

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

LARISSA VASCONCELOS FONTES

**Interações de células T reguladoras tímicas com a matriz extracelular:  
estudos em camundongos geneticamente deficientes em Wasp**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

**RIO DE JANEIRO**

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F683 Fontes, Larissa Vasconcelos

Interações de células T reguladoras tímicas com a matriz extracelular: estudos em camundongos geneticamente deficientes em Wasp / Larissa Vasconcelos Fontes. – Rio de Janeiro, 2016.

xiv, 103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 69-87

1. Wasp. 2. Treg. 3. Timo. 4. Fibronectina. I. Título.

CDD 616.43

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: LARISSA VASCONCELOS FONTES***

**Interações de células T reguladoras tímicas com a matriz extracelular: estudos em camundongos geneticamente deficientes em Wasp**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida**

**Aprovada em: 28/01/2016**

**EXAMINADORES:**

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

**Profa. Dr. Marcelo Pelajo Machado – IOC - Fiocruz**

**Profa. Dra. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio - UFRJ**

**Profa. Dra. Valéria de Mello Coelho - UFRJ**

**Profa. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz – IOC - Fiocruz**

Rio de Janeiro, 28 de janeiro de 2016

Dedico essa tese aos meus pais que sempre me apoiam em todas as minhas escolhas.  
Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento é complicado para pessoas emotivas como eu. Eu choro por tudo, tudo mesmo. Choro de alegria, de nervoso, de tristeza, de emoção. Choro até vendo novela, e, confesso, às vezes choro vendo o noticiário. Mas com certeza hoje choro de alegria. Alegria por estar completando mais uma etapa da minha vida profissional. E é nesse momento que a gente deve agradecer. Começo agradecendo ao meu orientador, Vinícius, pela oportunidade de ser sua aluna, pela paciência, pelo aprendizado enorme que me proporcionou, pela liberdade aluno-orientador e pela amizade. Muito obrigada de coração, você é um orientador e profissional sensacional.

Em seguida, e não menos importante, quero agradecer à minha família. Meu pai pelo apoio afobado, sempre cheio de dúvidas sobre “o que é o mestrado”, pelo carinho, por me pegar na Fiocruz tarde depois dos experimentos, pelo amor e atenção. Minha mãe pela amizade mais sincera e verdadeira que pode existir, por me aconselhar, fazer minha comida pra levar para o laboratório e por ser essa mãe fantástica. Minha irmã, mesmo estando fora na maior parte do mestrado, esteve sempre presente via “whatsapp”, mas além disso, sempre vai ser minha melhor amiga, companheira e amor da minha vida. Um obrigada a todos os meus tios, tias, primos e avós. Obrigada família por ser a melhor família do mundo, essa vitória só seria possível com o apoio emocional de vocês.

Falando em apoio emocional, obrigada Guilherme, por não ser somente um namorado e sim um amigo. Obrigada pela compreensão nos momentos em que eu não podia te encontrar nos finais de semana, pela atenção nas minhas crises existenciais e por todo amor que você me dá todos os dias. Obrigada por confiar no meu potencial, muitas vezes até mais do que eu.

Não poderia deixar de agradecer a todos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, pesquisadores, alunos, tecnologistas, técnicos, ao apoio gerencial e de projetos. Cada um de vocês, de alguma maneira, engrandeceu meu conteúdo científico e também o não-científico. Aos meus amigos do LPT, obrigada pelo dia-a-dia, pelas conversas entre experimentos, pelas idas ao Outback no *happy-hour*, pelas festas do laboratório e por fazerem do trabalho algo menos monótono do que em outros lugares. Obrigada aos pesquisadores pelos artigos discutidos, pelas sugestões e pelo carinho. Um obrigada especial ao Arnon Jurberg, meu co-orientador, pelos conselhos e ajuda durante toda essa fase. Além dele, gostaria de agradecer à Rafaella Reis, que era do meu grupo, e diversas vezes me ajudou em experimentos, em novos procedimentos e com a simples companhia. Vocês todos são parte importante do meu progresso e da minha conquista, obrigada!

Gostaria de agradecer também, meus amigos da vida. Os do colégio, da faculdade e do condomínio. Obrigada pelo apoio nos momentos de desespero nas seleções, obrigada por não desistirem de serem meus amigos, mesmo não tendo tanto tempo assim pra vocês e obrigada pela amizade. Vocês são demais, não poderia pedir melhores!

Devo ainda, agradecer ao Dr. Marcelo Pelajo e ao Dr. Pedro Paulo pelas imagens de microscopia de super-resolução, ao Dr. Matheus Rajão pelas imagens de microscopia confocal e ao Centro de experimentação animal (CECAL) pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho.

Ainda gostaria de agradecer à banca examinadora dessa dissertação. Dr. Geraldo, Dr. Marcelo, Dra. Tatiana, Dra. Daniella e Dra. Valéria, obrigada por aceitarem o convite e por me ajudarem a dar um passo importante na minha carreira.

Por fim, obrigada a todos que de algum modo me influenciaram e me ajudaram a concluir essa etapa!

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADAMs – desintegrinas e metaloproteinases de adesão

AIRE - regulador autoimune (do inglês, “autoimmune regulator”)

APC – célula apresentadora de antígeno (do inglês, “antigen presenting cell”)

BR – região básica (do inglês, “basic region”)

T CD4 SP – linfócitos T CD4 simples-positivos, fenótipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>

CD8 SP - linfócitos T CD8 simples-positivos, fenótipo fenótipo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>

Cdc42 – (do inglês, “cell division cycle 42”)

cTEC – células epiteliais tímicas do córtex

CTL – linfócito T CD8 citotóxico (do inglês, “Cytotoxic T lymphocyte”)

CTLA-4 – (do inglês, “cytotoxic T lymphocyte-associated protein”)

CXCL – quimiocinas

DMD – Distrofia muscular de Duchene

DN – duplo-negativo, fenótipo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>

DP – duplo-positivo, fenótipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

ECM – matriz extracelular (do inglês, “extraellular matrix”)

EVH – (do inglês, “N-terminal ena/VASP homology 1)

fibronectina – fibronectina

Foxp3 – fator de transcrição de células T reguladoras (do inglês, “forkhead box 3”)

GBD – (do inglês, “GTPase-binding domain)

GITR – (do inglês, “glucorticoid-induced TNFR family related gene”)

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1 (do inglês, “intracellular adhesion molecule-1”)

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IPEX – Síndrome ligada ao X

ITAM – (do inglês, “immunoreceptor tyrosine-based activation motif”)

iTreg– células T reguladoras induzidas

mDCs – células dendríticas da região medular do timo

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, “major histocompatibility complex”)

MMPs – metaloproteinases de matriz

mTEC – células epiteliais tímicas da medula

NOD – camundongo diabético não obeso (do inglês, “nonobese diabetc mouse”)

NRP1 – neuropilina 1

PD-1 – (do inglês, “programmed cell death”)

PPP – região rica em poliprolina (do inglês, “polyproline-rich region”)

pTreg- células T reguladoras de origem periférica

SIP – esfingosina 1 fosfato

SIP1 – receptor de esfingosina 1 fosfato

SCF – fator de célula tronco (do inglês, stem cell factors)

SPHK1 – esfingosina quinase

STAT – fator de transcrição (do inglês, “signal transducer and activator of transcription”)

TCR – receptor de célula T (do inglês, “T cell receptor”)

TEC – células epiteliais tímicas (do inglês, “thymic epithelial cells”)

TGF- $\beta$  – fator de transformação e crescimento celular (do inglês, “transforming growth factor beta”)

TH – linfócito T *helper*

TNC – célula nutriz do timo (do inglês, thymic nurse cell)

TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, “tumor necrosis factor”)

Treg – células T reguladoras

tTreg - células T reguladoras de origem tímica

TSAs – antígenos próprios tecido específicos (do inglês, “tissue-specific self antigens”)

VCA – (do inglês, “verprolin homology; cofilin homology domain; acid region”)

VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1 (do inglês, vascular “cell adhesion molecule-1”)

VLA – antígeno muito tardio (do inglês, “very late antigen”)

WAS – Síndrome de Wiskott-Aldrich (do inglês “Wiskott-Aldrich Syndrome”)

WASP – proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich do inglês “Wiskott-Aldrich Syndrome protein”)

WH1 – domínio 1 homólogo a WASP (do inglês, “WASP homology domain 1”)

WIP – proteína de interação com WASP (do inglês, “WASP interaction protein”)

WT – camundongo controle (do inglês “wild type”)

WKO – camundongo geneticamente deficiente em Wasp (do inglês, “Wasp knockout”)

XLN – netropenia ligada ao X (do inglês, “X linked neutropenia”)

XLT – trombocitopenia ligada ao X (do inglês, “X linked thrombocytopenia”)



# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1) O TIMO.....	1
1.2) DESENVOLVIMENTO, MATURAÇÃO E SELEÇÃO DE TIMÓCITOS .....	4
1.3) A REDE DE MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) .....	6
1.3.1) A FIBRONECTINA E O TIMO .....	7
1.3.2) AS INTEGRINAS .....	9
1.3.3) OUTRAS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS COM A ECM .....	9
1.4) AS CÉLULAS T REGULADORAS .....	11
1.4.1) HISTÓRICO .....	11
1.4.2) MARCADORES DE CÉLULAS TREG.....	12
1.4.3) SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS TREG .....	14
1.4.4) GERAÇÃO DE CÉLULAS TREG NO TIMO .....	16
1.4.5) MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DE TREG .....	18
1.4.6) MECANISMOS DE AÇÃO DE CÉLULAS TREG.....	20
1.5) A SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.....	22
1.5.1) WASP EM NÍVEL MOLECULAR .....	23
1.5.2) A WASP E AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE .....	24
1.5.3) A WASP E AS CÉLULAS TREG.....	27
2. JUSTIFICATIVA/RACIONAL.....	29
3. OBJETIVOS .....	30

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1) Animais .....	31
4.2) Anticorpos e moléculas .....	31
4.3) Obtenção de células .....	32
4.4) Fenotipagem de tTreg por citometria de fluxo .....	32
4.5) Ativação, proliferação e morte de tTreg.....	34
4.6) Ensaio de adesão .....	36
4.7) Obtenção de tecidos .....	37
4.8) Análises da interação de células tTreg com a fibronectina tímica.....	38
4.9) Análises Estatísticas.....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1) Diminuição da rede de fibronectina na região medular tímica de camundongos WKO .....	40
5.2) O timo de camundongos WKO apresenta um aumento percentual de células CD4 SP e uma diminuição percentual de células tTreg .....	43
5.3) Diminuição de células tTreg expressando receptores para fibronectina no timo de camundongos WKO.....	45
5.4) Diminuição em células precursoras de tTreg expressando receptores para fibronectina em timo de camundongos WKO.....	47
5.5) Células tTreg e seus precursores provenientes de animais WKO apresentam alterações nas propriedades de ativação recente e proliferação após estimulação in vitro .....	50
5.6) Células tTreg obtidas do timo de animais WKO aderem menos à fibronectina.....	54
5.7) Células tTreg WKO aderentes à fibronectina apresentam alterações em estruturas celulares dependentes de rearranjo de citoesqueleto de actina.....	56
6. DISCUSSÃO .....	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9.1) ANEXO 1 .....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Localização anatômica do timo em humanos.....	1
Figura 2: Fotomicrografia histológica de timo humano.....	2
Figura 3: Representação Esquemática da Migração Intratímica de Linfócitos T e Microambiente Tímico.....	3
Figura 4: A visão do desenvolvimento de células T nas zonas de sinalização.....	6
Figura 5: Molécula de fibronectina.....	8
Figura 6: Os tipos Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer durante a diferenciação dos timócitos.....	10
Figura 7: Sinalização nos processos de diferenciação de células Treg.....	18
Figura 8: Estrutura e domínios de WASP.....	24
Figura 9: Representação do fluxo das análises citofluorométricas.....	34
Figura 10: Representação do fluxo das análises citofluorométricas II.....	36
Figura 11: Representação do fluxo das análises citofluorométricas III.....	38
Figura 12: Diminuição da rede de fibronectina e do número de células tTreg na região medular tímica de camundongos WKO.....	41
Figura 13: Diminuição da rede de fibronectina e do número de células tTreg na região medular tímica de camundongos WKO por microscopia convencional.....	42
Figura 14: Diminuição da rede de fibronectina na região medular tímica de camundongos WKO.....	43
Figura 15: Análise da celularidade e das populações de timócitos CD4 SP e tTreg em camundongos WKO e controle.....	44
Figura 16: Análise de CD49d em camundongos WKO e controle.....	46
Figura 17: Análise de CD49e em camundongos WKO e controle.....	47
Figura 18: Análise de CD49f em camundongos WKO e controle.....	47
Figura 19: Análise dos valores da população de precursores no timo de camundongos WT e WKO.....	48
Figura 20: Análise de CD49d em precursores de Treg de camundongos WKO e controle.....	49
Figura 21: Análise de CD49e em precursores de Treg de camundongos WKO e controle.....	50
Figura 22: Análise <i>ex vivo</i> da ativação, proliferação e morte de células tTreg e precursores.....	52
Figura 23: Análise da ativação, proliferação e morte de células tTreg e precursores.....	53
Figura 24: Análise da adesão de timócitos em fibronectina.....	55

Figura 25: Análise de CD49d e CD49e em células tTreg e precursores.....	56
Figura 26: Interação das células T CD4 com a fibronectina.. .....	58
Figura 27: Espalhamento celular pós adesão e número de filopódios.. .....	59
Figura 28: Hipótese de estudo.. .....	68

## **ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1: Moléculas identificadas como marcadores de células Treg murina. ....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 2: Efeitos da ausência ou deficiência de Wasp em células do sistema imune .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 3: Anticorpos e moléculas utilizados durante o trabalho .....</b>	<b>31</b>



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Interações de células T reguladoras tímicas com a matriz extracelular: estudos em camundongos geneticamente deficientes em Wasp**

## RESUMO

### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Larissa Vasconcelos Fontes**

A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS – “Wiskott-Aldrich Syndrome”) é uma imunodeficiência primária associada a infecções recorrentes e ao desenvolvimento de doenças autoimunes e linfomas. Essa imunodeficiência se desenvolve em consequência de mutações no gene que codifica a proteína WASP (“WAS Protein”), expressa em células hematopoiéticas, e com funções reguladoras sobre os rearranjos do citoesqueleto de actina e na ativação de linfócitos T. Nesse sentido, camundongos deficientes em Wasp (Wasp “knockout” – WKO) apresentam desregulação de processos centrais para a resposta imunológica, resultando em migração leucocitária aberrante, proliferação linfocitária deficiente, e disfunção de células T reguladoras (Treg). De forma interessante, foi demonstrado que as células Treg, definidas pelo fenótipo  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  e com função imunossupressora, já se encontram em menor número no timo desses animais. Esse dado sugere que a deficiência em Wasp resulta em defeito na geração intratímica de células Treg. Nesse contexto, é importante salientar que a migração do timócito através do microambiente tímico é crucial para a formação das células T e, particularmente, a matriz extracelular exerce uma função determinante para os eventos de adesão e de-adesão da célula migrante. Assim, podemos postular que a matriz extracelular medeia interações cruciais para as células Treg tímicas (tTreg), fornecendo e facilitando o acesso aos diferentes sinais celulares durante o processo de maturação dessas células. Nesse projeto, decidimos estudar a participação de ligantes e receptores da matriz extracelular na maturação de células tTreg e o possível envolvimento dessas moléculas na deficiência numérica de células tTreg em camundongos WKO. Foi observada uma diminuição da rede de fibronectina na região medular do timo dos animais WKO em relação ao controle. Além disso, observamos uma redução de células tTreg expressando VLA-4 e VLA-5 nos animais WKO em relação ao controle. As análises de proliferação, ativação e morte demonstraram que as células Treg de animais WKO apresentam alterações em relação às células precursoras ( $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ ). De forma interessante, as análises de adesão em fibronectina demonstraram que as células Treg dos animais WKO apresentam menos filopódios que as células Treg do controle, e que essa diminuição é proeminente comparando-se às células T  $CD4^+SP$ . Esses resultados sugerem que a fibronectina tenha importância na diferenciação das células tTreg.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Interações de células T reguladoras tímicas com a matriz extracelular: estudos em camundongos geneticamente deficientes em Wasp**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Larissa Vasconcelos Fontes**

