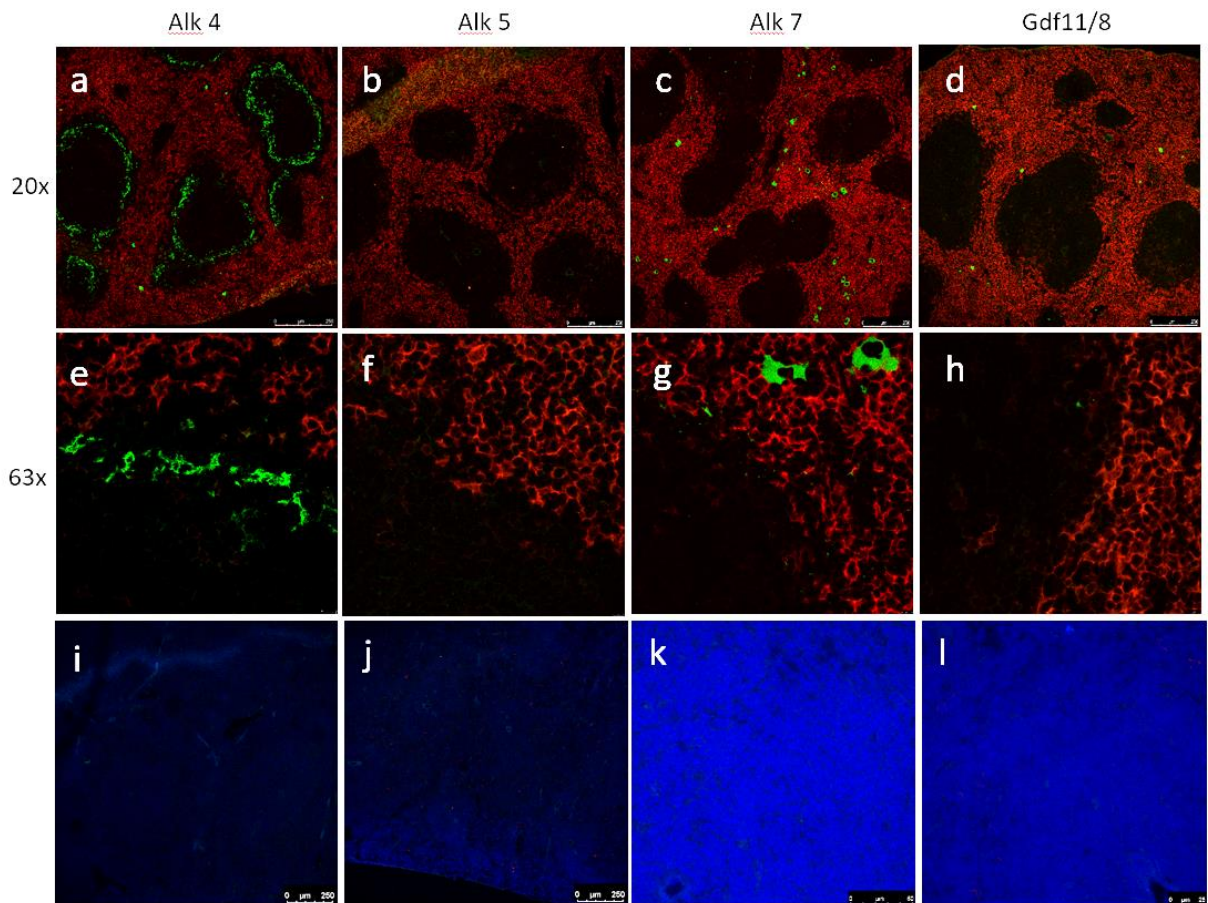


Figura 4.6: Imunofluorescência de baço de camundongos jovens. Marcação contra F4/80 não-conjugado, incubado com anticorpo secundário AlexaFluor546 (vermelho). Anticorpos contra GDF11 e ALKs foram incubados com anticorpo secundário AlexaFluor488 (verde). Para marcação de núcleo foi utilizado DAPI (azul). m) Controle do AlexaFluor546 em 20x; n) Controle do AlexaFluor488 em 20x; o) Controle do AlexaFluor546 em 63x; p) Controle do AlexaFluor488 em 63x. N=3; Exp=1.

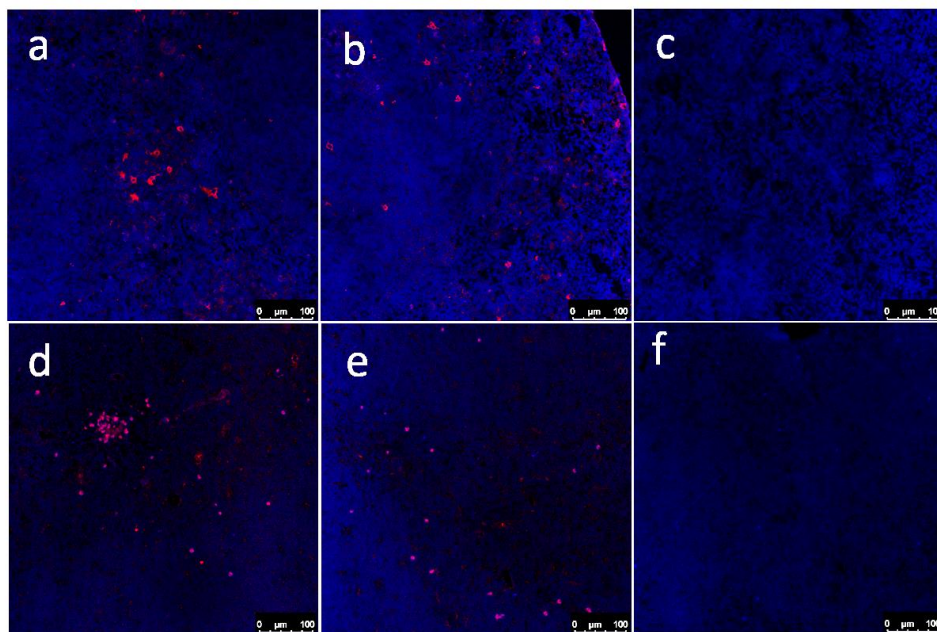


Figura 4.7: Imunofluorescência de baço (a-c) e timo (d-e) de camundongos jovens. a,b,d,e) Marcação contra anti-GDF11/8 não-conjugado e incubado com anticorpo secundário AlexaFluor633 (vermelho). Para a marcação de núcleo, utilizamos DAPI (azul). c, f) Controle do anticorpo secundário AlexaFluor633. N=3; Exp=1.

4.4. Ensaio funcional

Visto que foi possível observar a presença de subpopulações celulares positivas para os receptores ALK4, ALK5 e ALK7, que em conjunto com dados da literatura que demonstram a capacidade de o GDF11 influenciar mecanismos celulares importantes, decidimos estudar a função do GDF11 em regular a morte celular. Para isso, utilizamos timócitos em cultura ativados com anti-CD3 ϵ , o que resulta em um aumento da morte celular, na presença ou ausência de GDF11 recombinante (rGDF11), por 12 e 24 horas. Para esse estudo, utilizamos a Anexina-V conjugada ao FITC para identificar células apoptóticas, devido à sua propriedade de ligação à fosfatidilserina da membrana celular. Em conjunto, utilizamos a marcação com o intercalante de DNA 7-AAD para identificação de células mortas sem integridade de membrana. Essas duas marcações permitem separar as células em três grupos distintos. O grupo duplo-negativo Anexina-V⁻7-AAD⁻ compreende as células viáveis, o grupo anexina-V⁺7-AAD⁻ indica células apoptóticas (também denominado de apoptose inicial), enquanto o grupo anexina-V⁺7-AAD⁺ evidencia células em apoptose tardia e o total de células mortas.