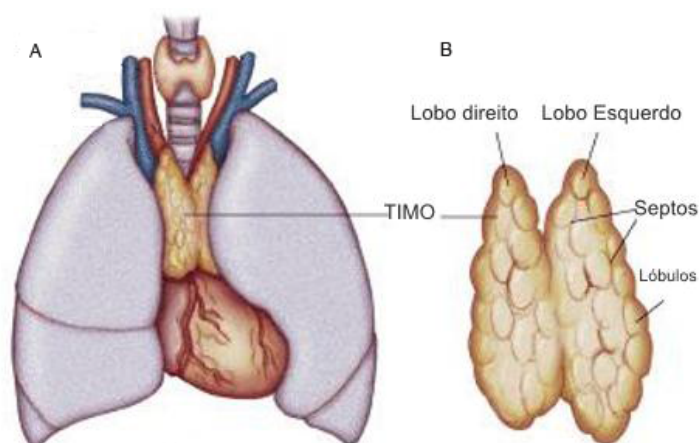
The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a primary immunodeficiency associated with recurrent infection and development of autoimmune diseases and lymphomas. This immune deficiency develops as a result of mutations in the gene encoding the WASP protein ("WAS protein"), expressed in hematopoietic cells, and with regulatory functions on the actin cytoskeleton rearrangements and activation of T lymphocytes. Accordingly, mice deficient in Wasp (Wasp "knockout" - WKO) present disruption in central processes to the immune response, resulting in aberrant leukocyte migration, impaired lymphocyte proliferation and dysfunction of regulatory T cells (Treg). Interestingly, it was shown that Treg cells defined by the  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  phenotype and immunosuppressive function, already decreased in the thymus of the animals. This suggests that the Wasp deficiency results in defective intrathymic generation of Treg cells. In this context, it is important to note that the migration of the thymocyte through the thymic microenvironment is crucial for the formation of T cells and, particularly, the extracellular matrix has a decisive role in the events of adhesion and de-adhesion of migrant cell. Thus, we postulated that the extracellular matrix mediates interactions crucial for thymic Treg cells (tTreg) by providing and facilitating access to different cellular signals during the maturation process of these cells. In this project, we decided to study the role of ligands and receptors of extracellular matrix in the maturation of tTreg cells and the possible involvement of these molecules in numerical deficiency tTreg WKO cells in mice. We observed a decrease in fibronectin network in the medulla of the thymus of WKO animals compared to the control. In addition, a decrease in cells expressing VLA-4 and VLA-5 in WKO animals compared to the control. The analysis of proliferation, activation, and death demonstrated that Treg cells animals in WKO showed changes from precursor cells ( $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ ). Interestingly, adhesion on fibronectin showed that Treg cells from WKO animals present less filopodia compared to control Treg cells and that this is a marked decrease as compared to the CD4 SP cells. These results suggest an important role for fibronectin in the differentiation of Treg cells.

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é originado a partir de células-tronco hematopoiéticas, provenientes do fígado fetal e da medula óssea, que colonizam órgãos específicos para seu amadurecimento e seleção, dando origem a células responsáveis pelo sistema imune inato e adaptativo. O sistema imune adaptativo envolve uma complexa rede de mecanismos de defesa e regulação, capitaneados por linfócitos T e B, e que estão diretamente relacionados com o reconhecimento de antígenos por receptores específicos (Flajnik e Kasahara 2010). A formação do repertório de linfócitos T ocorre essencialmente em um órgão especializado, o timo, e consiste em etapas determinantes durante o desenvolvimento dos timócitos, dependendo do controle de diferentes interações moleculares com células do microambiente tímico (Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007).

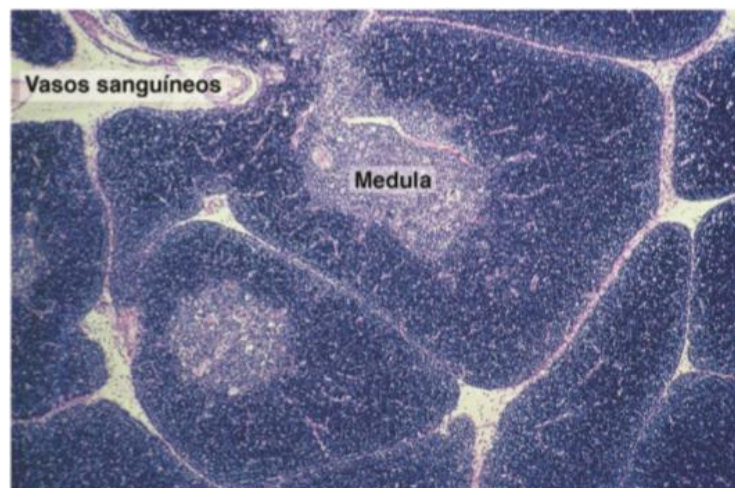
### 1.1) O TIMO

O timo é um órgão linfoide primário, bilobado, situado no mediastino anterior, na altura dos vasos que emergem do coração (**Figura 1**). É revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, de onde partem septos que dividem cada lobo em lóbulos contínuos. Estes apresentam uma região externa chamada córtex, onde existe uma densa acumulação de linfócitos, e uma região medular central, menos povoada por células linfoides (**Figura 2**). O lóbulo tímico pode ser dividido em 4 compartimentos distintos: a zona subcapsular, o córtex, a junção córtico-medular e a medula (Crivellato et al. 2004; Gameiro et al. 2010).



**Figura 1: Localização anatômica do timo em humanos.** (A) Localização do timo no mediastino anterior. (B) O timo dividido em lobo direito e lobo esquerdo, as setas demonstram os septos que dividem o lobo em lóbulos. Fonte: Modificado de <http://my.opera.com/khabat/blog/thymus-gland>

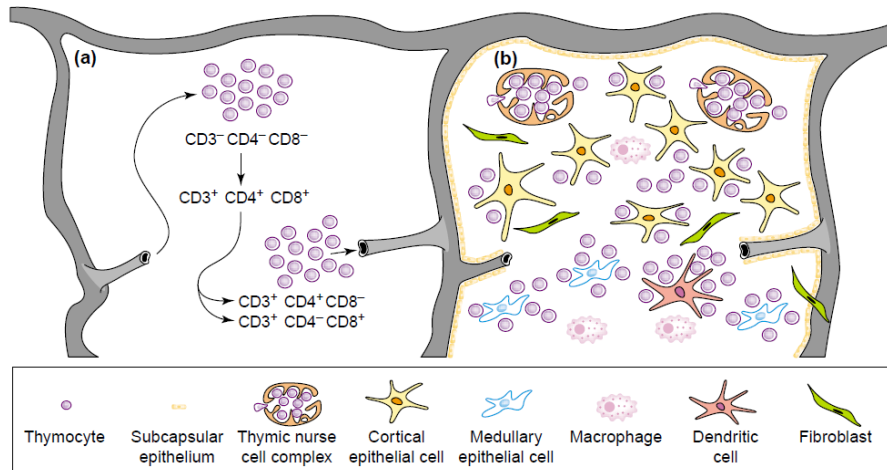




**Figura 2: Fotomicrografia histológica de timo humano.** Fotomicrografia representativa de vários lóbulos, onde é possível distinguir a área medular, clara, e a zona cortical, escura. Coloração por pararosanilina e azul-de-toluidina. Pequeno aumento. **Fonte:** Junqueira, L.C.U & Carneiro, J. , 2008.

O parênquima tímico (**Figura 3**) é principalmente constituído por timócitos em processo de desenvolvimento e seu microambiente, composto por células não linfoides, como células epiteliais tímicas corticais (cTECs), células epiteliais tímicas medulares (mTECs), fibroblastos, células dendríticas e macrófagos. O timo se organiza de maneira tridimensional e tem uma rede de matriz extracelular (ECM) entremeadada a todos esses componentes (van Ewijk et al. 1999; revisado por Savino et al. 2004). Esta rede celular envolve os vasos sanguíneos no córtex e efetivamente isola linfócitos em desenvolvimento excluindo a possibilidade de contaminação dessas células com antígenos próprios (barreira hematotímica), um mecanismo fundamental para que ocorra a tolerância central, que é responsável por eliminar células autorreativas ainda no timo (Sprenst et al. 2001; Gameiro et al. 2010)

As TECs são populações heterogêneas de células que vão povoar o timo e ocupar regiões específicas. Elas podem formar nichos especiais, como, por exemplo, a célula nurse do timo (TNC, do inglês, “thymic nurse cell”), que se localiza no córtex e pode abrigar um grande número de timócitos. E, por apresentarem altos níveis de MHC de classe I e II (moléculas do complexo principal de histocompatibilidade) podem ser responsáveis pela seleção positiva dos timócitos em desenvolvimento. Na medula, as TECs encontram-se menos conectadas, porém, são heterogêneas (revisado por Crivellato et al. 2004; Savino et al. 2004). Essas células, também vão produzir citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos e hormônios essenciais para a migração e diferenciação dos timócitos (Savino e Dardenne 2010; Savino et al. 2015b).



**Figura 3: Representação Esquemática da Migração Intratímica de Linfócitos T e Microambiente Tímico.** (A) Um modelo simplificado de migração do timócito, desde a entrada do precursor na junção córtico-medular, sua migração dentro do órgão com consequente diferenciação, até a formação do timócito maduro CD4+ ou CD8+. (B) Esquema do lóbulo tímico mostrando a relação entre os timócitos e o microambiente tímico de acordo com a região em que se encontra. **Fonte:** Savino et. al., 2002.

As citocinas são peptídeos solúveis produzidos pelo microambiente tímico, e algumas agem como fatores de crescimento e são responsáveis pela estimulação da linfopoiese. As citocinas comumente produzidas são as interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-7 e fator de célula tronco (SCF, do inglês “stem cell factor”). A IL-7 desempenha um papel no comprometimento com células T auxiliando na diferenciação e sobrevivência, sendo produzido por todo estroma, e a IL-2 é necessária para a sobrevivência e para a função das células Treg (Savino et al. 2004; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007).

Já as quimiocinas (citocinas quimiotáticas), contribuem para a funcionalidade do microambiente tímico em dirigir o processo migratório dos timócitos. Dependendo da fase de maturação, os timócitos mudam a expressão dos receptores de quimiocinas. A maioria das quimiocinas é encontrada na forma solúvel e pode ser imobilizada pelas moléculas da ECM. As quimiocinas são cruciais para o tráfego linfocitário, como por exemplo, a CCL21, CCL25 e CXCL12 que são quimioatrativos vitais em diferentes estágios de maturação dos timócitos propiciando que os precursores de células T alcancem a camada cortical; CXCL2 e CXCR4 medeiam o fluxo de timócitos da região sub-capsular à região córtico-medular dirigindo o timócito à região medular e, por fim, as quimiocinas CCL19 e CCL21 estão envolvidas na saída de timócitos maduros para periferia (revisado em Gameiro et al. 2010).

Além desses componentes, o timo ainda vai apresentar uma densa rede de ECM que vai auxiliar no tráfego de timócitos por todo parênquima tímico, voltaremos a falar desse componente no tópico 1.3.

A migração dos timócitos em desenvolvimento através deste microambiente especializado é crucial para a sua maturação, seleção e determina a função desse repertório de células T (Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007), eventos que discutiremos a seguir.

## 1.2) DESENVOLVIMENTO, MATURAÇÃO E SELEÇÃO DE TIMÓCITOS

As células do microambiente tímico e a ECM emitem múltiplos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos, e que são essenciais para a manutenção da população de células T circulantes. Em resposta a estes sinais, os timócitos em desenvolvimento são induzidos a proliferar e migrar através do parênquima tímico, diferenciando-se em linfócitos T maduros. Estas etapas do desenvolvimento dos linfócitos T ocorrem em regiões anatômicas específicas do timo, onde existem diferentes células microambientais especializadas (Savino et al. 2004; Von Boehmer 2004; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007).

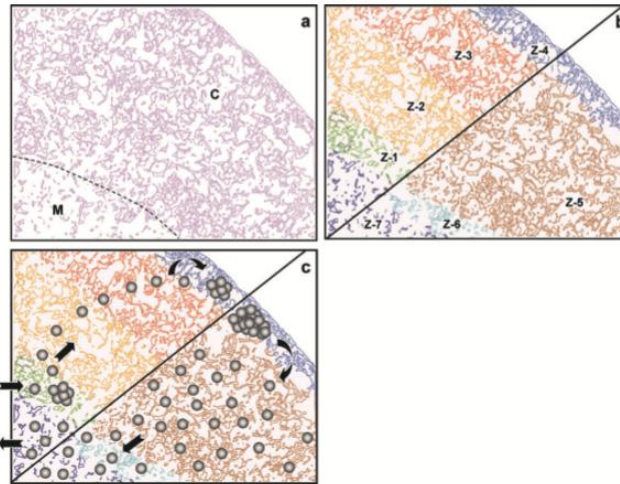
Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo migram ativamente pelo órgão, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-ECM ou, ainda, através da liberação de fatores solúveis (Savino et al. 2002, 2004; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Savino e Dardenne 2010).

Conforme citado previamente, timócitos em diferentes estágios de maturação ocupam regiões distintas no timo, indicando que a diferenciação é simultânea com a altamente coordenada migração através do microambiente (**Figura 4**). Os progenitores imaturos provenientes da medula óssea (ETPs) entram na junção córtico-medular. Essas células migram para a zona subcapsular no córtex e passam a ser chamados de duplo-negativos (estágio DN1) por não expressarem os correceptores CD4 ou CD8 nem o CD25 ( $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$ ) (Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). No córtex, essas células passam a expressar o CD25 (a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2), e então passam a ser chamadas de DN2 ( $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$ ) (Schmitt et al. 2004; Hauri-Hohl et al. 2014). Na fase DN2 começa a acontecer a recombinação do TCR, a recombinação D-J, divergindo em duas linhagens  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$ . A primeira recombinação acontece no TCR $\gamma$  e TCR $\delta$ . Dessa forma, os timócitos comprometidos com a linhagem  $\gamma\delta$  são formados primeiro (Dudley et al. 1994; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Já na fase DN3 ( $CD4^-CD8^-CD44^-CD25^+$ ), o locus do TCR $\beta$  sofre a recombinação V-DJ e o timócito em maturação passa a apresentar então o pré-TCR, as células que tem um rearranjo improdutivo sofrem

apoptose e são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas. Esse processo é conhecido como seleção  $\beta$  (Dudley et al. 1994; Surh e Sprent 1994). Se a recombinação tem êxito, ocorre uma redução da expressão de CD25 e a expansão de timócitos, chamados então de DN4 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) (Crompton et al. 1994; Yamasaki et al. 2006). Os timócitos continuam sua migração em direção à medula e sofrem o rearranjo da cadeia  $\alpha$  do TCR e passam então a expressar os dois receptores CD4 e CD8, nesse estágio as células têm fenótipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e são chamadas de duplo-positivas (DP) (Petrie et al. 1993; Dudley et al. 1994). Durante a migração, as cTECs apresentam peptídeos através da molécula de MHC às células em desenvolvimento. As células que interagem com baixa afinidade estão aptas a sobreviver, e ao reconhecer as moléculas de MHC de classe I se tornam células simples-positivas (SP) para o receptor CD8 e as células que reconhecem as moléculas MHC de classe II se tornam células T CD4 SP. Esse mecanismo é denominado de seleção positiva e auxilia para que as células aptas continuem a migração até a medula, onde elas vão terminar sua maturação, além de desencadear uma maquinaria transcricional que operam distintamente para diferenciação final (Singer et al. 2009; Morris e Allen 2012). As células que se ligaram com alta avidéz ao MHC passam a estar sob controle de mecanismos de indução à tolerância. Esses mecanismos compreendem principalmente os processos de deleção clonal, edição de receptor, anergia e desvio clonal (Xing e Hogquist 2012).