Primeiramente, podemos observar em todos os casos que, conforme esperado, quanto maior o tempo de cultura, menor a proporção de células vivas anexina-V⁻7-AAD⁻. Além do mais, é possível observar que o estímulo com anti-CD3 ϵ foi suficiente para diminuir a viabilidade das células (Figuras 4.8-4.10). Ao analisar os timócitos CD4 SP, observamos uma diminuição da proporção de células viáveis, quando estimulados com rGDF11 em ambas as concentrações testadas (Figura 4.8A). Entretanto, quando ativadas com anti-CD3 ϵ , o rGDF11 parece ter uma função contrária, diminuindo a morte celular relacionada à ativação (Figura 4.8B). De forma semelhante, 100 ng/mL de rGDF11 aumentou a frequência de timócitos CD4 SP apoptóticos e mortos no grupo de células não ativadas (Figura 4.8C-E). De forma contrária, no entanto, o rGDF11 inibiu a apoptose e morte de células ativadas (Figura 4.8D,F). Já em relação aos timócitos CD8 SP, o rGDF11 aumentou a proporção de células não viáveis, apoptóticas e mortas (Figura 4.9A,C,E), mas não exerceu impacto significativo quando essas células foram estimuladas por anti-CD3 ϵ (Figura 4.9B,D,F). Nós realizamos também a mesma análise nos timócitos DP (CD4⁺CD8⁺) (Figura 4.10), e não foi possível associar o tratamento com rGDF11 a nenhuma atividade significativa na morte celular, a não ser por um aumento do número relativo de células apoptóticas não ativadas no tempo de 12 horas (Figura 4.10C).

CD4 cells

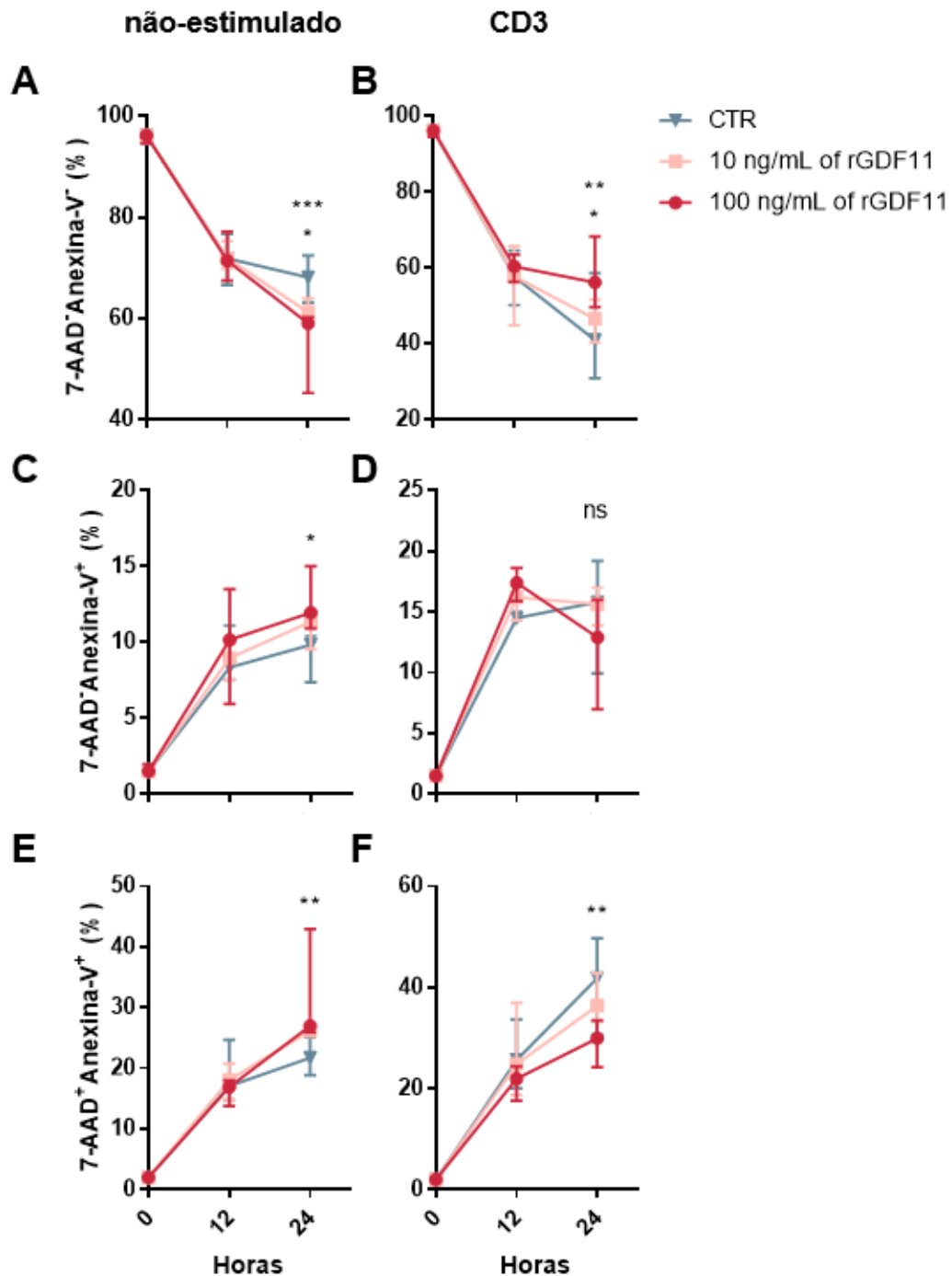


Figura 4.8: Linfócitos T CD4 estimulados com GDF11 recombinante marcados com anexina-V e 7-AAD. Foram utilizadas duas concentrações de GDF11 (10 ng/mL e 100 ng/mL) em três tempos diferentes, 0, 12 e 24 horas. (A) Comparação entre CTR vs. GDF11 10ng/mL (*), CTR vs. GDF11 100ng/mL (***). (B) CTR vs. GDF11 100ng/mL (**), GDF11 10 ng/mL vs. GDF11 100 ng/mL (*). (C) CTR vs. GDF11 100ng/mL (*). (D) Grupos não foram significativamente diferentes (ns). (E) CTR vs. GDF11 100 ng/mL (**). (F) CTR vs. GDF11 100 ng/mL (**). Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para a mediana (mediana 95% CL). N=4; Exp=1.