Dentro da medula, o timócito sofre a seleção negativa ou deleção clonal, um mecanismo de tolerância que vai prevenir a autoimunidade. A deleção clonal é dependente das mTEC e das células dendríticas, mas a distinção é exercida em função da duração e força da interação com o TCR e os consequentes diferentes níveis de sinalização intracelular (Hinterberger et al. 2010). As mTECs vão apresentar antígenos próprios específicos de tecidos (TSAs do inglês “tissue-specific self-antigens”) e vão selecionar os timócitos aptos a saírem do timo. As células dendríticas medulares (mDCs) vão ser importantes na indução da apoptose nos timócitos autorreativos. Os timócitos que interagem com elevada afinidade e forte sinalização com o complexo MHC-peptídeo próprio entram em processo de morte por apoptose através da ativação da caspase 8. As mTECs expressam o gene AIRE (definido a partir do termo “autoimmune regulator”) que regula a expressão de diversos TSAs para desenvolvimento de timócitos de maneira dose-dependente, impedindo que células autorreativas saiam do timo (revisado em Savino e Dardenne 2010; Xing e Hogquist 2012; Passos et al. 2015). Além dessas células clássicas, foi visto recentemente que células B e os

próprios timócitos se ligando de forma estável a outros timócitos podem auxiliar na seleção negativa (Melichar et al. 2014).



**Figura 4: A visão do desenvolvimento de células T nas zonas de sinalização.** Os limites das principais áreas histológicas, córtex (C), e na medula (M), são demarcados por uma linha tracejada (a). Zonas 1 a 7 são codificados por cores e representam os estágios pelos quais o timócito vai transcorrer durante a maturação. A linha diagonal separa as zonas de movimento para o exterior (superior esquerdo), e o movimento para o interior (inferior direito) (b). O padrão de migração de células progenitoras no timo é representado por uma camada de células linfoides. As densidades relativas indicam vagamente zonas de proliferação de timócitos (c). **Fonte:** Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007.

Células que reconhecem com determinada avidéz aos antígenos apresentados pelo MHC de classe II das mTECs podem sofrer um desvio clonal, que compreende uma série de estímulos que levam à geração de células T reguladoras (Treg) que serão discutidas com mais detalhe no tópico 1.4 (Xing e Hogquist 2012).

### 1.3) A REDE DE MATRIZ EXTRACELULAR (ECM)

Durante a migração dos timócitos, os eventos de adesão e de-adesão, principalmente uma adesão moderada, são cruciais para que os timócitos entrem em contato com os sinais corretos para sua maturação. Nesse contexto, a rede de ECM é fundamental para esses eventos adesivos e de-adesivos, auxiliando no complexo tráfego intratímico de células T em desenvolvimento (Savino et al. 2004). Os fibroblastos e TECs vão expressar ainda a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), capaz de promover a adesão de timócitos maduros (Le and Singer 1993). O microambiente tímico produz diversas isoformas de glicoproteínas dessa complexa rede de ECM como, por exemplo, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV. Esses componentes serão fundamentais para os eventos adesivos que ocorrem no timo.

A ECM foi descrita no timo pela primeira vez na década de 60 (Henry 1967) e diversos estudos em nosso laboratório descreveram a presença e distribuição no timo de fibronectina, diversos tipos de colágeno e isoformas de laminina (Berrih et al. 1985); assim como tenascina (Freitas et al. 1995), além de moléculas que se associam à ECM, como a galectina (Villa-Verde et al. 2002). Foi mostrado que essas proteínas eram mais concentradas na região medular do timo, onde eram mais espessas e frequentes, quando comparadas às fibrilas no córtex (Lannes-Vieira et al. 1993; Savino et al. 2004; Gameiro et al. 2010).

Um componente fundamental da ECM são os colágenos que se apresentam em até 28 tipos diferentes. A principal característica estrutural de todos os colágenos é a existência de uma hélice tripla. O timo apresenta os colágenos tipo I, tipo III e tipo IV, que são encontrados nos septos, na cápsula tímica e em todo parênquima tímico (Berrih et al. 1985).

A laminina é uma glicoproteína que exibe propriedade de adesão em diversos sistemas. Sua estrutura é formada por 3 polipeptídeos (Colognato e Yurchenco 2000). Ela forma uma densa rede medular e uma rede fibrilar no córtex. A sua família é composta por mais de 16 variantes, mas um grupo restrito de variantes está expresso no timo, e a laminina-211 é a principal variante que está envolvida da progressão de células DN em DP através da adesão do timócito em desenvolvimento com a laminina (Lannes-Vieira et al. 1993; Ocampo et al. 2008; Savino et al. 2015a).

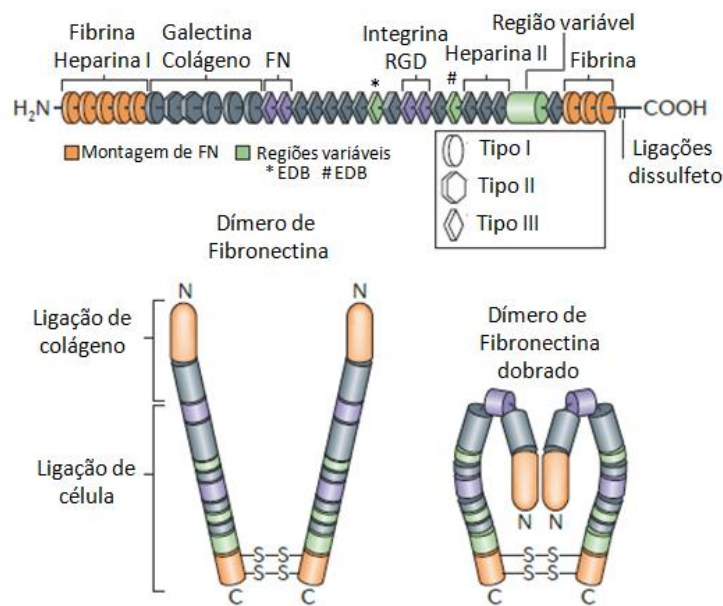
### **1.3.1) A FIBRONECTINA E O TIMO**

A fibronectina é secretada como uma glicoproteína grande com subunidades de tamanho entre 230kDa a 270kDa, que monta uma matriz fibrilar ao redor das células. Ela foi isolada pela primeira vez em 1978, do sangue, e foi caracterizada como um forma plasmática (Edsall 1978); a forma celular está presente em diversos tecidos. Cada subunidade de fibronectina consiste em três módulos de unidades de repetição, cada um dos quais tem estruturas distintas: tipo I, tipo II e tipo III (**Figura 5**). Esses módulos apresentam motivos de ligação aos quais as integrinas e outras regiões adesivas presentes nas células irão se ligar (Schwarzbauer e DeSimone 2011; Mouw et al. 2014). De forma geral, a fibronectina é importante na cicatrização (Kilian et al. 2008), na fagocitose (Kraft et al. 2015), fibrilogênese, desenvolvimento embrionário, na adesão, na migração e diferenciação celular (Schwarzbauer e DeSimone 2011).

A fibronectina é o maior componente estrutural do timo e, é mais encontrada na medula e nos septos do órgão. Nesse sentido, o timo apresenta uma região corticomedular rico em fibronectina. Ela encontra-se adjacente às células epiteliais, e sua expressão seletiva na

medula sugere um significado funcional na organização cortical/medular (Berrih et al. 1985). Duas isoformas diferentes de fibronectina são encontradas: a reconhecida pelo receptor CD49e/CD29 (também conhecido como VLA-5 ou  $\alpha 5\beta 1$ , que se liga ao motivo de ligação RGD) e está distribuída por todo parênquima tímico, e uma reconhecida pelo CD49d/CD29 (também conhecido como VLA-4 ou  $\alpha 4\beta 1$ , que reconhece o motivo de ligação CS1, definida como região variável na **Figura 5**) (Crisa et al. 1996; Savino et al. 2002). A redução da densidade dos receptores para fibronectina está relacionada com a diminuição da adesão dos tímócito (Savino et al. 2002).

As respostas adesivas e migratórias em fibronectina podem ser reguladas por diversos mecanismos como a modulação das integrinas, que são responsáveis pela estabilização da adesão e da capacidade e eficiência da migração de tímócitos na dependência do seu estado de maturação, da quantidade de fibronectina presente no microambiente e de *splicings* alternativos que vão modificar os sítios de ligação (Crisa et al. 1996; Savino et al. 2002). Para se ligar à ECM, os tímócitos apresentam receptores chamados de integrinas, abordados a seguir.



**Figura 5: Molécula de fibronectina.** Um modelo simplificado da molécula de fibronectina e suas respectivas regiões de ligação a outras moléculas da ECM ou a células. Na parte superior da figura temos a montagem da molécula e as regiões que formam a molécula. Na parte inferior temos o dímero de fibronectina formado pela ligação de pontes dissulfeto entre os monômeros, mostrando a forma ativa e a forma inativa da molécula. Fonte: Modificado de Mouw et al. 2014.

### **1.3.2) AS INTEGRINAS**

O microambiente tímico além de produzir a ECM também expressa os receptores de ECM, principalmente integrinas, que são uma família de glicoproteínas heterodiméricas transmembranares presentes em quase todas as células (Barczyk et al. 2010). Essas, por sua vez, medeiam o processo de interação de timócitos com a rede de ECM e têm impacto no processo de adesão/migração e de diferenciação dessas células, visto que a expressão de integrinas varia de acordo com os estágios de maturação (Lannes-Vieira et al. 1993; Savino et al. 2004; Gameiro et al. 2010).

São reconhecidos pelo menos 24 heterodímeros de integrinas, que são formados pela combinação de 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  que interagem de forma não covalente, apresentando um domínio extracelular, um domínio transmembranar tipo I e um domínio citoplasmático que se conecta ao citoesqueleto. Além de agir como moléculas adesivas, as integrinas são importantes em outros processos celulares, como diferenciação e proliferação, e estão expressas tanto em timócitos como em TECs (revisado por (Chen et al. 2013). A expressão de componentes de ECM no timo correlacionados com a expressão dos receptores para fibronectina (VLA-4 e VLA-5) e os receptores de laminina (VLA-6 e VLA-3) estão relacionados com a diferenciação dos timócitos e células do microambiente (Cotta-de-Almeida et al. 2003).

O VLA-4, receptor do motivo de ligação CS1, da fibronectina, é expresso em quase todos os timócitos humanos, sendo maior a expressão em timócitos DN, as DP expressam um pouco menos e as células SP expressam 10% menos que as DN. Já o VLA-5, que reconhece o motivo de ligação RGD, também é expresso em boa parte dos timócitos, mas ao contrário do VLA-4, as células SP tem um aumento na expressão desse receptor (Mojcik et al. 1995).

A integrina CD49f/CD29 (VLA-6 ou  $\alpha 6\beta 1$ ) interage com a laminina, e, é necessária para sobrevivência de timócitos SP imaturos (Lannes-Vieira et al. 1993; Ocampo et al. 2008). Outra integrina que também foi descrita como capaz de interagir com a laminina foi a CD49c/CD29 (VLA-3 ou  $\alpha 3\beta 1$ ) (Mojcik et al. 1995).

As integrinas VLA-1( $\alpha 1\beta 1$ ) e VLA-2 ( $\alpha 2\beta 1$ ) são os principais receptores para os colágenos presentes no timo. No entanto, já foi descrito que o VLA-3 também pode se ligar ao colágeno (Shimizu e Shaw 1991).

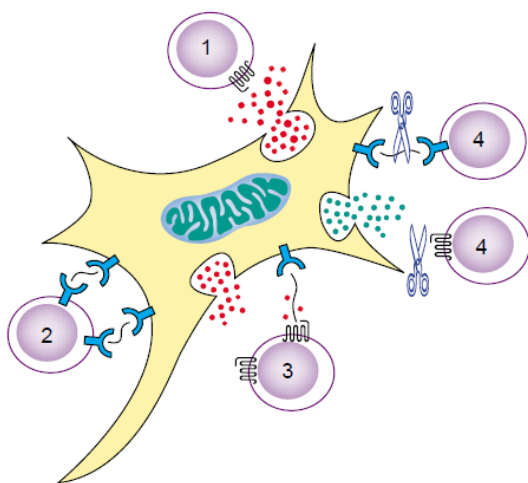
### **1.3.3) OUTRAS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS COM A ECM**

É importante destacar que a ECM não atua sozinha, visto que tem sido relatado que ela pode se associar diretamente com as quimiocinas, como por exemplo, a ligação de CXCL12



com a fibronectina que resulta em maior maturação dos timócitos do que quando observadas separadamente (Gameiro et al. 2010). Além da CXCL12, a migração induzida por CCL19 mais fibronectina é maior do que quando essas moléculas agem sozinhas. Essas interações também parecem aumentar a adesão do timócito à ECM (Savino et al. 2004).

Destaque-se ainda a presença intratímica de uma classe de moléculas reguladoras da expressão de ECM, as metaloproteinases de matriz (MMPs). Elas compõem uma família de enzimas capazes de degradar a ECM, como as collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18), as gelatinases (MMP-2 e -9) e as estromelinas (MMP-3, -10 e -11), que degradam fibronectina, laminina e proteoglicanos, e também as matrilisinas (MMP-7 e -26), que degradam as moléculas de adesão das células e outras MMPs associadas à membrana (Gameiro et al. 2010). Um exemplo de MMPs associadas à membrana são as desintegrinas e metaloproteinases (ADAMs), uma família de glicoproteínas de membrana e secretadas que tem duas funções: a de adesão e a de degradação da ECM e acredita-se que estejam relacionadas com o desenvolvimento de células T (Seals and Courtneidge 2003; Manilay et al. 2005). A presença dessas enzimas no timo contribui para um processo de migração do timócito altamente regulado (Savino et al. 2004), e a inibição das metaloproteinases leva a uma inibição da maturação dos timócitos em etapas iniciais do desenvolvimento tímico, quando eles ainda são células DN (Guérin et al. 1997). Um resumo das interações que ocorrem entre os timócitos e as células do microambiente está representado pela **Figura 6**.



**Figura 6: Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer durante a diferenciação dos timócitos.** Em (1), a interação com o receptor de quimiocina-quimiocina entre um timócito e uma TEC. Em (2) temos a interação entre ECM mediada por integrina. Uma molécula de ECM pode se ligar a uma quimiocina e a um timócito (3) e em (4) temos as tesouras como as metaloproteinases modificando as interações 2 e 1. **Fonte:** Savino et al. 2002.

## 1.4) AS CÉLULAS T REGULADORAS

O sistema imune sadio deve manter o balanço entre a capacidade de responder a agentes infecciosos e de sustentar a autotolerância. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos de uma resposta descontrolada. Dessa forma, o sistema imune tem que ser capaz de deter antígenos estranhos, finalizar a resposta imune após a resolução e montar mecanismos de controle da autorreatividade de células que escaparam da seleção negativa. Para a manutenção da homeostasia e da tolerância periférica um grupo de células é essencial, as células Treg, que são linfócitos T produzidos no timo normal como uma subpopulação funcionalmente distinta de células T ou produzidas na periferia dependendo dos estímulos que elas sofrem.

### 1.4.1) HISTÓRICO

As primeiras descrições de células especializadas na regulação da resposta imune ocorreram na década de 70. Naquela época, foi descrito que a depleção de determinadas células T em animais normais poderia causar doenças autoimunes, e que a reconstituição destas células, prevenia e era capaz de suprimir o desenvolvimento dessas doenças (Gershon e Kondo 1970). Avançando para a década de 90, foi observado que uma pequena população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tinha uma ação supressora e conseguia, de alguma forma, inibir as respostas de células T CD4 e T CD8 em enxertos (Hall et al. 1990). Ainda nessa década, Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi et al. 1995) caracterizaram uma subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressava a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25) e demonstraram através de ensaios de transferência celular que essas células eram responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças autoimunes.

Em humanos, as Tregs representam de 5% a 10% do total de linfócitos T CD4 no sangue periférico (Baecher-Allan et al. 2001); já nos órgãos linfoides periféricos de camundongos, essas células constituem 10% dos linfócitos T CD4 e 1% dos linfócitos T CD8 (Holm et al. 2004; Ohkura e Sakaguchi 2010).

Em 2001 foi identificado, em modelo murino, o fator de transcrição Foxp3 (do inglês “Forkhead box P3”), um novo membro da família “forkhead/winged-helix” de fatores de transcrição e altamente conservado em humanos (Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001). Do ponto de vista molecular, esse fator de transcrição é um marcador preferencialmente expresso em células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tímicas e periféricas, distinguindo-as das células T CD4<sup>+</sup> efetoras. Foi demonstrado que células T naive transfectadas com o mRNA *Foxp3* adquirem

características de células supressoras passando a produzir citocinas e outras moléculas relacionadas às Treg. Sendo assim, o *Foxp3* é definido como o regulador principal para a diferenciação de células Treg, um fator central para o desenvolvimento intratímico e para função de células Treg (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003).

Nesse contexto, pacientes com mutação no gene *Foxp3* apresentam a síndrome IPEX (do inglês, “Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome”), caracterizada por eventos de imunodesregulação com geração de clones de linfócitos T autorreativos que agridem múltiplos órgãos (Chatila et al. 2000; Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001; Levings et al. 2002). Camundongos com mutação ou inativação gênica de *Foxp3* (camundongos *scurfy*) desenvolvem uma síndrome autoimune letal, que causa uma proliferação descontrolada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e acometimento de múltiplos órgãos (Clark et al. 1999; Brunkow et al. 2001). Desse modo, *Foxp3* é um regulador crítico para o desenvolvimento e a função de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Fontenot et al. 2005b; Curotto de Lafaille and Lafaille 2009; Ohkura and Sakaguchi 2010).

#### **1.4.2) MARCADORES DE CÉLULAS TREG**

Conforme descrito acima, as células Treg expressam altas concentrações de CD25 em sua superfície e o fator de transcrição *Foxp3*, sendo assim definidas fenotipicamente como células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *Foxp3*<sup>+</sup>. No entanto, outros marcadores são encontrados nessa célula. A cadeia β (CD122) e a cadeia γ (CD132) do IL-2R, ajudam a formar o receptor juntamente com a cadeia α, formando então um complexo de alta afinidade para IL-2, que é essencial para a maturação das células Treg (Thornton e Shevach 1998; Thornton et al. 2004). Ainda, a presença de CTLA-4 e GITR e a baixa expressão de CD127, embora não sejam marcadores exclusivos de Treg, são utilizados como marcadores para caracterização fenotípica dessas células (Mazzucchelli e Durum 2007; Schmetterer et al. 2012)

Diversas outras moléculas têm sido frequentemente adicionadas às listas de marcadores de células Treg (Tabela 1) e têm papel funcional na atividade supressora exercida por essas células.

**Tabela 1: Moléculas identificadas como marcadores de células Treg murina.**

<b>Molécula</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
<b>CD25</b>	Cadeia $\alpha$ do receptor de IL-2; ativa a via de sinalização que vai culminar com ativação se STAT5 importante para manutenção e desenvolvimento de células Treg	(Sakaguchi et al. 1995)
<b>CD122</b>	Cadeia $\beta$ do receptor de IL-2; forma o complexo do receptor de alta afinidade para o IL-2	(Thornton et al., 2004)
<b>CD132</b>	Cadeia $\gamma$ do receptor de IL-2; forma o complexo do receptor de alta afinidade para o IL-2	(Thornton et al. 2004)
<b>Foxp3</b>	Fator de transcrição importante no desenvolvimento de células Treg e função supressora; reprime a transcrição de genes envolvidos na diferenciação de Th1 e Th2	(Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Lin et al. 2007)
<b>Helios</b>	Fator de transcrição da família Ikaros; se liga ao promotor de Foxp3 mantendo assim a expressão de Foxp3 aumentando a atividade supressora de Treg	(Sugimoto et al. 2006; Thornton et al. 2010; Getnet et al. 2011)
<b>GITR</b>	Receptor de TNF induzido por glicocorticóides; regula negativamente a função de Treg, anulando a supressão de Treg; importante na geração de tTreg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28	(Shimizu et al. 2002; Kanamaru et al. 2004; Mahmud et al. 2014)
<b>Neuropilina 1 (Nrp1)</b>	Altamente e constantemente expressa em tTregs; a neutralização dessa molécula leva a anulação da supressão.	(Bruder et al. 2004; Gray et al. 2005)
<b>DR3</b>	Receptor da família do TNF; promove sobrevivência e expansão de Treg por estimular PI3K/Akt.	(Croft 2015)
<b>CTLA-4</b>	Se liga a CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos impedindo que células T efectoras se liguem	(Takahashi et al. 2000; Zheng et al. 2006)
<b>CD127</b>	Cadeia $\alpha$ do receptor de IL-7, não é expresso em Treg e por isso serve com um marcador excludente de células Treg	(Liu 2006; Mazzucchelli e Durum, 2007)
<b>CD62L</b>	L-Selectina; permite a entrada de células em órgãos linfoides periféricos, sua ausência funciona como marcador de células ativadas; determina uma subpopulação com grande capacidade reguladora	(Salomon et al. 2000)
<b>CD103</b>	Acumulação de Treg em áreas do corpo como derme, linfonodo e pulmões em situação de inflamação; principal ligante de E-caderina	(Suffia et al. 2005)
<b>CCR6/CCR4/CXCR3/CCR9</b>	CCR6 é um marcador de célula Treg de memória; promovem agregação de conjuntos de tTreg em tecidos não linfoides; auxiliam na resposta rápida nesses tecidos	(Kleinewietfeld et al. 2005; Sather et al. 2007; Guo et al, 2008; Yamazaki et al, 2008)
<b>PD-1/CD279</b>	Expresso em tTreg não ativadas, diferenciando então Treg ativadas de não ativadas; influencia a tolerogenicidade de DCs	(Raimondi et al. 2006; Francisco et al. 2011)
<b>CD39</b>	Marcador de superfície com alta correlação com Foxp3; funciona como uma ectoATPase de membrana, levando à atividade supressora pela produção de adenosina.	(Borsellino et al. 2007; Deaglio et al. 2007)
<b>CD44</b>	Marcador de um subgrupo distinto tem alta relação com Foxp3; está correlacionado com a produção de IL-10; sua ausência está relacionado com um fenótipo menos supressor de Treg; sua presença está relacionada com um alto potencial supressor	(Liu et al. 2009)

<b>CD73</b>	Funciona como uma ectoATPase de membrana, levando à atividade supressora pela produção de adenosina do mesmo modo que o CD39	(Deaglio et al. 2007)
<b>OX40L (CD134)</b>	Receptor de TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28; controlador da atividade supressora na periferia através da ativação de fatores de transcrição de célula T efectoras (GATA-3 e T-bet)	(So et al. 2008; Mahmud et al. 2014)
<b>4-1BB (CD137)</b>	Receptor de TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; controlador da atividade supressora na periferia através da ativação de fatores de transcrição de célula T efectoras (GATA-3 e T-bet)	(So et al. 2008)
<b>TNFR2</b>	Receptor de TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; controlador da atividade supressora; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28	(Mahmud et al. 2014)

### 1.4.3) SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS TREG

As populações de células Treg são definidas em função de sua origem e desenvolvimento: 1) tTreg, Treg de origem tímica (anteriormente chamadas de nTreg, Treg de origem natural) e 2) pTreg, Treg de origem periférica (anteriormente chamada de aTreg, Treg adaptativa, e compreende também as iTreg, Tregs induzidas *in vitro*) (Abbas et al. 2013).

As células tTreg são geradas no timo e escapam da seleção negativa durante a maturação de linfócitos. Têm a expressão de Foxp3 como principal regulador no seu desenvolvimento e na sua função supressora. Elas reconhecem peptídeos próprios com alta afinidade ao interagir com o complexo MHC-peptídeo e com a ajuda do sinal co-estimulatório de moléculas B7 e outras citocinas, como IL-2, IL-7 e IL-15, são então selecionadas (Salomon et al. 2000; Josefowicz et al. 2012). A estimulação via TCR com o auxílio da coestimulação via CD28 são fundamentais para iniciação do programa de diferenciação de Treg. O CD28 apresenta um papel intrínseco na indução do gene *Foxp3*, assim como dos genes *Gitr* e *Ctla*. O estímulo TCR-CD28 induz diversas vias de sinalização, como por exemplo, a ativação da família de fatores de transcrição de NFκB, onde o c-Rel é apontado como o principal fator no desenvolvimento de células Treg (Richards et al. 2015). Além dessas moléculas, o TGF-β também tem papel no desenvolvimento e manutenção dessas células (revisado em (Jurberg et al. 2015). Apesar disso, animais nocautes para TGF-β ou para IL-2 continuaram a ter células tTreg, o que sugere que essas moléculas sejam importantes na função efetora da célula, mas que não sejam imprescindíveis na sua geração (Furtado et al. 2002; Piccirillo et al. 2002). No entanto, um estudo em 2010 demonstrou uma diminuição na produção de tTreg em camundongos recém-nascidos causada por uma diminuição da seleção negativa na ausência

do receptor de TGF- $\beta$  nos timócitos, e ainda confirmaram que a sinalização de TGF- $\beta$  é crucial para inibição da apoptose dependente da molécula Bim em timócitos autorreativos (Ouyang et al. 2010). É importante salientar que as células tTreg humanas podem ser divididas em subpopulações funcionalmente e fenotipicamente distintas, com base em alterações na expressão de Foxp3, do fenótipo de moléculas da superfície celular, no grau de metilação do DNA no gene Foxp3, com a proliferação e o estado fisiológico em que a célula se encontra, dentre outros fatores. Nesse contexto, podemos destacar a sugestão de subdivisão funcional de células Treg baseadas na expressão de Foxp3 e de CD45RA: as células Treg de repouso, definidas como CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>lo</sup>Treg, células Treg ativadas CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>hi</sup>, e células não-Treg secretoras de citocinas CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>lo</sup> (Miyara et al. 2009).

As células pTreg, são induzidas a expressar o Foxp3 somente na periferia (Lin et al. 2007; Curotto de Lafaille and Lafaille 2009; Thornton et al. 2010). A indução de células pTreg baseia-se na regulação positiva de Smad3-dependente de Foxp3 desencadeada pela ativação do TCR e pela sinalização de TGF- $\beta$ , e facilitada pelo ácido retinóico que aumenta a acessibilidade de pSmad3 às sequências de regulação do promotor de *Foxp3* (Xu et al. 2010). A ausência dessas moléculas, assim como de IL-2, impede a indução de Foxp3 e consequentemente a capacidade supressora da célula Treg (Zheng et al. 2007; Lu et al. 2010). Além dessas, parece que a presença de TNF inibe a produção de iTreg, pois inibe seletivamente a via de sinalização TGF- $\beta$ -Smad3 através da regulação do receptor TNFR2 (Zhang et al. 2013).

A dificuldade de encontrar um marcador específico para diferenciar tTreg de pTreg é bastante importante. Alguns estudos sugerem que o fator de transcrição Helios, pertencente à família Ikaros, está presente em células Treg sendo um potencial marcador para distinguir tTreg e pTreg, pois somente as células tTreg apresentariam esse fator (Thornton et al. 2010; Getnet et al. 2011). No entanto, outras pesquisas constestaram essa hipótese. Foi descrito que Helios poderia ser induzido em células T CD4 com TCR transgênico sob estímulo e presença de IL-2 e TGF- $\beta$  (Verhagen e Wraith 2010), além de Helios poder ser induzido durante a ativação e proliferação de células T, mas regredindo sob condições de repouso, não somente em Treg humanas e murinas, mas também em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Akimova et al. 2011). Estes dados sugerem então que, dependendo do método de ativação e condições específicas, pode-se verificar a expressão de Helios em células pTreg. É importante salientar, entretanto, que esses achados não estão bem explorados em populações de células T CD4 com TCR não-transgênico (Zabransky et al. 2012). Foi observado também que Helios regula a

produção de IL-2 em células Treg silenciando a transcrição do gene *Il2*, mantendo então a ação supressora da Treg (Baine et al. 2013). Além disso, Helios pode ser definido como um marcador funcional de Treg, visto que todas as células *Foxp3*<sup>+</sup>*Helios*<sup>+</sup>, de humanos e camundongos, têm regiões TSDR do gene *Foxp3* altamente demetilados (Muto et al. 2015). E achados recentes, sugerem que Helios também age aumentando a função de iTreg em cooperação com o *Foxp3* (Takatori et al. 2015). Ambas subpopulações expressam marcadores como CD25, *Foxp3*, GITR e CTLA-4, mas as tTreg exibem altos níveis de expressão de PD-1 (do inglês, “programmed cell death-1”), Nrp1 (neuropilina 1), Helios e CD73 comparados com as pTreg (Yadav et al. 2012).

As células Treg têm uma alta plasticidade, por exemplo, a IL-6 pode converter tTreg em células Th17, principalmente em locais inflamatórios, como no caso de uma artrite autoimune (Komatsu et al. 2014). No entanto, as células pTreg induzidas por IL-2 e TGF- $\beta$  são resistentes a esta última citocina mantendo a função supressora nos locais de resposta. Dessa forma, esses dados sugerem que células tTreg e pTreg podem ter papéis diferentes na resposta imune adaptativa (Horwitz et al. 2008).

#### 1.4.4) GERAÇÃO DE CÉLULAS TREG NO TIMO

As células Treg se diferenciam a partir dos precursores *CD4*<sup>+</sup>*CD25*<sup>+</sup>*Foxp3*<sup>-</sup> nos estágios de SP (Fontenot et al. 2005a), ou algumas células podem surgir no estágio DP (Nunes-Cabaço et al. 2011). Ao comparar a expressão de *Foxp3* em timócitos DP e SP, mostrou-se que os timócitos DP expressavam mais proteína *Foxp3* do que os SP (Tuovinen et al. 2008). No entanto, isso se tornou controverso através de um estudo que demonstrou que a detecção dessas células era um artefato tímico, com “doublets” de timócitos DP *Foxp3*<sup>-</sup> sendo reconhecidos como *Foxp3*<sup>+</sup> (Lee e Hsieh 2009).

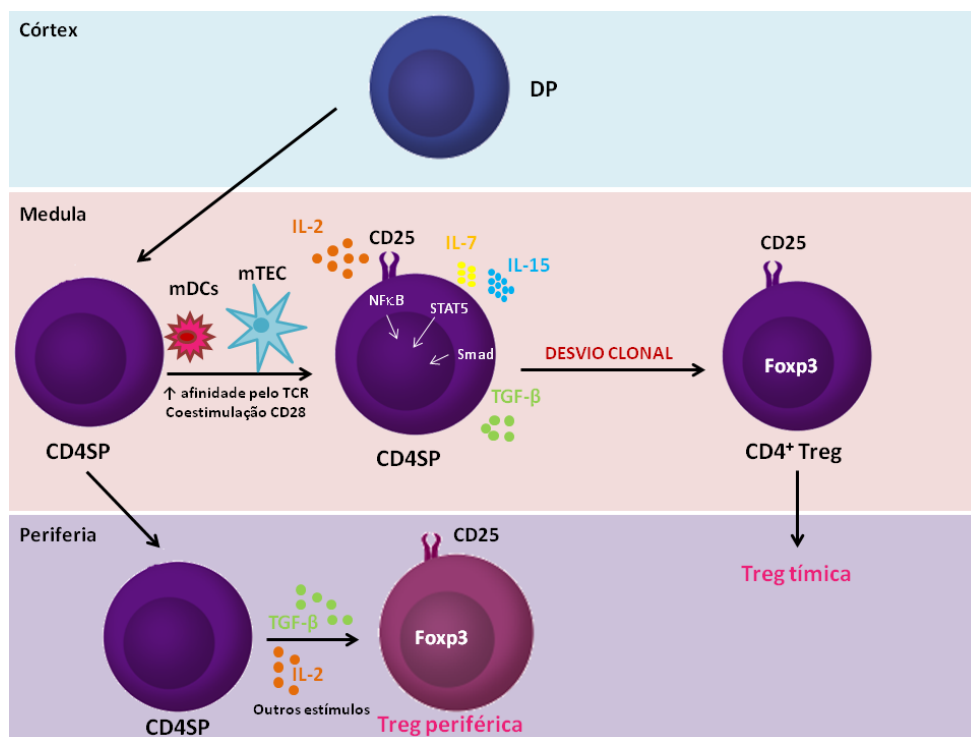
O desvio clonal (**Figura 7**) é, então, o processo responsável por produzir células Treg intratímicas. É difícil diferenciar a deleção clonal do desvio clonal porque ambas necessitam da interação do TCR com o complexo MHC-peptídeo próprio. Dessa forma, pensou-se que a diferença seria pela interação com diferentes APCs tímicas. Porém, apesar de relato inicial mostrar que mTECs seriam suficientes e DCs seriam dispensáveis na diferenciação de células Treg, outros estudos mostraram que antígenos expressos por células dendríticas estariam envolvidos nesse processo (Aschenbrenner et al. 2007; Proietto et al. 2008). Esses estudos nos mostram que os mecanismos de desvio e deleção ocorrem em uma complexa interação entre essas células. Contudo, um postulado mais consistente diz que a distinção seria exercida pela duração e força da interação com TCR e consquentes níveis de sinalização intracelular (Xing

e Hogquist 2012). Como exemplo, demonstrou-se que camundongos transgênicos que tinham a expressão de níveis mais baixos de MHC classe II em mTECs apresentavam menor eficácia na deleção clonal em paralelo a maior frequência de células Treg no timo (Hinterberger et al. 2010).