CD8 cells

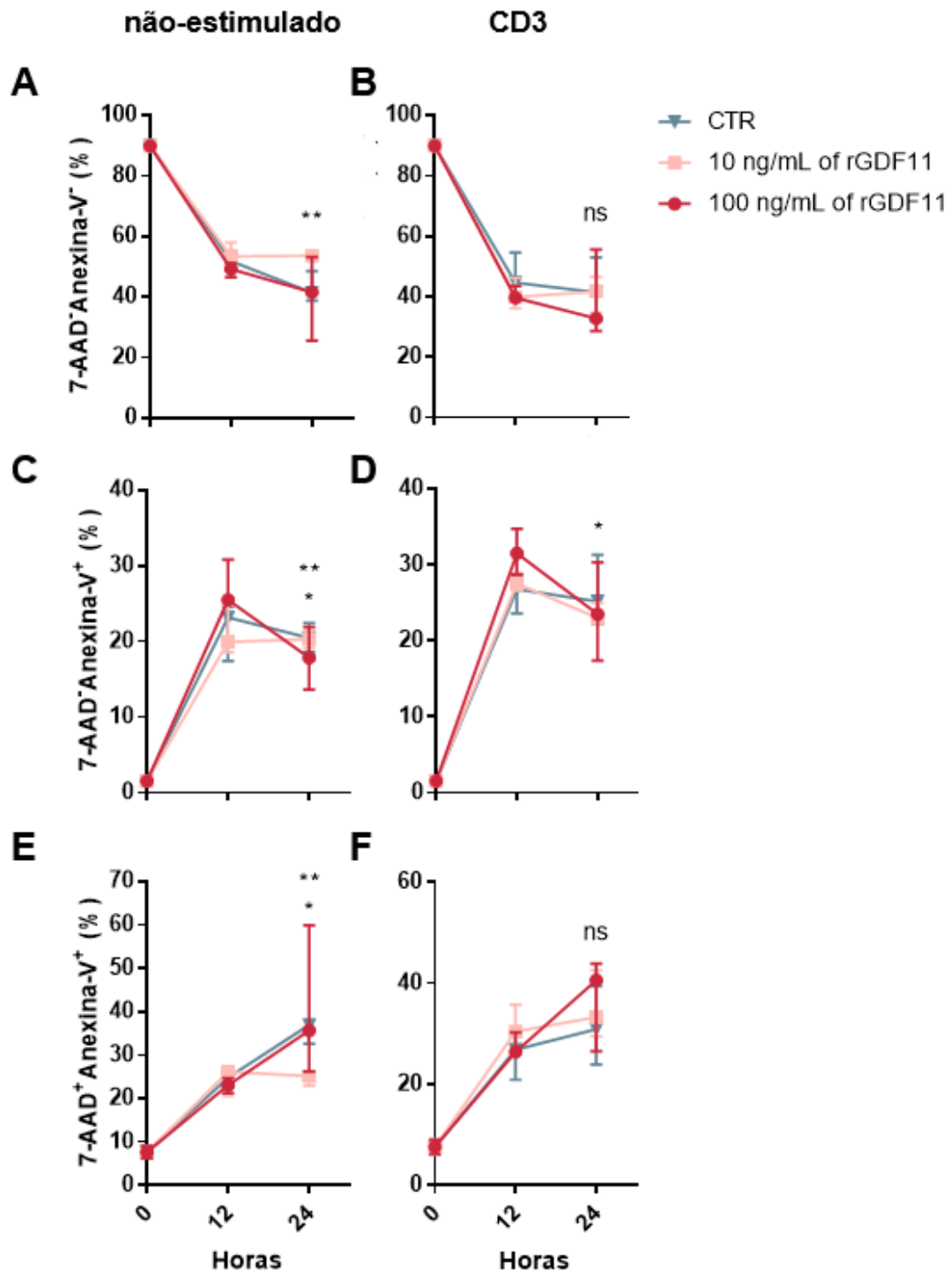


Figura 4.9: Linfócitos T CD8 estimulados com GDF11 recombinante marcados com anexina-V e 7-AAD. Foram utilizadas duas concentrações de GDF11 (10 ng/mL e 100 ng/mL) em três tempos diferentes, 0, 12 e 24 horas. (A) Comparação entre CTR vs. GDF11 10ng/mL (**), GDF11 10ng/mL vs. GDF11 100ng/mL (**). (B) Grupos não foram significativamente diferentes (ns). (C) Comparação entre CTR vs. GDF11 10ng/mL (*), GDF11 10ng/mL vs. GDF11 100 ng/mL (**). (D) CTR vs. GDF11 10 ng/mL (*). (E) CTR vs. GDF11 10 ng/mL (*), GDF11 10 ng/mL vs. GDF11 100 ng/mL (**). (F) Grupos não foram significativamente diferentes (ns). Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para a mediana (mediana 95% CL). N=4; Exp=1.

DP cells

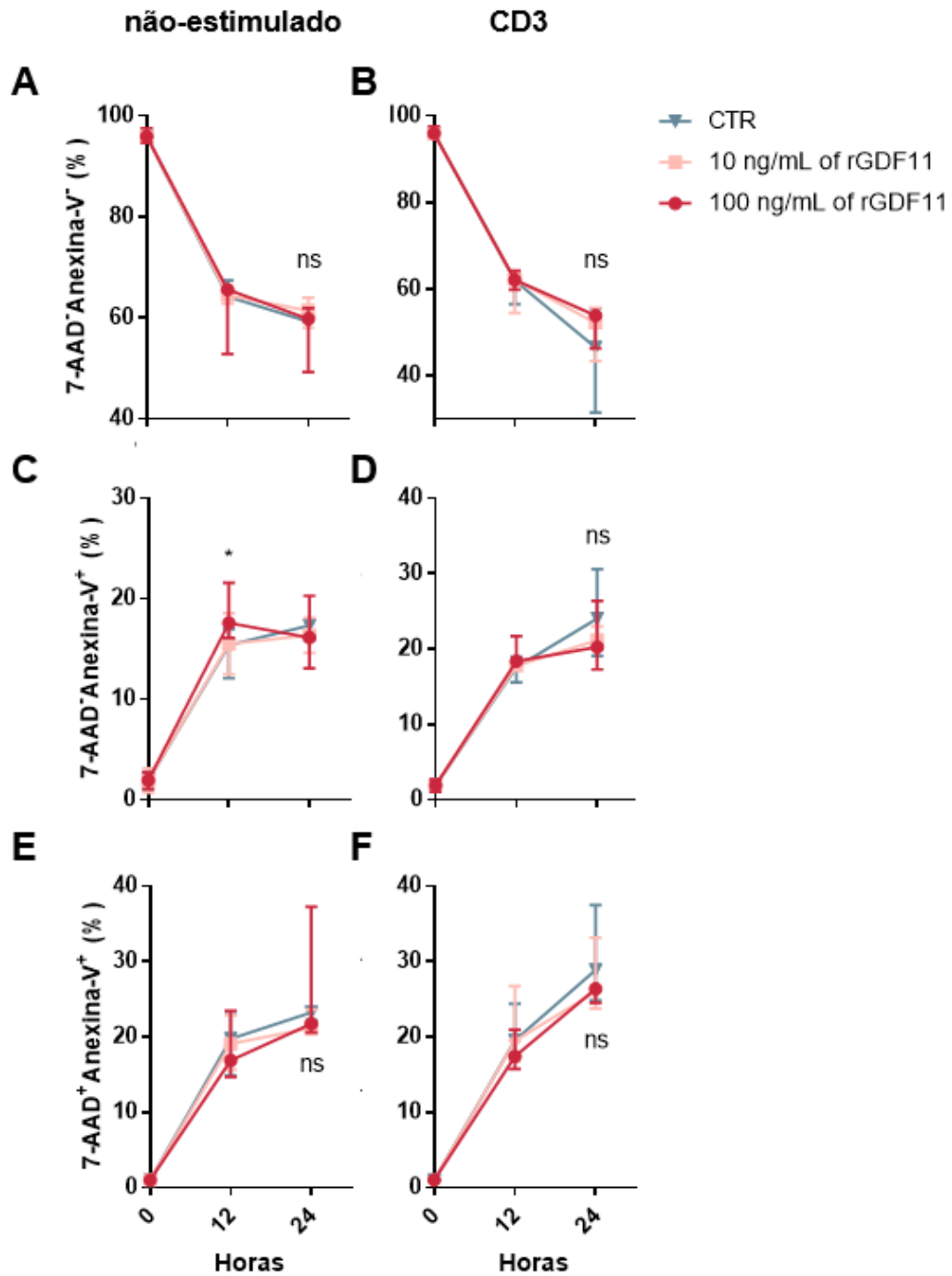


Figura 4.10: Timócitos duplo positivos estimulados com GDF11 recombinante marcados com anexina-V e 7-AAD. Foram utilizadas duas concentrações de GDF11 (10 ng/mL e 100 ng/mL) em três tempos diferentes, 0, 12 e 24 horas. (A,B,D,E,F) Grupos não foram significativamente diferentes entre si (ns). (C) GDF11 10 ng/mL vs. GDF11 100 ng/mL (*). Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**) e 0,001 (***). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para a mediana (mediana 95% CL). N=4; Exp=1.

5. DISCUSSÃO

Os membros da superfamília do TGF- β exercem múltiplas funções no organismo, como no seu desenvolvimento e na manutenção da homeostase. Devido a suas similaridades, alguns membros podem exercer tanto funções que se sobrepõem, quanto podem exercer funções claramente não redundantes. De fato, o TGF- β já é conhecido por ser extremamente importante na homeostase do sistema imune, por exemplo na formação de linfócitos T reguladores (revisado por 14), inibição de linfócitos B (60) e indução de via alternativa de ativação de macrófagos (107,108). Dessa forma, o estudo de moléculas desta família que fazem ou possam fazer parte do sistema imune é de grande importância. O GDF11 demonstrou funções de diferenciação, proliferação e migração de vários tipos celulares, como as células-tronco neurais e as células endoteliais sanguíneas (43,49). Além disso, outros estudos têm evidenciado a presença de GDF11 no baço, principalmente em macrófagos e linfócitos. Uma vez que as funções da sinalização por GDF11 no sistema imune são desconhecidas até o momento, buscamos então caracterizar as populações celulares tímicas e esplênicas produtoras e receptoras de GDF11 por microscopia de fluorescência e imunofenotipagem por citometria de fluxo. A partir daí, caracterizamos uma possível função do GDF11 na sobrevivência dos timócitos.