Dessa forma, além dos sinais de TCR, os sinais coestimulatórios via CD28 têm um papel essencial na indução da diferenciação de células Treg, pois a ausência de CD28 vista em camundongos deficientes levaram a uma diminuição de células Treg no timo e nos tecidos periféricos (Salomon et al. 2000; Tai et al. 2005). O CD28 parece fornecer um sinal intrínseco para o desenvolvimento das Treg possibilitando uma maior produção de IL-2, que é necessária para a sobrevivência das mesmas (Burchill et al. 2008; Liu et al. 2008). Recentemente, demonstrou-se também que, além de ser importante para a fase inicial de desenvolvimento da Treg no timo, as Tregs na periferia dependem do CD28 para os mecanismos de homeostasia (Franckaert et al. 2014) (**Figura 7**). Salienta-se ainda que, além da interação com as moléculas B7-1/B7-2, a intensidade da interação com moléculas acessórias como ICAM-1 e CD40 contribui para a geração de Treg, e a ausência delas resulta em diminuição do número de células Treg (Buhlmann et al. 2003; Sakaguchi 2005).

Como definido anteriormente (seção 1.3.3), fatores solúveis como o TGF- $\beta$  e a IL-2 também são implicados centralmente no desenvolvimento das células Treg. Particularmente, a sinalização por IL-2 parece ser essencial para a diferenciação das tTreg, visto que camundongos duplamente deficientes em IL-2 e IL-15, ou em CD122 e IL-15, apresentam depleção quase completa de células tTreg. Em níveis moleculares, a sinalização por CD122 é necessária para a translocação de STAT5 para o núcleo, o que leva à indução da expressão de Foxp3. As moléculas STAT são uma família de sete moléculas que participam da transdução de sinais após estimulação celular por citocinas, fatores de crescimento, e hormônios. Nas células Treg, as proteínas STAT5 são essenciais para a via de sinalização IL-2/IL-2R (Burchill et al. 2007; Soper et al. 2007). Estudos mostram que camundongos duplo-nocautes para STAT-5a e STAT-5b têm autoimunidade similar aos camundongos nocautes para IL-2 ou IL-2R, o que demonstra a importante contribuição das moléculas STAT5 no desenvolvimento das células Treg (Snow et al. 2003). Um estudo recente sugere que as APCs podem oferecer tanto IL-2 quanto o ligante de TCR, constituindo o nicho do timo onde são geradas as Tregs, assim como, concorrência entre as células Treg existentes e a oferta limitada de IL-2 fornece um “feedback” negativo para a nova geração de células Treg (Weist et al. 2015).





**Figura 7: Sinalização nos processos de diferenciação de células Treg.** As células CD4 SP entram em contato com células dendríticas medulares (mDCs) e células epiteliais medulares (mTECs) que expressam MHC de classe II e moléculas coestimulatórias B7-1/B7-2 e passam a expressar a cadeia alfa do receptor de IL-2, ao se ligar com alta afinidade no TCR; juntamente com a coestimulação do CD28, IL-2, IL-7, IL-15 e TGF- $\beta$ , ativam fatores de transcrição distintos como, NF $\kappa$ B, STAT5 e Smads, que vão levar essas células a sofrerem um desvio clonal para células Treg, escapando da apoptose. As células T CD4+ que chegam à periferia e entram em contato com TGF- $\beta$  e IL-2, além de outros estímulos relacionados ao tecido em que se encontra ou estímulos da inflamação, também podem se diferenciar em células Treg.

É importante ressaltar que estudos recentes demonstraram que algumas alterações epigenéticas presentes no curso do desenvolvimento das células Treg no timo são independentes de Foxp3 e, com isso, o modelo atual de desenvolvimento baseado na indução do Foxp3 deveria ser repensado. Tais estudos propõem um modelo onde o pré-estabelecimento de toda cromatina antes da indução Foxp3 e a expressão de co-fatores que interagem com Foxp3 são críticos componentes para a regulação de genes dependentes de Foxp3 (Ohkura et al. 2013; Kitagawa et al. 2015).

#### 1.4.5) MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DE TREG

A capacidade migratória das células Tregs é controlada por sinais distintos de quimiocinas e moléculas de adesão, e essa migração é dependente da ação efetora que essas moléculas terão no sítio alvo. Um dado surpreendente é que 25% de todas as células T CD4 são Treg funcionais e encontram-se na medula óssea de humanos e camundongos, sugerindo assim, que durante a homeostase, células Treg fiquem retidas na medula óssea como um

reservatório (Zou et al. 2004). Os mecanismos envolvidos no tráfego de Tregs ainda não estão completamente elucidados. No entanto, algumas moléculas são essenciais para que essas células cheguem aos órgãos periféricos.

A selectina CD62L é fundamental no tráfego de linfócitos de modo geral. Nas células Treg, essa molécula também está relacionada com a migração para os linfonodos de drenagem, sendo assim, células Treg que expressam CD62L migram mais eficientemente que as Treg que não expressam. Em suporte a essa informação, a administração de anticorpo neutralizante específico para o CD62L bloqueia a expansão de Treg nos linfonodos e resulta em rejeição de enxerto alogênico (Ochando et al. 2005).

O receptor de quimiocina CCR7, também associado de forma importante ao tráfego de linfócitos, também está implicado na migração de células Treg, visto que a perda de CCR7 bloqueia a migração dessas células para os linfonodos (Schneider et al. 2007). Nesse sentido, um estudo demonstrou que células Treg da tonsila eram capazes de migrar frente à quimiocina CCL19, sugerindo que a sinalização de via CCR7 podia facilitar a entrada dessas células para as zonas de células T dos órgãos linfoides periféricos. Além disso, observou-se que algumas células Treg trocam a expressão de CCR7 por CXCR5, facilitando sua migração para os folículos dos órgãos linfoides em resposta à quimiocina CXCL13 produzida nessa região de células B (Lim et al. 2004). Por outro lado, apesar de uma boa parte de células Treg do sangue periférico humano expressar CCR7, eles não responderam bem à quimiocina CCL19 em um ensaio *in vitro* (Iellem et al. 2001; Curiel et al. 2004).

De forma interessante, um estudo observou a expressão da integrina  $\alpha 4\beta 7$  nas células Treg do sangue de cordão umbilical, enquanto as células Treg “adultas” expressavam mais CCR4, e essa expressão alterada foi observada em indivíduos entre 1,5 e 3 anos de idade (Grindebacke et al. 2009).

Apesar de a molécula CD44 ter uma grande distribuição tecidual, ela parece estar envolvida no “*homing*” de linfócitos durante os estágios iniciais de diferenciação (Khaldoyanidi et al. 1996). Nesse contexto, as células Treg CD44<sup>hi</sup> são tidas como células ativadas e promovem a proliferação das células Tregs após sua ligação ao ácido hialurônico na ECM (Bollyky et al. 2009a).

A sinalização por S1P (esfingosina-1-fosfato), um lipídio bioativo, via seu receptor (S1P1) regula a saída de linfócitos T do timo e de órgãos linfoides periféricos (Drennan et al. 2009). Foi demonstrado que a sinalização via S1P1 afeta também as Tregs, suprimindo o desenvolvimento intratímico, a manutenção periférica e a atividade supressora dessas células

(Liu et al. 2009) e regulando a localização nuclear do fator de transcrição Foxp3 (Ishimaru et al. 2012).

#### **1.4.6) MECANISMOS DE AÇÃO DE CÉLULAS TREG**

Uma característica central das células Treg se refere à sua capacidade supressora pluripotente, modulando diferentes reações imunes. Elas são capazes de inibir mecanismos efetores de células T CD4 (Thornton e Shevach 1998; Oldenhove et al. 2003), suprimir a ativação e produção de anticorpo pelas células B (Bystry et al. 2001), prevenir a atividade citotóxica de células T CD8 (Suvas et al. 2003; Dittmer et al. 2004), limitar a atividade de células do sistema imune inato (Maloy et al. 2003), regular a ativação mediada pelas moléculas B7-1/B7-2 das APCs (Cederbom et al. 2000), agir em tumores (revisado por (Mailloux e Young 2010)). Essas funções regulatórias distintas permitem que essas células exerçam papel central na inibição de processos imunopatológicos importantes, como aqueles vistos na rejeição de transplante (revisado por (Burrell et al. 2012)), e nos processos inflamatórios associados à retocolite ulcerativa e esclerose múltipla (revisado por (Ding et al. 2012)), além de facilitar a progressão tumoral (revisado por (Mailloux e Young 2010)). Nesse contexto, a necessidade de entender o mecanismo de ação dessas células *in vivo* levou ao desenvolvimento de um modelo de estudo para análise da função das Treg *in vitro* (Takahashi et al. 1998; Thornton and Shevach 1998), que mimetiza a função dessas células *in vivo*. Nesse modelo, que analisa a capacidade inibitória de Treg sobre atividade proliferativa e funcional de células T efectoras, foram identificadas diversas moléculas e processos que contribuíam para as atividades supressoras de Treg, embora ainda não esteja bem elucidado se estes mecanismos são realmente semelhantes *in vivo* (Shevach 2009).

A molécula Foxp3 é apontada como a principal responsável por orquestrar os programas moleculares envolvidos na função de células Treg. Embora não esteja bem estabelecido como esse controle ocorre, sabe-se que Foxp3 interage com NFAT e após a ligação ao DNA ocorre a regulação da transcrição de diversos genes (Wu 2006). Além disso, os genes alvo do Foxp3 regulam positivamente os genes essenciais para a função supressora ou a repressão transcricional de citocinas presentes nas respostas inflamatórias (Yagi et al., 2004), além dos genes que regulam positivamente as células Treg como, *Il2ra* (CD25) (Sakaguchi et al. 1995), *Tnfrsf18* (GITR) (McHugh et al. 2002), *Nrp1* (Bruder et al. 2004) e *Ccr4* (Iellem et al. 2001). Estudos que bloqueiam o Foxp3, em determinados casos em que a

célula Treg não é benéfica, demonstram que o bloqueio leva a uma supressão do mecanismo efetor dessas células (Park et al. 2014).

Além do efeito regulador mediado pela secreção de citocinas supressoras IL-10 e TGF- $\beta$ , muitos estudos demonstram que essas células Treg medeiam a supressão inibindo a indução de mRNA de IL-2 (e mRNA para outras citocinas efectoras) pelas células T convencionais (Takahashi et al. 1998; Thornton e Shevach 1998; Oberle et al. 2007; Baine et al. 2013). É possível também que as células Treg consumam o IL-2, pois possuem alta densidade das cadeias que formam o conjunto do receptor de alta afinidade para essa citocina, e, assim, inibam a proliferação das células T efectoras, resultando em uma forma de apoptose dependente do fator pró-apoptótico Bim (Pandiyani et al. 2007).

Um mecanismo supressor central demonstrado é a inibição da diferenciação de células efectoras através das APCs. As células Treg expressam CTLA-4, uma molécula que participa do bloqueio funcional dos sinais de co-estimulação de células T efectoras, através da sua competição com CD28 pela ligação, em maior afinidade, com CD80 e CD86 expressos nas células dendríticas. Alguns estudos sugerem que a inibição da expressão de CD80 e CD86 por células Treg limita a capacidade das DCs de estimular células T naive através de CD28, resultando em imunossupressão (Cederbom et al. 2000; Onishi et al. 2008). Além dessa molécula, a supressão da função das DCs é a LAG-3 (CD223) que vai se ligar às moléculas de MHC de classe II com alta afinidade, inibindo então o sinal mediado por ITAMs (Liang et al. 2008). No mesmo sentido, a Nrp1 (Tabela 1), que promove longas interações entre células Treg e DCs imaturas, impossibilita a ligação de células T naive às DCs, o que resulta em vantagem para as células Treg sobre células T naive (Sarris et al. 2008). Ainda nesse contexto, CD39 é uma ectoATPase que hidrolisa ATP ou ADP em AMP e adenosina pericelular. As células T efectoras expressam em sua superfície o receptor de adenosina A2A, dessa forma, ao entrar em contato com a adenosina produzida pelas células Treg, ocorre uma modulação imunossupressora das células T efectoras (Borsellino et al. 2007; Deaglio et al. 2007).

Um mecanismo utilizado pelas células Treg para supressão é a citólise de células-alvo, onde células Treg ativadas a partir de uma combinação de anticorpos anti-CD3 e anti-CD46 expressam granzima A e matam células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em um mecanismo dependente de perforina e independente de Fas-FasL (Grossman et al. 2004).

## 1.5) A SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

Nesse tópico vamos discutir uma imunodeficiência que cursa com eventos de autoimunidade e, de forma interessante, um dos distúrbios imunológicos apresentados é a diminuição na função imunossupressora de células Treg.

A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) foi descrita pela primeira vez em 1937, pelo pediatra alemão, Dr. Alfred Wiskott, que identificou três irmãos apresentando, logo após o nascimento, diarreia sanguinolenta, número baixo de plaquetas, eczema e otites recorrentes (Wiskott 1937). Em 1954, outro médico pediatra, Dr. Robert Anderson Aldrich, constatou que essa doença era herdada como uma forma recessiva ligada ao cromossomo X (Aldrich et al. 1954). Foi nos primeiros anos da década de 90 que o gene WAS, envolvido nas manifestações clínicas dessa síndrome, foi sequenciado e clonado (Derry et al. 1994). Esse gene codifica a molécula WASP (Proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich; do inglês, “Wiskott-Aldrich Syndrome Protein”), que está envolvida na regulação da polimerização do citoesqueleto de actina nas células hematopoiéticas.

A WAS é uma imunodeficiência rara, caracterizada por microtrombocitopenia, eczema, infecções recorrentes e aumento do risco de desenvolvimento de autoimunidade e de neoplasias malignas (Sullivan et al. 1994). A incidência dessa síndrome é de 1 a 10 em um milhão de meninos (Ochs e Thrasher 2006), a taxa de mortalidade é alta, e se os pacientes não forem tratados adequadamente podem morrer na primeira década de vida (Rosen et al. 1995).

É importante ressaltar que a gravidade da doença varia pelos diferentes defeitos que as mutações podem causar na expressão da proteína WASP (Jin et al. 2004) e, particularmente, a perda parcial ou total da expressão de WASP está correlacionada com o fenótipo mais severo da doença (Imai et al. 2004). É interessante observar que mutações pontuais que prejudicam, mas não suprimem a expressão de WASP, podem causar trombocitopenia ligada ao X (XLT; do inglês, “X-linked thrombocytopenia”), uma doença que pode ser crônica (Villa et al. 1995) ou intermitente (Notarangelo et al. 2002), e é considerada uma forma atenuada de WAS, caracterizada por número baixo de plaquetas e em alguns casos imunodeficiência. Por outro lado, algumas mutações no domínio GBD podem levar a formas constitutivamente ativas da molécula, mudando completamente o espectro de imunodeficiência, como ocorre na neutropenia ligada ao X (Devriendt et al. 2001; Cotta-de-Almeida et al. 2007).