Na maturação de linfócitos T no timo, as células precursoras da medula óssea migram para o córtex tímico, onde ainda permanecem no estágio de DN. Após passar por diferentes estágios de maturação na parte mais externa do córtex como células DN, os timócitos proliferam intensamente e adquirem os co-receptores CD4 e CD8. Eles então sofrem seleção positiva no estágio DP. Nessa seleção, através do contato de seus receptores MHC de tipo I e II com antígenos próprios apresentados por células epiteliais tímicas corticais, os timócitos sobreviventes tornam-se simples-positivos para CD4 ou CD8 e migram para a medula tímica, onde sofrem seleção negativa, com a eliminação de células autorreativas. Dada a complexidade desse processo de maturação intratímica de células T, com eventos centrais de migração, proliferação e morte, consideramos que a identificação da expressão dos receptores ALK4, ALK5 e ALK7 em timócitos é fundamental para o estudo da relação entre o GDF11 e a maturação de linfócitos T. Entre as subpopulações intratímicas, observamos que existiu uma clara tendência de maior frequência desses receptores nos timócitos DP. Os timócitos DN exibiram uma população positiva muito menor do que a de células DP. Esses dados, somados ao maior índice de MFI observado nas células DN e DP

em relação às células SP, indicam uma possível função desses receptores no processo de maturação intratímica de linfócitos T. Nesse sentido, podemos postular uma maior participação dos receptores ALK5 e ALK7, visto que estão expressos em um número maior de células, quando comparados ao receptor ALK4. Conseqüentemente, é possível hipotetizar que o GDF11 pode estar relacionado com o processo de seleção positiva de células CD4⁺ ou CD8⁺. Essa especulação é possível, visto que a sinalização pela ligação do GDF11 exerce função de diferenciação celular no sistema imune e em outros tecidos. O ALK5 é essencial para a formação de células Treg em camundongos jovens (57), assim como o correto funcionamento de SMAD2 e SMAD3 (109). Os receptores ALK4 e ALK7, por exemplo, são pré-requisitos para a diferenciação em células germinativas masculinas (110). Importante ressaltar também a atuação do GDF11 na diferenciação de células mesenquimais renais (111), células tronco neurais (50,112,113) e osteoblastos (41). Além disso, embora não tenhamos analisado as subpopulações de células imaturas dentro do grupo DN (baseadas na marcação CD44 *versus* CD25, podemos considerar que o processo seletivo definido pela sinalização via pré-TCR resulta em células pós-mitóticas DP suscetíveis à estimulação por fatores como o TGF- β e o GDF11. Uma maneira possível de responder essa pergunta seria através de experimentos com timo fetal em cultura (FTOC) estimulado com GDF11. Com tal estratégia, seria possível examinar o impacto do tratamento com rGDF11 em diferentes aspectos da timopoiese, como por exemplo uma mudança na proporção de células SP maduras e nos eventos intrínsecos desse estágio, como a indução de tolerância central. De forma geral, é interessante notar que os timócitos SP CD4⁺ possuem tanto uma população positiva maior quanto uma MFI mais alta em relação aos timócitos SP CD8⁺, sugerindo que o GDF11 provavelmente seria funcionalmente mais importante nos linfócitos T CD4⁺. Ao compararmos esses dados com os dados previamente obtidos pela base de dados Skyline de sequenciamento de RNA (106), os timócitos DP também são os que mais expressam RNAm para ALK5, seguidos por timócitos SP CD4 e CD8 com níveis similares. Os timócitos SP CD8 possuem expressão de *GDF11* e seus receptores em níveis similares ou menores do que os timócitos SP CD4. Essas observações estão de acordo com os nossos achados por citometria de fluxo. Os timócitos SP CD4 apresentaram um maior nível de expressão para ALK4, ALK7 e GDF11, embora tenham exibido uma proporção intermediária de células positivas se comparados com os timócitos DP e CD8. Esses resultados, portanto, sugerem que os timócitos SP CD4 talvez sejam o principal estágio da timopoiese afetado por GDF11.

Ao observarmos a fase madura do desenvolvimento de linfócitos T CD4 e CD8 no baço, podemos observar resultados similares aos obtidos no timo. Os linfócitos T CD4 apresentaram também maior população positiva para os receptores ALK4, ALK5 e ALK7, quando comparados aos linfócitos T CD8, reforçando a hipótese de que essa via de sinalização teria maior capacidade de afetar células T CD4 do que células T CD8. Já foi descrito na literatura que SMAD2 e SMAD 3 são capazes de regular o desenvolvimento de linfócitos Th17 (109,114,115), indicando que essa via de sinalização pode estar ligada na diferenciação de linfócitos T CD4, tanto na sua fase intratímica, quanto na sua diferenciação após ativação. Além do mais, SMAD2 e SMAD3 são responsáveis por mediar a metilação do promotor de IL-2, dessa forma inibindo a produção dessa citocina em linfócitos T CD4 (116). O que indica ainda uma possível função do GDF11, como ativador dessa via, a ter uma função similar à do TGF- β , como inibidor da proliferação de células do sistema imune.

Em relação às diferentes proporções de células positivas para os receptores ALK, dependendo do grau de maturação celular, podemos observar algo similar com os linfócitos B. Em camundongos, os linfócitos B ainda imaturos migram da medula óssea para o baço. No estágio T1, essas células colonizam uma região de linfócitos T denominada bainha linfóide periarteriolar (PALS). Nesse momento, elas passam por uma seleção negativa, se diferenciam em T2 e colonizam os folículos linfóides, onde sofrerão a ação de moléculas ativadoras e poderão se diferenciar em linfócitos B FM ou em linfócitos B MZ. A partir da nossa análise por citometria, é possível estabelecer uma relação entre a proporção de células positivas para cada um dos receptores de GDF11 e os diferentes estágios de maturação. Aparentemente, os estágios transicionais possuem uma maior proporção de células positivas para esses receptores. No caso das células B se tornarem FM, há uma diminuição da proporção das células positivas para todos os três receptores. Por outro lado, caso ela se torne uma célula B MZ, a proporção de células positivas para todos os receptores aumenta significativamente. Isso sugere que esses estágios podem estar sob diferentes tipos de regulação e que a sinalização por GDF11 atua na transição das células T2 para FM ou MZ.

Em relação às células mielóides, não focamos em seus estágios de maturação, mas nas três principais subpopulações presentes no baço – os monócitos, as células dendríticas e os neutrófilos. Nesse caso, observamos que as células dendríticas e os neutrófilos apresentaram maior frequência de células positivas para os três receptores analisados. Já os monócitos apresentaram um grupo de células positivas em

proporção consideravelmente menor. Isso sugere que a sinalização por GDF11 poder ter ação sobre a função dessas células fagocitárias, principalmente neutrófilos e células dendríticas. Considerando ainda que os monócitos parecem ser fonte de produção de GDF11, segundo nossos dados preliminares, eles também parecem ser alvo da atividade de GDF11 (sinalização autócrina).

Por sua vez, a imunofluorescência de secções do baço revelou uma distribuição periférica de células positivas para ALK4 nas regiões de polpa branca, possivelmente em regiões conhecidas como zonas marginais. As zonas marginais possuem células dendríticas, linfócitos B e macrófagos negativos para F4/80 (89,117). Desta forma, o padrão de marcação observado sugere que o receptor ALK4 possa ser utilizado como marcador para definir um desses tipos celulares, que ainda precisa ser identificado. Em especial, essa observação está em acordo com os nossos achados da citometria de fluxo, que revelam uma alta proporção de linfócitos B MZ positivos para ALK4. Nesse caso, esperaríamos observar a marcação positiva também de ALK5 e ALK7. Porém, essas regiões não exibiram reatividade para esses receptores.

Em relação ao ALK5, observamos pela citometria de fluxo que os linfócitos B em geral expressam esse receptor, assim como monócitos, células dendríticas e linfócitos T CD4. Essa observação não condiz com os nossos achados de imunofluorescência e essa discrepância nos resultados será discutida adiante.

Em relação às marcações contra ALK7 e GDF11/8, identificamos células individuais espalhadas na polpa vermelha do baço. No timo, a imunomarcação para GDF11/8 produz um padrão similar de células individuais espalhadas. Marcações adicionais necessitam ser realizadas para caracterizar quais os tipos celulares produtores e responsivos para GDF11.

A imunofluorescência é uma excelente ferramenta para a identificação morfológica de tipos celulares específicos e tecidos. Embora os nossos resultados entre imunofluorescência e citometria de fluxo não tenham sido totalmente concordantes, saber a localização tecidual dessas moléculas ajuda a definir os próximos marcadores a serem utilizados. Na microscopia, a detecção de diferenças nas quantidades desses receptores em células individuais presentes em cortes congelados pode resultar na perda de sinais fracos. Além disso, números reduzidos de receptores na superfície celular podem não ter sido detectados devido à influência de outros sinais teciduais circundantes ou da parte ótica do equipamento. Dessa forma, é possível que células exibindo baixos níveis dos receptores (“low”) tenham

sido negligenciadas durante a definição dos níveis de segundo plano. Outra hipótese seria a maior sensibilidade da citometria devido à análise de células individuais.

Após realizada a caracterização dos receptores de GDF11 no timo, fica claro que os timócitos possuem uma porcentagem da população positiva para esses receptores. Assim procuramos identificar se o GDF11 poderia estar interferindo com algum processo básico do funcionamento dessas células. Em relação ao papel funcional que o GDF11 pode desempenhar, diversos estudos demonstram que tanto esse fator quanto o TGF- β participam na sobrevivência e apoptose celular (112,118–120). Como o desenvolvimento de timócitos, principalmente a seleção negativa e positiva, envolvem necessariamente morte celular (121,122), para esse trabalho, focamos na investigação da capacidade do GDF11 em regular a sobrevivência de timócitos totais mantidos em cultura celular. Para isso utilizamos duas concentrações diferentes de rGDF11 e um estímulo via receptor antigênico (anti-CD3 ϵ), que funciona como ativador de timócitos e leva à morte celular, principalmente de células imaturas. Dessa forma, foi possível observar se o GDF11 era capaz de provocar ou inibir a morte de timócitos em cultura celular de duas formas distintas, com ou sem ativação via CD3 ϵ .

Para isso, utilizamos as marcações com anexina-V e 7-AAD. Essa dupla marcação é capaz de discriminar as células viáveis, apoptóticas e mortas. De forma geral, após a célula entrar em apoptose, as moléculas de fosfatidilserina presentes na face intracelular da membrana plasmática são expostas na parte externa da membrana, o que possibilita o reconhecimento pela anexina-V conjugada com um fluoróforo. Isso permite a identificação de células anexina-V⁺7-AAD⁻, que estão em estágio inicial de apoptose. Caso as células avancem nesse processo de morte celular programada ou morram por outro mecanismo, como a necrose, ocorre a perda da integridade da membrana celular, o que permite a entrada do intercalante de DNA 7-AAD e a identificação de células anexina-V⁺7-AAD⁺, que podem estar em apoptose tardia ou mortas (123–125) (Figura 5.1). Os timócitos avaliados por esses marcadores de viabilidade celular foram então marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 a fim de estudarmos a sobrevivência celular nos estágios imaturos e maduros de maturação dos linfócitos T, que incluem as células DN, DP e as SP CD4 e CD8.

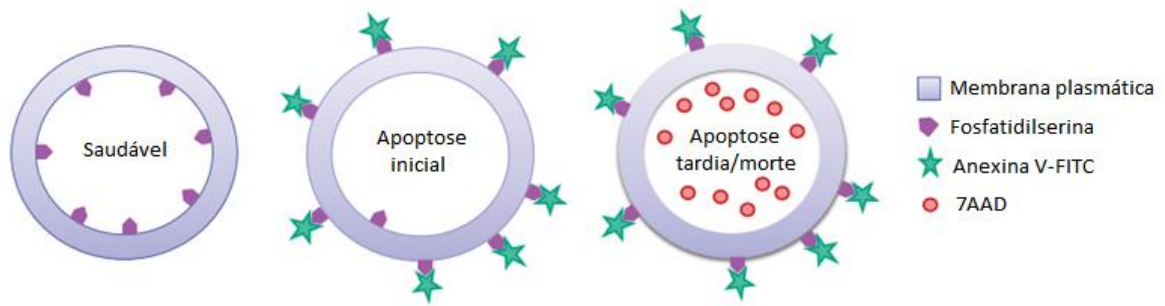


Figura 5.1: Diagrama demonstrando o funcionamento da marcação Anexina-V vs 7AAD. Adaptado de: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf; acessado em 04/10/2018.

Com isso, podemos observar que dentre essas três subpopulações celulares estudadas, os timócitos CD4 SP foram aqueles mais suscetíveis à ação do GDF11. Na ausência de ativação por CD3 ϵ , a proporção de células viáveis no tempo de 24 horas é menor quanto maior a concentração de rGDF11 no meio de cultura. Essa observação condiz com a proporção aumentada de células apoptóticas e mortas nessa condição. Entretanto, o GDF11 parece apresentar atividade protetora contra a morte celular quando os timócitos são ativados por CD3 ϵ . Em relação aos timócitos CD8 SP, os resultados foram menos evidentes, indicando somente uma diminuição da viabilidade celular no grupo de timócitos não estimulados, assim como nos timócitos CD4 SP. Para as células DP, o rGDF11 parece não influenciar os mecanismos de sobrevivência celular. Embora o mecanismo pelo qual o GDF11 seja capaz de estimular a apoptose seja desconhecido, o TGF- β é capaz de estimular a apoptose através da cooperação com FasL (ligante de receptor FAS), TNF- α e NGF (fator de crescimento neural), com disparo da cascata de sinalização de MAP quinases, que leva à regulação negativa de Bcl-2 e Bcl-x, liberação de citocromo c e ativação de caspases (revisado por 121). Esse estímulo à apoptose pelo TGF- β foi demonstrado como SMAD2/3-dependente (126–129). Além disso, os receptores de GDF11 que não respondem ao TGF- β , ALK4 e ALK7, também foram identificados como estimuladores de apoptose pela mesma via (127,130–133). Em conjunto, esses dados corroboram os nossos dados que demonstram o rGDF11 como ativador de apoptose em timócitos SP CD4 e CD8. Interessante ressaltar ainda que, embora o TGF- β tenha papel apoptótico, existem dados que demonstram que ele é capaz de agir de forma contrária em linfócitos T ativados, inibindo FasL e a consequente apoptose por ativação (134). Mais especificamente, como tendo papel supressor da ativação em linfócitos T CD8 *naive*, porém promovendo sua sobrevivência, uma vez

que essas células entram em contato com antígeno (135). Outro trabalho realiza inclusive uma comparação do efeito inibidor de proliferação do TGF- β em linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8, demonstrando que embora essa inibição ocorra em ambas as populações celulares não ativadas, a sobrevivência ocasionada pelo TGF- β após ativação, é dependente de SMAD3 para os linfócitos T CD8, mas não para os linfócitos T CD4, indicando que o TGF- β atua de forma diferente e através de mecanismos celulares distintos nessas populações celulares (136). Esses dados corroboram os nossos resultados, onde o GDF11 possui um efeito protetor da viabilidade celular após ativação, mais nitidamente nos timócitos SP CD4, podendo então também exercer função diferencial em cada uma dessas subpopulações tímicas.