### 1.5.1) WASP EM NÍVEL MOLECULAR

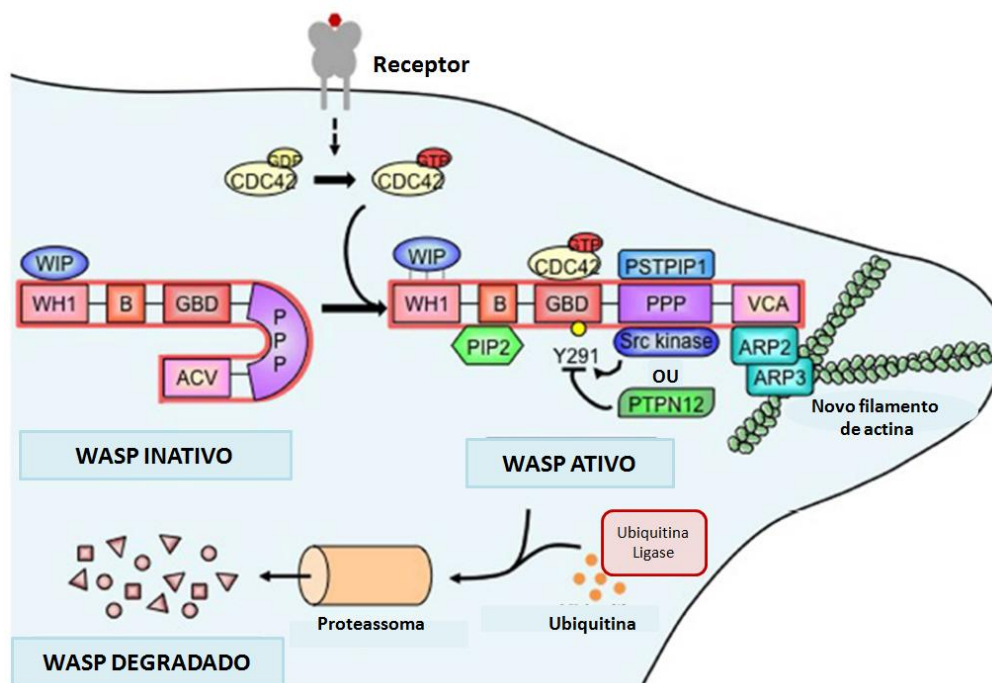
Uma das principais moléculas responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto de actina em células de origem hematopoiética é a proteína WASP. A compreensão da dinâmica desse rearranjo é essencial na biologia de células eucariotas, pois influencia diversos processos celulares como migração, adesão, polarização, endocitose e tráfego de vesículas.

A proteína WASP foi a primeira proteína identificada em uma família de proteínas envolvidas na sinalização para a polimerização do citoesqueleto de actina (Snapper e Rosen 1999). Nesta família ainda são incluídas as proteínas N-WASP e WAVE1, 2 e 3 (Miki et al. 1996, 1998).

A WASP responde a sinais que ativam a molécula Cdc42, uma GTPase da família Rho de pequenas GTPases para o início da polimerização do citoesqueleto de actina. Ela apresenta domínios multifuncionais como o EVH1 (do inglês, “N-terminal Ena/VASP homology 1), também chamado de WH1 (domínio 1 homólogo a WASP), o BR (do inglês, “basic region”), uma pequena região básica, o GBD (do inglês, “GTPase-binding domain”), um domínio de ligação interativa com Cdc42 (do inglês, “cell division cycle 42”), o PPP (do inglês, “polyproline-rich region”) uma região rica em prolina, que caracteriza sítios de ligação a moléculas contendo domínio SH3 e, ainda apresenta o VCA, um domínio C-terminal denominado a partir das sub-regiões V (do inglês, “verprolin homology”; também chamado “WASP homology 2/WH2”), C (do inglês, “cofilin homology domain” ou “central hydrofobic region”), e A (do inglês, “acidic region”) (revisado em Thrasher e Burns 2010; Cotta-de-Almeida et al. 2015) (**Figura 8**).

Essa proteína pode estar numa conformação autoinibida nas células, um estado inativo, consequência da interação da proteína WASP com a proteína WIP (do inglês, “WASP-interacting protein”), que se liga ao domínio EVH1 estabilizando WASP (de la Fuente et al. 2007), e por interações intermoleculares entre GBD e o domínio VCA (Kim et al. 2000). Quando há ativação celular, WASP é recrutada para o sítio de sinalização da membrana para a liberação da sua conformação inativa. Através da ligação de Cdc42-GTP (Cdc42 associada a guanosina trifosfato) ao domínio GBD, da ligação de proteínas adaptadoras como Nck ou CrkL com WIP, fosforilação de Y291, ligação de PIP2 ao domínio BR, ligação de Toca-1 (do inglês, “transducer of CDC42-dependent actin assembly 1”) ao domínio PPP e a Cdc42-GTP, e ligação de Nck e Grb2 ao PPP, essa molécula sai da forma inativa e o domínio VCA é liberado, tornando-se exposto. Dessa forma, torna-se possível a ligação entre o domínio V e a actina-G, enquanto os domínios C e A se ligam ao complexo

Arp2/3 (do inglês “actin related protein 2/Arp3”) para o início da nucleação e do consequente alongamento dos filamentos de actina (**Figura 8**). Por fim, a WASP fosforilada é então ubiquitinilada e degradada no proteassoma (revisado em Reicher et al. 2012; Cotta-de-Almeida et al. 2015).



**Figura 8: Estrutura e domínios de WASP.** Em seu estado inativo, WASP tem uma conformação autoinibida através de uma interação intramolecular entre o domínio de homologia VCA e do domínio GBD. A associação de WIP (WASP Interacting Protein) com o domínio WH1 estabiliza a configuração inibida, embora não seja claro se WIP permanece ligado após a ativação de WASP. A pequena GTPase Cdc42 é a principal molécula ativadora de WASP, ligando-se ao domínio GBD e causando a liberação do domínio VCA. A fosforilação do resíduo de tirosina 291 (Y291) pode tanto ativar WASP sozinho ou estabilizar uma conformação ativa iniciada por outros fatores. Na conformação ativa de WASP, o complexo Arp2/3 se liga ao domínio VCA e começa a polimerização de actina. A remodelação da actina é dinâmica e depende de um equilíbrio entre a ativação de WASP e sua degradação, sendo este último regulado pela ubiquitinação e mediado pelo proteassoma. **Fonte:** Cotta-de-Almeida et al. 2015.

No contexto de que esses mecanismos são importantes para fisiologia do sistema imune, descreveremos a seguir a influência funcional de WASP nas diferentes células do sistema imune, em particular, nas subpopulações de linfócitos T.

### 1.5.2) A WASP E AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

A resposta imune é dependente da perfeita função de todas as células do sistema imune. E, as células do sistema imune inato e adaptativo necessitam da dinâmica do citoesqueleto de actina para seguir com suas funções. Os estudos nessas células e sua correlação com a proteína WASP demonstraram disfunções importantes em células T e B, deficiência na quimiotaxia de monócitos, alterações em células dendríticas, entre outras. Particularmente, as análises de linfócitos T de pacientes com WAS revelaram anormalidades

na sinalização pelo TCR associados a defeitos na organização do citoesqueleto de actina (Molina et al. 1993). De maneira geral, as diferentes células de origem hematopoiética são afetadas pela ausência da expressão de WASP, indicando que os principais processos fisiológicos presentes na geração da resposta imune, com participação dessas células, envolvam o rearranjo do citoesqueleto de actina (Imai et al. 2003) (Tabela 2).

De fato, os linfócitos T são muito afetados pela ausência de WASP. Os linfócitos T dos pacientes e camundongos deficientes em Wasp são morfologicamente anormais, a superfície dessas células apresenta projeções incomuns, e há escassez no número e na estrutura de microvilosidades em sua superfície (Kenney et al. 1986; Gallego et al. 1997), além de apresentarem defeitos na transdução de sinais no início da ativação pelo TCR (Kenney et al. 1986; Molina et al. 1992), resultando em um defeito na proliferação e na produção reduzida de IL-2 (Molina et al. 1993). Foi observado que, os pacientes com WAS ainda apresentam uma diminuição no número de células T, devido ao desenvolvimento anormal no timo (Park et al. 2004). Isso ocorre devido a defeitos na saída do timo para órgãos linfoides periféricos, e também pelo aumento do número dessas células em apoptose (Rengan et al. 2000).

Uma migração celular eficiente depende de interações envolvendo integrinas, e a perda de WASP gera alterações na migração. Os filamentos de actina e moléculas de integrina estão fisicamente conectados através de proteínas adaptadoras (Puklin-Faucher and Sheetz 2009), logo, embora isso não esteja claro, problemas no remodelamento de actina, provavelmente, prejudicam a função das integrinas. Por exemplo, a família de integrinas  $\beta 2$ , encontradas em células mieloides, apresenta falhas no seu agrupamento na ausência de WASP (Burns et al. 2004).

Eventos de imunodesregulação e autoimunidade podem estar associados diretamente a um efeito da ausência de Wasp em células Treg. Essas células estão implicadas em distúrbios de regulação da resposta imune em pacientes e camundongos deficientes em Wasp (Humblet-baron et al. 2007a; Maillard et al. 2007; Marangoni et al. 2007). Dessa forma, como tópico central na discussão deste trabalho, a seção a seguir discorrerá sobre o impacto da deficiência de Wasp em células Treg.



**Tabela 2: Efeitos da ausência ou deficiência de Wasp em células do sistema imune**

Tipo celular/funções	Referências
<p><b><u>Linfócitos T CD4<sup>+</sup>:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <b>Naives</b> ↑ motilidade de células TCD4 induzidas por APC devido à diminuição do tempo de acoplamento, mas é uma motilidade restrita; Quimiotaxia anormal na presença de diversos quimioatrativos.</li> <li>❖ <b>Th1</b> ↓ transcrição de Th1 devido ao defeito na indução de mRNA T-bet; ↓ recrutamento de NFAT-1; Mecanismo de patogênese ligado a uma forma aberrante de metilação de histona no gene TBX21 promotor da imunidade desregulada; ↓ Produção de IL-2, Ifibronectina-γ e TNF.</li> <li>❖ <b>Th2</b> Não produz IL-4; Resposta não balanceada em pacientes; Produção exacerbada de citocinas que levam a colite, eczema, entre outros.</li> <li>❖ <b>Treg</b> Supressão da ativação in vitro de tTreg; Defeito na capacidade reguladora.</li> </ul>	<p>(Snapper et al. 2005; Gallego et al. 2006; Trifari et al. 2006; Maillard et al. 2007; Marangoni et al. 2007; Nguyen et al. 2007; Morales-Tirado et al. 2010; Lafouresse et al. 2012)</p>
<p><b><u>Linfócito T CD8<sup>+</sup>:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <b>Naives</b> Deficiência na ativação devido à redução no recrutamento de NFAT-1 e NFAT-2.</li> <li>❖ <b>CTLs</b> ↓ da atividade lítica; Conteúdos de perforinas não são polarizados em direção ao centro da sinapse imunológica; Deficiência na proliferação após exposição dos antígenos</li> </ul>	<p>(Dupre et al. 2002; Strom et al. 2003; Trifari et al. 2006; De Meester et al. 2010)</p>
<p><b><u>Linfócito T Natural Killer:</u></b></p> <p>↓ no número de células no fígado e baço; ↓ expressão de integrinas na superfície das células da periferia; ↓ da proliferação induzida por antígeno; ↓ produção de citocinas.</p>	<p>(Astrakhan et al. 2009; Locci et al. 2009)</p>
<p><b><u>Linfócito B:</u></b></p> <p>Resposta proliferativa normal; Superfície de IgD não pareada; Perda de receptores do complemento; Deficiência no centro pós germinal de células B; Periferia deficiente de células B; ↓ de células B na zona marginal no baço levando a uma deficiência na produção de anticorpo; Homeostasia de B comprometida; Disgamaglobulinemia; Respostas deficientes a antígenos T-independentes</p>	<p>(Ochs et al. 1980; Sullivan et al. 1994; Zhang et al. 1999; Park et al. 2005; Westerberg et al. 2005; Meyer-Bahlburg et al. 2008)</p>
<p><b><u>Célula Dendrítica:</u></b></p> <p>Defeito na fagocitose devido à migração afetada; Anormalidade na adesão celular e formação de podossomos; Não ativa células NK eficientemente. Deficiência na apresentação antigênica</p>	<p>(Binks et al. 1998; Burns et al. 2004; Catucci et al. 2013)</p>
<p><b><u>Monócitos:</u></b></p> <p>Migração anormal em resposta a fMLP, MCP-1 e MIP1-α; Defeito quimiotático juntamente com a diminuição dos podossomos.</p>	<p>(Ishihara et al. 2012)</p>
<p><b><u>Macrófago:</u></b></p> <p>Motilidade direcional inexistente; Não apresenta podossomo nem polarização em resposta ao fMLP; ↓ da migração frente ao CCL19; Deficiência na apresentação antigênica</p>	<p>(Zicha et al. 1998; Snapper et al. 2005; Dovas et al. 2009; Ishihara et al. 2012; Park et al. 2014)</p>
<p><b><u>Neutrófilo:</u></b></p> <p>↓ da capacidade migratória frente ao quimioatrativo fMLP; ↓ acumulação de neutrófilos em órgãos alvos de inflamação; Defeito na adesão; ↓ da área de contato focal; Fagocitose não pareada.</p>	<p>(Zhang et al. 1999, 2006; Snapper et al. 2005)</p>
<p><b><u>Célula Natural Killer:</u></b></p> <p>Não são ativadas eficientemente pelas células dendríticas; Pouca habilidade para a produção de F-actina e consequentemente não forma sinapse imunológica</p>	<p>(Orange et al. 2003; Gismondi et al. 2004; Catucci et al. 2013)</p>
<p><b><u>Mastócitos:</u></b></p> <p>↓ dos filopódios induzidos pela ligação com ligante de kit; Níveis de Ca<sup>2+</sup> são aberrantes; ↓ da degranulação dependente de IgE; Liberação de citocinas deficiente.</p>	<p>(Mani et al. 2009)</p>

### **1.5.3) A WASP E AS CÉLULAS TREG**

Uma das complicações mais importantes nos pacientes com WAS é a autoimunidade. Ela aparece nos primeiros anos de vida ocorrendo tanto nos casos graves quanto nos casos atenuados da doença (Imai et al. 2003). As células Treg tem como função a manutenção da tolerância periférica sendo necessárias para a supressão da resposta imune. Os achados de imunodeficiência em concomitância com os eventos de autoimunidade levam à hipótese de que as células Treg tem um papel fundamental na WAS (Adriani et al. 2007). A partir disso, inúmeros estudos demonstraram defeitos funcionais em células Treg de camundongos deficientes em Wasp e em pacientes com WAS (Adriani et al. 2007; Humblet-Baron et al. 2007b; Maillard et al. 2007; Marangoni et al. 2007).

As células Treg deficientes em Wasp apresentam baixos níveis na expressão de marcadores de ativação com o CD25, no entanto, sua capacidade supressora pode ser parcialmente recomposta administrando IL-2 exógena in vitro. Relacionado a isso, as células T efectoras deficientes em Wasp secretam pouca IL-2, aumentando a disfunção intrínseca das células Treg (Humblet-Baron et al. 2007b). Somando-se a esses fatos, a ausência de Wasp implica em distúrbios de localização tecidual e da capacidade funcional dessas células. As células Treg nocautes para Wasp apresentam reduzida capacidade de expansão periférica, diminuição na atividade supressora sobre as células T efectoras, deficiência na secreção da citocinas como IL-10 e são incapazes de mediar a tolerância in vivo (Adriani et al. 2007; Humblet-Baron et al. 2007b; Maillard et al. 2007; Marangoni et al. 2007). Foi observada deficiência no número e na função imunossupressora de células Treg na periferia dos camundongos WKO, achado esse corroborado por resultados similares em pacientes com WAS (Marangoni et al. 2007). Ainda, um dado relevante foi a demonstração da diminuição significativa de células Treg no timo de camundongos WKO (Maillard et al. 2007).

A doença em camundongos e em humanos gera características muito semelhantes nas células imunes, como, por exemplo, os defeitos migratórios, a formação prejudicada de podossomos, a sinalização defeituosa pelas células T e B, a geração de respostas imunes ineficientes que levam ao desenvolvimento de autoimunidade (Snapper et al. 1998; Westerberg et al. 2005). Os camundongos costumam desenvolver doença inflamatória intestinal limitada ao cólon (colite), sugerindo que um defeito numérico ou funcional de células Treg possa estar associado a essa patologia (Snapper et al. 1998; Klein et al. 2003).

Além dos efeitos nas células Treg, outras alterações na função imune podem contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, como por exemplo, a possibilidade de defeitos na fagocitose de células apoptóticas e a produção de autoanticorpos devido à disfunção das células B. Além disso, as células Treg Wasp<sup>-/-</sup> também apresentaram pouca habilidade em induzir apoptose em células B, por consequência de uma significativa redução na secreção de granzima B, visto em camundongos e pacientes deficientes em Wasp (Adriani et al. 2011). Um defeito relacionado a célula B, se dá pela deficiência em eliminar células B autorreativas (Becker-Herman et al. 2011; Recher et al. 2012).

Com todos esses achados, os defeitos na homeostasia das células Treg e na sua função podem estar relacionados com o aparecimento de autoimunidade na deficiência em Wasp revelando um papel importante de Wasp na manutenção da autotolerância e consequentemente, nas atividades das células Treg.

## **2. JUSTIFICATIVA/RACIONAL**

Pouco se sabe sobre a interação da célula T em desenvolvimento com a ECM no microambiente tímico e, particularmente, células tTreg não têm sido abordadas quanto à sua relação com a ECM tímica. Dessa forma, decidimos investigar se a fibronectina é um importante mediador das interações entre as células tTreg e o microambiente do órgão, levando aos diferentes sinais celulares durante o processo de maturação dessas células. Além disso, analisaremos o possível envolvimento de ligantes e receptores da fibronectina na deficiência numérica e funcional de células tTreg encontrada em camundongos WKO; o motivo que leva a essa diminuição e como ela ocorre. Com esse estudo, esperamos gerar novos conhecimentos sobre os mecanismos intervenientes na maturação intratímica de células Treg e, assim, contribuir para um melhor entendimento da imunodesregulação associada à deficiência em WASP.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo central é estudar os mecanismos que envolvem ao papel da fibronectina na maturação intratímica de tTreg, e compreender as desregulações associadas com a deficiência em Wasp que levam à redução do número de células tTreg em camundongos WKO.

Objetivos específicos:

- Analisar a expressão intratímica de fibronectina e a expressão de receptores de fibronectina em células tTreg, e a consequente relação intratecidual de células tTreg com a fibronectina;
- Avaliar o papel da interação de células tTreg com a fibronectina sobre a ativação/sinalização e os processos celulares de proliferação e morte;
- Avaliar a adesão das células tTreg em fibronectina e a expressão de receptores de fibronectina nessas células após o ensaio de adesão;
- Avaliar a polimerização de actina e as projeções membranares dependentes de rearranjo de citoesqueleto de actina de células tTreg e T CD4 SP como efeito da adesão à fibronectina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1) Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente deficientes em Wasp (129S6/SvEvTac-Was<tm1Sbs> ou BALB/c-Was\_tm1Sbs; denominados WKO) e camundongos normais como controles isogênicos da linhagem (129S6/SvEvTac ou BALB/c; denominados WT – do inglês “wild type”). Em cada experimento foram utilizados de 1 a 3 animais controles e WKO, machos e fêmeas, 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 Ética de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA) licenciado pelo número LW-30/12. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### 4.2) Anticorpos e moléculas

**Tabela 3: Anticorpos e moléculas utilizados durante o trabalho**

Anticorpos e moléculas	Fabricante	Número de catálogo
Anticorpo anti-CD4 conjugado ao PerCP-Cy5.5	eBioscience	45004282
Anticorpo anti-CD4 conjugado ao PE-Cy7	eBioscience	25004182
Anticorpo anti-CD4 conjugado ao APC-Cy7	BD Biosciences	552051
Anticorpo anti-CD8 conjugado ao APC	Caltag	RM252502
Anticorpo anti-CD8 conjugado ao APC-eFluor® 780	eBioscience	470081
Anticorpo anti-CD3 conjugado ao FITC	BD Biosciences	555274
Anticorpo anti-CD3 purificado	BD Biosciences	550275
Anticorpo anti-CD25 conjugado ao PE	BD Biosciences	553866
Anticorpo anti-CD25 conjugado ao APC	BD Biosciences	557192
Anticorpo anti-CD69 conjugado ao FITC	BD Biosciences	01504D
Anticorpo anti-Foxp3 conjugado ao PE-Cy7	eBioscience	2557382
Anticorpo anti-Foxp3 purificado	Cell Signaling e eBioscience	D6O8R e 14577382
Anticorpo anti-CD49d conjugado ao PE	BD Biosciences	557420
Anticorpo anti-CD49e conjugado ao FITC	Southern	169502
Anticorpo anti-CD49e conjugado ao PE	BD Biosciences	557447
Anticorpo anti-CD49f conjugado ao FITC	BD Biosciences	555739
Anticorpo anti-CD49f conjugado ao PE	BD Biosciences	555735
Anticorpo anti-Caspase-3-ativa conjugado ao PE	BD Biosciences	550914

<b>Anticorpo anti-Ki-67 conjugado ao FITC</b>	BD Biosciences	561165
<b>Anticorpo anti-fibronectina purificado</b>	Novotech, Abcam	24931 e ab2413
<b>Anticorpo anti-CD28 purificado</b>	eBioscience	140281
<b>Anticorpo anti-actina purificado</b>	Millipore	Mab1501
<b>Anticorpo secundário IgG cabra-anti-coelho conjugado ao AlexaFluor 488</b>	Molecular Probes	A11008
<b>Anticorpo secundário IgG cabra-anti-coelho conjugado ao AlexaFluor 546</b>	BD Biosciences	A11010
<b>Anticorpo secundário IgG cabra-anti-rato conjugado ao AlexaFluor 546</b>	Molecular Probes	A11081
<b>Anticorpo secundário IgG cabra-anti-rato conjugado ao AlexaFluor 488</b>	Molecular Probes	A11006
<b>Anticorpo anti-IgG de rato conjugado ao PE</b>	BD Biosciences	11025A
<b>Anticorpo anti-IgG de rato conjugado ao FITC</b>	BD Biosciences	553929
<b>Anticorpo anti-IgG de rato purificado</b>	BD Biosciences	553927
<b>Anticorpo anti-IgG de coelho purificado</b>	Santa Cruz	SC2027
<b>Molécula de fibronectina</b>	Sigma	F2518
<b>Interleucina 2 recombinante murina (rIL-2)</b>	R&D Systems	P04351

### 4.3) Obtenção de células

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, em seguida, foi retirado o timo de cada animal. Os órgãos foram macerados em tecido *voil* 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. A celularidade foi analisada em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro (Nikon Microscope Eclipse E400). As suspensões de células foram utilizadas para os ensaios que envolveram citometria de fluxo.

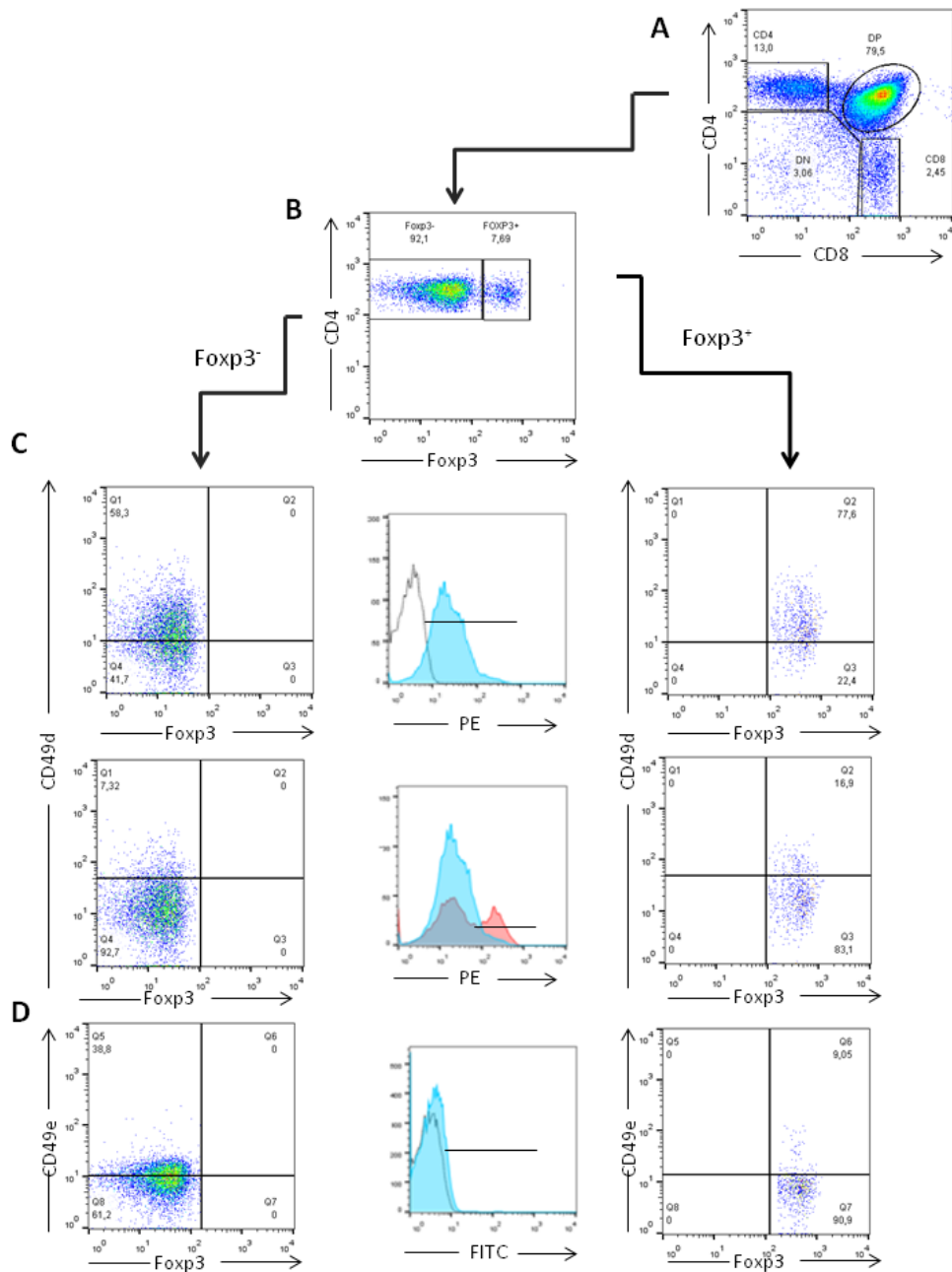
### 4.4) Fenotipagem de tTreg por citometria de fluxo

A quantidade de células distribuídas na placa foi de 1 x 10<sup>6</sup> células por poço, e foram utilizadas placas de PVC, 96 poços, de fundo em “U” (Alfa®, São Paulo, Brasil) para a marcação. 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. Foram colocados, em cada poço, 10 µL de solução contendo anticorpos contra marcadores de superfície (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD49d e anti-CD49e) diluídos em PBS (Sigma-Aldrich, 1001648456) e as células mantidas por 30 minutos a 4-8°C. Depois da incubação, as células foram lavadas com 100 µL PBS, sendo preparadas para a marcação intracelular. Para esta marcação, foi utilizada 150 µL solução fixadora e permeabilizante, contendo paraformaldeído e saponina, de acordo com as instruções do fabricante (solução Fix/Perm, eBioscience - Santa Clara, Califórnia), com incubação em geladeira por 40 minutos ou *overnight*. As células foram subsequentemente lavadas com 120 µL solução permeabilizante contendo saponina (solução Perm, eBioscience), seguida de imunomarcação com solução contendo anticorpos diluídos em solução Perm por 30 minutos. Após duas lavagens com 120 µL da solução Perm, as células foram ressuspensas em PBS, para análise no citômetro. Os citômetros de fluxo utilizados foram FacsCanto (Becton Dickenson) e FacsAria (BD Bioscience), de acordo com a disponibilidade. Para controle e compensação, foram utilizadas células sem marcação e também marcações simples, de cada fluorocromo. 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*).

As análises dos dados adquiridos foram realizadas no programa Flow Jo. Para as análises percentuais das subpopulações do timo e da fenotipagem de tTreg em relação aos receptores de fibronectina (Figura 10), utilizamos uma sequência lógica de regiões após aquisição no citômetro de fluxo. Primeiramente, delimitamos uma região de linfócitos totais, e em seguida, delimitamos o grupo de células CD4 SP, DN, DP e CD8 SP (**Figura 9A**). Dentro do grupo CD4 SP foram delimitadas as regiões de células Foxp3<sup>+</sup> e células Foxp3<sup>-</sup> (**Figura 9B**). A partir desses dois grupos, analisamos as populações CD49d<sup>hi</sup>, CD49d<sup>-/lo</sup>, CD49d<sup>+</sup>, CD49d<sup>-</sup> (**Figura 9C**), CD49e<sup>+</sup> e CD49e<sup>-</sup> (**Figura 9D**).





**Figura 9: Representação do fluxo das análises citofluorométricas.** (A) As populações T CD4 SP (CD4+CD8-simples-positiva), CD8SP (CD4-CD8+ simples-positiva), DN (CD4-CD8- duplo-negativa) e DP (CD4+CD8+ duplo-positiva) foram delimitadas em função da expressão dos marcadores CD4 *versus* CD8. (B) A população T CD4 SP foi dividida em Foxp3+ e Foxp3-. (C) As análises de CD49d (curva em azul) foram delimitadas pelo controle de isotipo de imunoglobulina (linha preta pontilhada) e a presença de subpopulação CD49dhi foi definida a partir de análise da população DN (curva em vermelho; barra indica a positividade). (D) As análises de CD49e foram delimitadas somente pelo controle de isotipo (linha preta pontilhada; barra indica a positividade).