Levando em consideração esses dados sobre viabilidade celular, em conjunto com os dados de caracterização para os receptores de GDF11 no baço e no timo, os linfócitos T CD4 possuem uma maior proporção de células que expressam os receptores para GDF11, em comparação aos linfócitos T CD8, principalmente o ALK5 e o ALK7. Sabemos também que o ALK5 é fundamental para que alguns linfócitos T CD4 se desenvolvam em células Treg, visto que o TGF- β é responsável por estimular a sobrevivência dessas células ao escaparem da seleção negativa (137). Além disso, camundongos que não possuem ALK5 têm a diferenciação de células Treg bloqueadas (57). Assim como o TGF- β , o GDF11 também pode estar envolvido em algum mecanismo de sobrevivência de parte dos linfócitos T CD4, que expressam esses receptores de membrana ao escaparem da seleção negativa e se tornarem células Treg. Por outro lado, os timócitos DP, que são os que apresentam uma população positiva mais abundante para esses receptores, aparentemente não foram suscetíveis à ação do rGDF11 como regulador de viabilidade celular.

É importante lembrar que o GDF11, Gdf8 e o TGF- β compartilham pelo menos um receptor em comum, o ALK5 (51). Entretanto, existe evidência que o modo pelo qual eles se ligam a esses receptores, assim como as combinações entre os receptores de tipo 1 e tipo 2, são frutos de uma vantagem evolutiva e são essenciais para que cada molécula exerça uma função diferente, variando tanto a conformação final ligante-receptor, quanto a potência de ativação da cascata intracelular (SMAD) (51,138). Ainda assim, entendemos a necessidade de repetir o efeito observado em conjunto com outras moléculas recombinantes ou com inibidores das mesmas. Também seria de grande valia a separação dos timócitos através de técnicas de *sorting*, que possibilitariam estudar a função do GDF11 sem a interferência do conjunto total de células do órgão, e dessa forma observar se o efeito observado é de

fato pela ação do GDF11 nessas células, ou se é dependente de ativação de outras células do mesmo tecido pelo GDF11. Em relação à caracterização e a alta porcentagem de células DP positivas para os ALKs, experimentos com timos fetais em cultura (FTOC) serão de grande importância para testar a hipótese de que o GDF11 é capaz de modular ou direcionar a maturação tímica (experimentos em andamento). Além disso, também é necessária a identificação de células produtoras especificamente de GDF11, tanto no baço quanto no timo, o que nos permitirá uma visão mais completa das interações celulares que podem estar participando desse mecanismo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os receptores ALK4, ALK5 e ALK7 estão presentes durante todos os estágios de maturação dos timócitos, além de também estarem presentes em linfócitos T e B e células de origem mieloide. Isso inclui células em desenvolvimento e células maduras, indicando que todas essas células possuem os receptores de membrana necessários para o reconhecimento do GDF11. A maior proporção no baço de linfócitos T CD4 maduros positivos para os receptores para GDF11, pode indicar possível função na diferenciação dessas células em células efetoras. Além disso, conseguimos observar que o rGDF11 protege os timócitos T CD4 em estágio final de amadurecimento, da morte celular induzida pela ativação com anti-CD3 ϵ em cultura. Isso ocorre principalmente nos timócitos SP CD4, e em menor proporção nos timócitos SP CD8, indicando que o GDF11 possa atuar na sobrevivência dessas duas subpopulações de modo distinto. Também é importante ressaltar que essa regulação por rGDF11 da morte de timócitos SP CD4 pode ser importante para a diferenciação de células Treg tímicas. Esses dados corroboram a nossa hipótese de que GDF11 desempenha importante papel no amadurecimento dos timócitos, embora para a uma definição mais completa sobre sua função, serão necessários outros estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* [Internet]. 2007 Nov;37(S1):S34–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200737772>
2. Chen W, Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. 2016. p. 723–40.
3. Hinck AP. Structural studies of the TGF- β s and their receptors - Insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett* [Internet]. 2012;586(14):1860–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.028>
4. de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1978;75(8):4001–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1981;78(9):5339–43. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.9.5339>
6. Moses HLH, Branum EEL, Proper JA, Robinson RRA. Transforming Growth Factor Production by Chemically Transformed Cells. *Cancer Res* [Internet]. 1981;41(7):2842–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/41/7/2842.abstract%5Cnhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/41/7/2842.short>
7. Moses HL, Roberts AB, Derynck R. The Discovery and Early Days of TGF- β : A Historical Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 Jul;8(7):a021865. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a021865>
8. Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type β transforming growth factor. *Science* (80-). 1984;226(4675):705–7.
9. Holley RW, Armour R, Baldwin JH. Density-dependent regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: growth inhibitors formed by the cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1978;75(4):1864–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392441/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392441/pdf/pnas00016-0262.pdf>
10. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, et al. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*. 1987;48(3):409–15.
11. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, et al. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* [Internet]. 1988;7(12):3737–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=454948&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Padgett RW, St. Johnston RD, Gelbart WM. A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- β family. Vol. 325, *Nature*. 1987. p. 81–4.
13. Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, et al. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature*. 1985;318(6047):659–63.
14. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* [Internet]. 1988 Dec 16;242(4885):1528–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3201241>
15. Jurberg AD, Vasconcelos-Fontes L, Cotta-de-Almeida V. A tale from TGF- β superfamily for thymus ontogeny and function. *Front Immunol*. 2015;6(SEP):1–15.
16. Wrana JL, Alto NM, Orth K, Sever R, Glass CK, Kopan R, et al. Signaling by the TGF β Superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;1–4.

17. Constam DB. Regulation of TGF β and related signals by precursor processing. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2014;32:85–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.008>
18. Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. [Internet]. Vol. 80, *Mechanisms of development*. 1999. p. 185–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072786>
19. Andersson O, Reissmann E, Ibáñez CF. Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor- β receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. *EMBO Rep*. 2006;7(8):831–7.
20. Mcpherron AC, Lawler AM, Lee S. Regulation of anterior / posterior patterning of the axial skeleton by growth / differentiation factor 11. *Nature*. 1999;22(july):1–5.
21. Oh SP, Yeo C, Lee Y, Schrewe H, Whitman M, Li E. Activin type IIA and IIB receptors mediate GDF11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes Dev* [Internet]. 2002 Nov 1;16(21):2749–54. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1021802>
22. Jurberg AD, Aires R, Varela-Lasheras I, Nóvoa A, Mallo M. Switching axial progenitors from producing trunk to tail tissues in vertebrate embryos. *Dev Cell*. 2013;25(5):451–62.
23. Esquela AF, Lee SJ. Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev Biol*. 2003;257(2):356–70.
24. Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, et al. Growth Differentiation Factor 11 is a Circulating Factor that Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 2013;153(4):828–39.
25. Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring Systemic GDF11 Levels Mouse Skeletal Muscle. *Science* (80-) [Internet]. 2014;344(6184):649–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797481>
26. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Trendelenburg A-U, Brack AS, Glass DJ. GDF 11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration. *Cell Metab*. 2015;22:164–74.
27. Brun CE, Rudnicki MA. GDF11 and the Mythical Fountain of Youth. *Cell Metab*. 2015;22(1):54–6.
28. Rodgers BD, Eldridge JA. Reduced circulating GDF11 is unlikely responsible for age-dependent changes in mouse heart, muscle, and brain. *Endocrinology*. 2015;156(11):3885–8.
29. Smith SC, Zhang X, Zhang X, Gross P, Starosta T, Mohsin S, et al. GDF11 Does Not Rescue Aging-Related Pathological Hypertrophy. *Circ Res*. 2015;117(11):926–32.
30. Hinken AC, Powers JM, Luo G, Holt JA, Billin AN, Russell AJ. Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells. *Aging Cell*. 2016;15(3):582–4.
31. Poggioli T, Vujic A, Yang P, Maclas-Trevino C, Uygur A, Loffredo FS, et al. Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline with Age. *Circ Res*. 2016;118(1):29–37.
32. WALKer RG, Poggioli T, Katsimpardi L, Buchanan SM, Oh J, Wattrus S, et al. Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and Questions for Future Investigation. *Circ Res*. 2016;118(7):1125–42.
33. McNally EM. Questions and Answers about Myostatin, GDF11, and the Aging Heart. *Circ Res*. 2016;118(1):6–8.
34. Schafer MJ, Atkinson EJ, Vanderboom PM, Kotajarvi B, White TA, Moore MM, et al. Quantification of GDF11 and Myostatin in Human Aging and Cardiovascular Disease. *Cell Metab* [Internet]. 2016 Jun;23(6):1207–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116302455>
35. Glass DJ. Elevated GDF11 Is a Risk Factor for Age-Related Frailty and Disease in Humans. *Cell Metab* [Internet]. 2016 Jul;24(1):7–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116303035>
36. Du GQ, Shao ZB, Wu J, Yin WJ, Li SH, Wu J, et al. Targeted myocardial delivery of GDF11 gene rejuvenates the aged mouse heart and enhances myocardial regeneration after

- ischemia–reperfusion injury. Vol. 112, Basic Research in Cardiology. 2017.
37. Duran J, Troncoso MF, Lagos D, Ramos S, Marin G, Estrada M. GDF11 modulates ca²⁺-dependent Smad2/3 signaling to prevent cardiomyocyte hypertrophy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
 38. Zhou Y, Sharma N, Dukes D, Myzithras MB, Gupta P, Khalil A, et al. GDF11 Treatment Attenuates the Recovery of Skeletal Muscle Function After Injury in Older Rats [Internet]. Vol. 19, The AAPS Journal. 2017. p. 431–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-016-0024-x>
 39. Zimmers TA, Jiang Y, Wang M, Liang TW, Rupert JE, Au ED, et al. Exogenous GDF11 induces cardiac and skeletal muscle dysfunction and wasting. Vol. 112, Basic Research in Cardiology. 2017.
 40. Zhang Y, Shao J, Wang Z, Yang T, Liu S, Liu Y, et al. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma. *Gene.* 2015;557(2):209–14.
 41. Liu W, Zhou L, Zhou C, Zhang S, Jing J, Xie L, et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nat Commun [Internet].* 2016;7:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12794>
 42. Wang F, Shen X, Li S, Chen L, Wang Y, Qin J, et al. Splenocytes derived from young WT mice prevent AD progression in APP^{swe}/PSEN1^{dE9} transgenic mice. *Oncotarget [Internet].* 2015;6(25):20851–62. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4930>
 43. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, et al. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science (80-) [Internet].* 2014 May 9;344(6184):630–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1251141>
 44. Zhang J, Li Y, Li H, Zhu B, Wang L, Guo B, et al. GDF11 Improves Angiogenic Function of EPCs in Diabetic Limb Ischemia. *Diabetes [Internet].* 2018 Jul 19;db171583. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db17-1583>
 45. Lu L, Bai X, Cao Y, Luo H, Yang X, Kang L, et al. Growth Differentiation Factor 11 Promotes Neurovascular Recovery After Stroke in Mice. *Front Cell Neurosci [Internet].* 2018;12(July):205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30061815%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6054976>
 46. Yu X, Chen X, Zheng XD, Zhang J, Zhao X, Liu Y, et al. Growth Differentiation Factor 11 Promotes Abnormal Proliferation and Angiogenesis of Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Hypertension [Internet].* 2018 Apr;71(4):729–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29463625>
 47. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, Chartier C, Negre O, Veiga J, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Nat Med.* 2014;20(4):398–407.
 48. Suragani RNVS, Cadena SM, Cawley SM, Sako D, Mitchell D, Li R, et al. Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. Vol. 20, *Nature Medicine.* 2014. p. 408–14.
 49. Finkenzeller G, Stark GB, Strassburg S. Growth differentiation factor 11 supports migration and sprouting of endothelial progenitor cells. *J Surg Res.* 2015;198(1):50–6.
 50. Williams G, Zentar MP, Gajendra S, Sonogo M, Doherty P, Lalli G. Transcriptional basis for the inhibition of neural stem cell proliferation and migration by the TGF β -family member GDF11. *PLoS One.* 2013;8(11).
 51. WALKer RG, Czepnik M, Goebel EJ, McCoy JC, Vujic A, Cho M, et al. Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC Biol [Internet].* 2017 Dec 3;15(1):19. Available from: <papers3://publication/uuid/CE7ADD5A-017B-4B14-B712-901B23CC467D>
 52. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature [Internet].* 1992 Oct 22;359(6397):693–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/355242a0>

53. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993;90(2):770–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Bleul CC, Boehm T. BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* [Internet]. 2005;175(8):5213–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210626%5Cnpapers3://publication/uuid/207E7D21-52BE-44A0-B641-B8559EA0707F>
55. Hager-Theodorides AL, Outram S V., Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone Morphogenetic Protein 2/4 Signaling Regulates Early Thymocyte Differentiation. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(10):5496–504. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.10.5496>
56. Hager-Theodorides AL, Ross SE, Sahni H, Mishina Y, Furmanski AL, Crompton T. Direct BMP2/4 signaling through BMP receptor IA regulates fetal thymocyte progenitor homeostasis and differentiation to CD4+CD8+ double-positive cell. *Cell Cycle*. 2014;13(2):324–33.
57. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(6):632–40.
58. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, et al. Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *J Immunol* [Internet]. 2010;185(2):842–55. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0904100>
59. Yamawaki K, Ueda S, Okada T, Oshima T, Kakitani M, Kato T, et al. Adult-Specific Systemic Over-Expression Reveals Novel In Vivo Effects of the Soluble Forms of ActRIIA, ActRIIB and BMPRII. *PLoS One*. 2013;8(10):1–10.
60. Cazac BB, Roes J. TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*. 2000;13(4):443–51.
61. Ishigame H, Mosaheb MM, Sanjabi S, Flavell RA. Truncated Form of TGF- RII, But Not Its Absence, Induces Memory CD8+ T Cell Expansion and Lymphoproliferative Disorder in Mice. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(12):6340–50. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1300397>
62. Hooper L V, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* (80-) [Internet]. 2012 Jun 8;336(6086):1268–73. Available from: [http://www.sciencemag.org/content/336/6086/1268.full.html#related%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6086/1268.full.html#ref-list-1%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/collection/immunology](http://www.sciencemag.org/content/336/6086/1268.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6086/1268.full.html#related%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6086/1268.full.html#ref-list-1%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/collection/immunology)
63. Paul WE. Bridging Innate and Adaptive Immunity. *Cell* [Internet]. 2011 Dec;147(6):1212–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.036>
64. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* [Internet]. 2000;55(8):688–97. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x>
65. Takahama Y. Journey through the thymus: Stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):127–35.
66. Lebien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570–80.
67. Fausto CSCDV, Chammas MC, Saito ODC, Garcia MRT, Juliano AG, Simões CA, et al. Timo: caracterização ultra-sonográfica. *Radiol Bras*. 2004;37(3):207–10.
68. Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhes Migr*. 2010;4(3):382–90.
69. Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2007;25(1):649–79. Available

from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115715>

70. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(7):489–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2993>
71. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2011;27(1):539–62. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-092910-154008>
72. Pearse G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):504–14.
73. Haynes BF, Sempowski GD, Wells AF, Hale LP. The human thymus during aging. *Immunol Res*. 2000;22(2–3):253–61.
74. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J Exp Med* [Internet]. 2001;194(2):127–34. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.194.2.127>
75. Capone M, Hockett RD, Zlotnik A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12522–7.
76. Petrie HT, Livak F, Burtrum D, Mazel S. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J Exp Med* [Internet]. 1995;182(1):121–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
77. Von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor α -chain: Not just a surrogate. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(7):571–7.
78. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive Selection of Thymocytes. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1995 Apr 1;13(1):93–126. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1085>
79. Palmer E. Negative selection - Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):383–91.
80. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(12):833–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2669>
81. Cejalvo T, Sacedón R, Hernández-López C, Diez B, Gutierrez-Frías C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology*. 2007;121(1):94–104.
82. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* [Internet]. 2002;196(2):163–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Licona-Limón P, Alemán-Muench G, Chimal-Monroy J, Macías-Silva M, García-Zepeda EA, Matzuk MM, et al. Activins and inhibins: Novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Apr;381(2):229–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X09002824>
84. Aleman-Muench GR, Mendoza V, Stenvers K, Garcia-Zepeda EA, Lopez-Casillas F, Raman C, et al. Betaglycan (T β RIII) Is Expressed in the Thymus and Regulates T Cell Development by Protecting Thymocytes from Apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(8):1–10.
85. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn*. 2006;235(4):1124–32.
86. Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. Transforming growth factor- β - and activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol*. 2003;15(12):1401–14.

87. Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol*. 2012;42(3):749–59.
88. Heng TSP, Painter MW, Immunological T, Project G. The Immunological Genome Project : networks of gene expression in immune cells. 2008;9(10):1091–4.
89. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606–16.
90. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(4):959–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
91. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198–201.
92. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al. Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization. *J Exp Med* [Internet]. 1999;189(3):451–60. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.189.3.451>
93. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 2000;406(6793):309–14.
94. Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, et al. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell*. 1995;80(4):603–9.
95. Munday J, Floyd H, Crocker PR. Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol*. 1999;66(5):705–11.
96. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(2):118–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3383>
97. Eloranta ML, Alm G V. Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon- α/β producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand J Immunol*. 1999;49(4):391–4.
98. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: Innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(3):177–86.
99. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal Zone, but Not Follicular B Cells, Are Potent Activators of Naive CD4 T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2004;172(2):803–11. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.2.803>
100. Pape KA, Kouskoff V, Nemazee D, Tang HL, Cyster JG, Tze LE, et al. Visualization of the Genesis and Fate of Isotype-switched B Cells during a Primary Immune Response. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(12):1677–87. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20012065>
101. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney JF. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. 2002;17(3):341–52.
102. Nolte MA, 'T Hoen ENM, Van Stijn A, Kraal G, Mebius RE. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur J Immunol*. 2000;30(2):626–34.
103. Suryani S, Fulcher DA, Santner-nanan B, Nanan R, Wong M, J P, et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*. 2010;23(C):519–29.
104. Zhang W, Guo Y, Li B, Zhang Q, Liu J, Gu G, et al. GDF11 Rejuvenates Cerebrovascular Structure and Function in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2018;62(2):807–19. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-170474>

105. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-) [Internet]. 2015;347(6220):1260419–1260419. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1260419>
106. Heng TSP, Painter MW. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2008;9(10):1091–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18800157>
107. Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V, Harris RA. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol*. 2014;79(5):305–14.
108. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(4):229–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.02.004>
109. Lu L, Wang J, Zhang F, Chai Y, Brand D, Wang X, et al. Role of SMAD and Non-SMAD Signals in the Development of Th17 and Regulatory T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(8):4295–306. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0903418>
110. Miles DC, Wakeling SI, Stringer JM, van den Bergen JA, Wilhelm D, Sinclair AH, et al. Signaling through the TGF Beta-Activin Receptors ALK4/5/7 Regulates Testis Formation and Male Germ Cell Development. *PLoS One*. 2013;8(1):1–16.
111. Pons M, Koniaris LG, Moe SM, Gutierrez JC, Esquela-Kerscher A, Zimmers TA. GDF11 induces kidney fibrosis, renal cell epithelial-to-mesenchymal transition, and kidney dysfunction and failure. *Surg (United States)* [Internet]. 2018;164(2):262–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.03.008>
112. Wang Z, Dou M, Liu F, Jiang P, Ye S, Ma L, et al. GDF11 induces differentiation and apoptosis and inhibits migration of C17.2 neural stem cells via modulating MAPK signaling pathway. *PeerJ* [Internet]. 2018;6:e5524. Available from: <https://peerj.com/articles/5524>
113. Ge G, Hopkins DR, Ho W-B, Greenspan DS. GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Jul 15;25(14):5846–58. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.25.14.5846-5858.2005>
114. Martinez GJ, Zhang Z, Chung Y, Reynolds JM, Lin X, Jetten AM, et al. Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35283–6.
115. Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, Tanaka S, Chung Y, Liu T, et al. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells. *J Biol Chem*. 2010;285(38):29039–43.
116. Wakabayashi Y, Tamiya T, Takada I, Fukaya T, Sugiyama Y, Inoue N, et al. Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor- β -smad pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35456–65.
117. Den Haan JMM, Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun*. 2012;4(5–6):437–45.
118. Li H, Li Y, Xiang L, Zhang J, Zhu B, Xiang L, et al. GDF11 Attenuates Development of Type 2 Diabetes via Improvement of Islet β cell Function and Survival [Internet]. *Diabetes*. 2017. p. db170086. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450417%0Ahttp://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db17-0086>
119. Gu B, Wang Q, Dai W, Ma G, Song Y, Wu Q. Effect of GDF11 on proliferation and apoptosis of esophageal cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* [Internet]. 2018;64(11):80–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30213293>
120. Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2002;307(1):1–14.
121. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in

- the thymus. *Nature* [Internet]. 1994 Nov 3;372(6501):100–3. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/372100a0>
122. Daley SR, Teh C, Hu DY, Strasser A, Gray DHD. Cell death and thymic tolerance. *Immunol Rev*. 2017;277(1):9–20.
 123. Sawai H, Domae N. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Aug;411(3):569–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.186>
 124. Lecoeur H, De Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods*. 2002;265(1–2):81–96.
 125. Brauchle E, Thude S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci Rep*. 2014;4:1–9.
 126. Wildey GM, Patil S, Howe PH. Smad3 potentiates transforming growth factor. 2003;44195(216).
 127. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β -induced apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):366–72.
 128. Yang J, Song K, Krebs TL, Jackson MW, Danielpour D. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF- β -induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene*. 2008;27(40):5326–38.
 129. Shi S, Yu L, Zhang T, Qi H, Xavier S, Ju W, et al. Smad2-Dependent Downregulation of miR-30 Is Required for TGF- β -Induced Apoptosis in Podocytes. *PLoS One*. 2013;8(9):1–11.
 130. Hashimoto O, Yamato K, Koseki T, Ohguchi M, Ishisaki A, Shoji H, et al. The role of activin type I receptors in activin A-induced growth arrest and apoptosis in mouse B-cell hybridoma cells. *Cell Signal*. 1998;10(10):743–9.
 131. Kim BC, Van Gelder H, Kim TA, Lee HJ, Baik KG, Chun HH, et al. Activin receptor-like kinase-7 induces apoptosis through activation of MAPKs in a Smad3-dependent mechanism in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(27):28458–65.
 132. Zhao F, Huang F, Tang M, Li X, Zhang N, Amfilochiadis A, et al. Nodal induces apoptosis through activation of the ALK7 signaling pathway in pancreatic INS-1 β -cells. *AJP Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;303(1):E132–43. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00074.2012>
 133. Munir S, Xu G, Wu Y, Yang B, Lala PK, Peng C. Nodal and ALK7 inhibit proliferation and induce apoptosis in human trophoblast cells. *J Biol Chem*. 2004;279(30):31277–86.
 134. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming Growth Factor β 1 Inhibits Fas Ligand Expression and Subsequent Activation-induced Cell Death in T Cells via Downregulation of c-Myc. *J Exp Med* [Internet]. 1999 Jan 18;189(2):231–9. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.189.2.231>
 135. Filippi CM, Juedes AE, Oldham JE, Ling E, Togher L, Peng Y, et al. Transforming Growth Factor- β Suppresses the Activation of CD8 $^{+}$ T-Cells When Naive but Promotes Their Survival and Function Once Antigen Experienced: A Two-Faced Impact on Autoimmunity. *Diabetes* [Internet]. 2008 Oct 1;57(10):2684–92. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db08-0609>
 136. McKarns SC, Schwartz RH. Distinct Effects of TGF- β 1 on CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T Cell Survival, Division, and IL-2 Production: A Role for T Cell Intrinsic Smad3. *J Immunol* [Internet]. 2005;174(4):2071–83. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.174.4.2071>
 137. Ouyang W, Omar Beckett, Qian Ma, Li MO. Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity*. 2011;32(5):642–53.
 138. Hinck AP. Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett* [Internet]. 2012 Jul 4;586(14):1860–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.028>