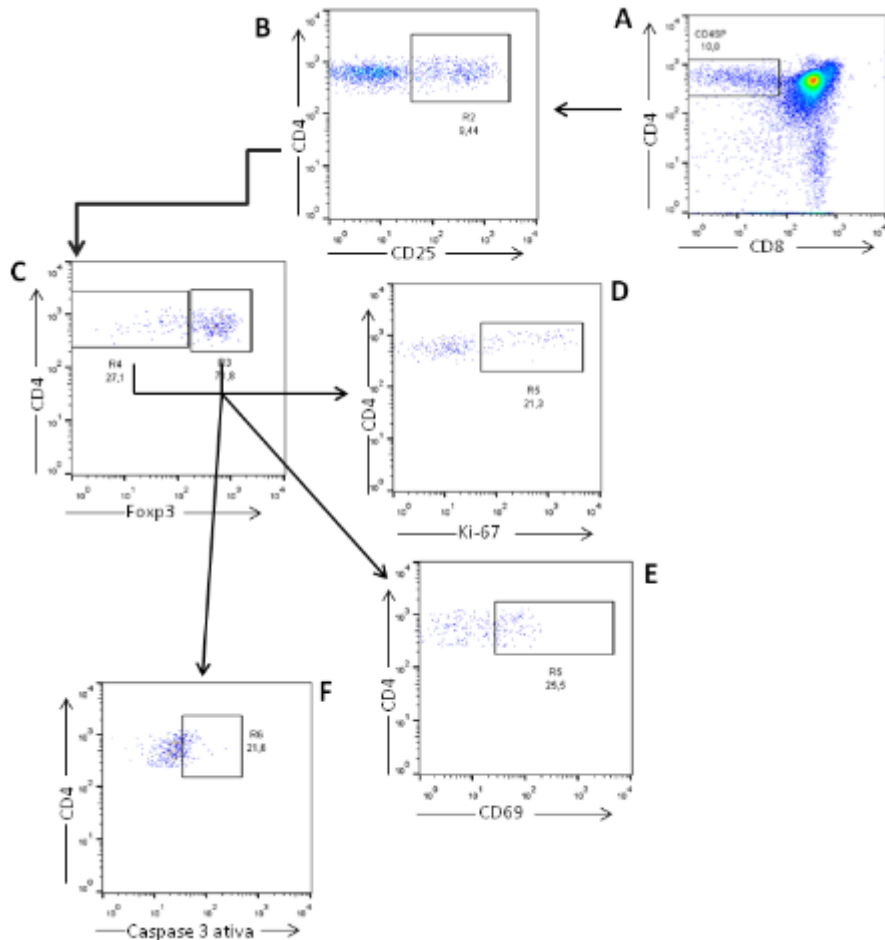
#### 4.5) Ativação, proliferação e morte de tTreg

Foram utilizadas placas de PVC, 96 poços, de fundo em “U” (Alfa®, São Paulo, Brasil) tratadas com anti-CD3 (8 µg /ml) e fibronectina (10 µg/ml), 20 µl de cada, diluído em

RPMI+10%SBF *overnight* a 4°C. A placa foi lavada com RPMI+10%SBF e foram adicionadas as células ( $1 \times 10^6$  células por poço). Foram adicionados 50 µl de soluções contendo CD28 (5 µg /ml) e/ou rIL-2 (4 ng/ml) e as células foram deixadas em estufa a 37°C por 6 horas, 24 horas e 48 horas.

Após esses períodos, as placas foram retiradas da estufa e lavadas em RPMI+10%SBF e os anticorpos de superfície (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-Caspase 3 ativa) foram adicionados (10 µL por poço), diluídos em PBS e as células foram mantidas por 30 minutos a 4-8°C. Depois da incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e foi adicionada a solução FixPerm (foi utilizado o kit descrito no item anterior) com incubação em geladeira por 40 minutos ou *overnight*. As células foram subsequentemente lavadas por 2 vezes em Perm, seguida de imunomarcação com solução Perm contendo o anti-Foxp3 e anti-Ki-67 por 30 minutos. Após 2 lavagens com a solução Perm, as células foram ressuspensas em PBS e adquiridas no citômetro.

Os controles foram feitos com células puras e células com marcação para cada fluorocromo utilizado. Foram adquiridas 100.000 células dentro do *gate* de linfócitos. Para as análises percentuais das subpopulações do timo e da fenotipagem de tTreg em relação aos marcadores de ativação, proliferação e morte (Figura 10), utilizamos uma sequência lógica de regiões após aquisição no citômetro de fluxo e análise no Summit (DAKO). Primeiramente, delimitamos uma região de linfócitos totais, e em seguida, delimitamos o grupo de células CD4 SP (**Figura 10A**). Dentro do grupo CD4 SP foi delimitada a região de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (**Figura 10B**). Dentro da região positiva, foram delimitadas as regiões de células Foxp3<sup>+</sup> e células Foxp3<sup>-</sup> (**Figura 10C**). A partir desses dois grupos, analisamos as populações Ki-67<sup>+</sup> (**Figura 10D**), CD69<sup>+</sup> (**Figura 10E**) e Caspase 3 ativa<sup>+</sup> (**Figura 10F**).



**Figura 10: Representação do fluxo das análises citofluorométricas II.** (A) As populações T CD4 SP (CD4+CD8- simples-positiva) foi delimitada em função da expressão dos marcadores CD4 *versus* CD8. (B) A população T CD4 SP foi dividida em CD25<sup>+</sup>. (C) A população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foi dividida em Foxp3<sup>+</sup> e Foxp3<sup>-</sup> (D,E,F) Dentro de cada uma das populações anteriores, o marcador Ki-67 (D), CD69 (E) e Caspase 3 ativa (F).

#### 4.6) Ensaio de adesão

Placas de 6 (Biofil®) ou 12 poços (Falcon®) com lamínulas de 18 mm e 0,17mm de espessura certificada foram recobertas com fibronectina (10 µg/ml) por 1h em câmara úmida, em seguida, o sobrenadante foi retirado e as placas foram deixadas para secar. Em seguida, adicionou-se solução de BSA 0,5% para os poços controles e nos poços contendo fibronectina por 1h em câmara úmida. O sobrenadante foi retirado, e as células foram adicionadas ( $10 \times 10^6$  células por poço nas placas de 6 poços e  $1 \times 10^6$  células por poço nas placas de 12 poços, sendo essas células provenientes de sorting contendo apenas células CD4 SP tímicas) diluídas em RPMI sem soro por 1h a 37°C. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa e as células não aderentes foram retiradas através de 3 lavagens consecutivas com PBS a 37°C.

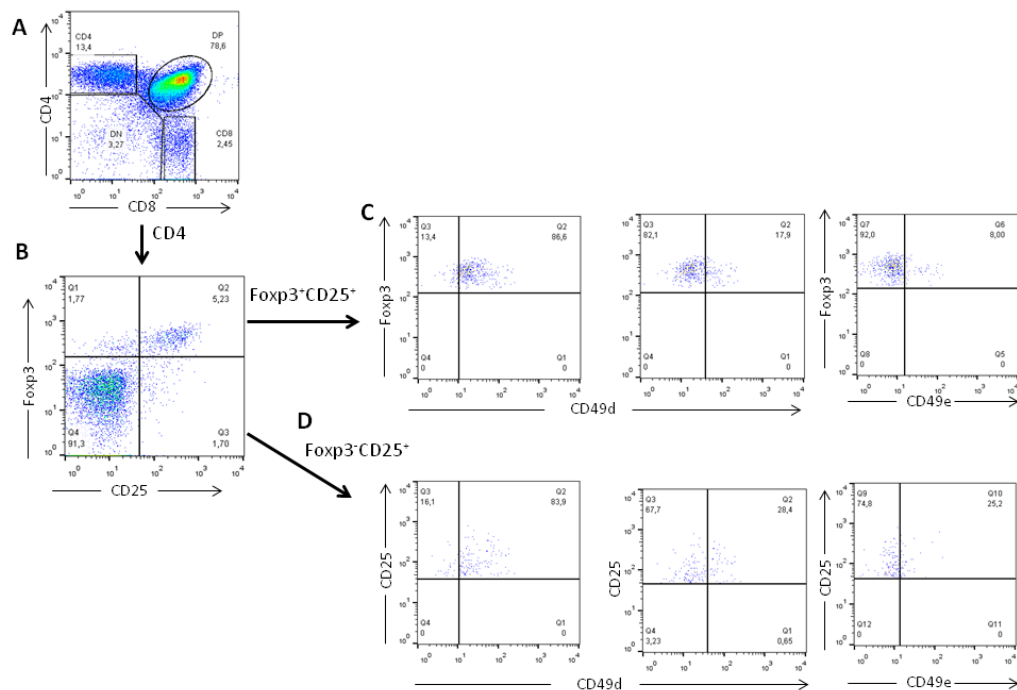
Nesse ponto, as placas de 12 poços foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente e submetida à imunofluorescência indireta. Após a fixação,

os poços foram lavados 2x com PBS/BSA 1% e submetidas a um tampão de permeabilização (PBS/Triton 0,01%) por 5 minutos. Em seguida, o anticorpo anti-Foxp3 purificado foi diluído em tampão de permeabilização e as células foram marcadas por 1 hora à temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Após esse período, os poços foram lavados com tampão de permeabilização por 2 vezes, e um mix contendo anticorpo de cabra anti coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 546 e faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488 diluídos em tampão de permeabilização foi adicionado aos poços e deixados em temperatura ambiente por 45 minutos. Passado esse tempo, a placa foi lavada 2 vezes com o tampão de permeabilização e em seguida 2 vezes como PBS/BSA 1%. As lamínulas foram retiradas dos poços, retirados o excesso de líquido na sua superfície, e em seguida foram montadas em meio anti-fade Prolong Gold com DAPI em lâminas de vidro. Após 24 horas em câmara escura em temperatura ambiente, as lâminas foram analisadas por microscopia de super-resolução do tipo iluminação estruturada (SR-SIM) (Zeiss). As análises foram realizadas em timócitos CD4+CD8<sup>-</sup> isolados em citômetro de fluxo, com posterior imunomarcação para Foxp3 (**Figura 26**); fluorescência em vermelho – a marcação nuclear é específica para o Foxp3, enquanto a tênue marcação membranar se deve à fluorescência emitida pelo fluorocromo utilizado para a marcação anti-CD4). As análises posteriores foram realizadas no software Zen Black da Zeiss.

As placas de 6 poços foram submetidas a subsequentes lavagens com PBS gelado para retirar as células aderentes. Em seguida, utilizou-se o protocolo de fenotipagem referente ao tópico 4.4. As análises foram realizadas no Flow Jo e estão sintetizadas na **Figura 9** e **Figura 11**.

#### **4.7) Obtenção de tecidos**

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, em seguida, foi retirado o timo de cada animal. Os órgãos foram emblocados em Tissue-Tek® (Sakura, Torrance – EUA) e congelados em gelo seco por 30 minutos. Em seguida os órgãos foram estocados em -80°C. Os cortes foram realizados em criostato (Leica 1350, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e foram sobrepostos em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma). As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram fixadas em acetona 100%, gelada, por 10 minutos.



**Figura 11: Representação do fluxo das análises citofluorométricas III.** (A) As populações T CD4 SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> simples-positiva), CD8SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> simples-positiva), DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> duplo-negativa) e DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> duplo-positiva) foram delimitadas em função da expressão dos marcadores CD4 *versus* CD8. (B) Dentro de T CD4 SP, delimitou-se as populações Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (precursores) (C) As análises de CD49d e CD49e foram realizadas para a população Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e (D) para a população Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>.

#### 4.8) Análises da interação de células tTreg com a fibronectina tímica

Criocortes de 5  $\mu$ m e 50  $\mu$ m foram realizados e utilizados para a técnica de imunofluorescência através de imunofluorescência indireta. Para bloqueio os cortes foram incubados com PBS-BSA 1% por 30 minutos, à temperatura ambiente, foi realizada a marcação com anticorpos anti-fibronectina ou isotipo controle (IgG2a de coelho purificada), diluídos em PBS, durante 60 minutos ou *overnight*, à temperatura ambiente ou a 4°C, respectivamente. Os cortes foram submetidos a 3 lavagens consecutivas de 5 minutos com PBS e, então, incubados com o anticorpo secundário Alexa 546 por 45 minutos. Para uma dupla marcação, os cortes foram submetidos a mais 3 lavagens de 5 minutos e incubados com anti-Foxp3 murino purificado ou com o isotipo controle (IgG2a de rato purificada), diluídos em PBS-Saponina 0,1% por 60 minutos. Após mais 3 lavagens de 5 minutos, foram incubados com o anticorpo secundário diluído em PBS-Saponina 0,1% por 45 minutos. Após as lavagens finais, as lâminas foram cobertas com meio de montagem Prolong Gold com DAPI (Life Technologies, P-36931) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager A2). Para quantificação da média da intensidade de fluorescência, foi utilizado o

programa Image J, com utilização do Threshold (Jensen, 2013). Os cortes de 50  $\mu\text{m}$  também foram analisados em microscópio confocal FV10i Olympus (Japão) na plataforma do Instituto Nacional do Câncer (INCA), utilizando o software FluoView 10-ASW 2.1 Viewer, também da Olympus, para obtenção das imagens do confocal e as imagens em 3D.

#### **4.9) Análises Estatísticas**

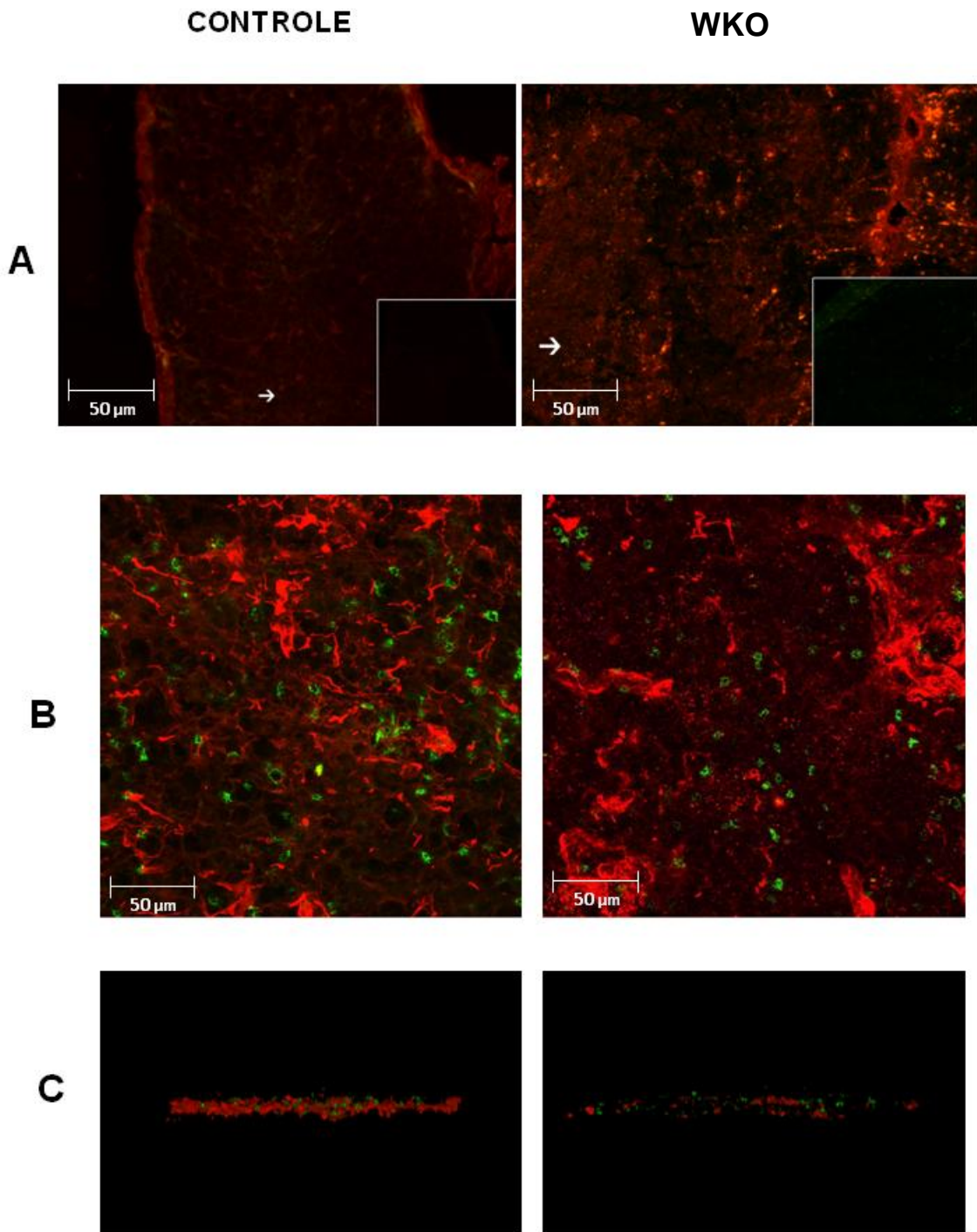
As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (unicaudal ou bicaudal) e o método 2-way ANOVA. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de  $p$  foram inferiores a 0,05 (\*), inferiores a 0,01 (\*\*) e 0,001 (\*\*\*). Software utilizado para análise foi o GraphPad prism versão 5.0. As barras representam a média de cada grupo  $\pm$  desvio padrão.

## 5. RESULTADOS

### 5.1) Diminuição da rede de fibronectina na região medular tímica de camundongos WKO

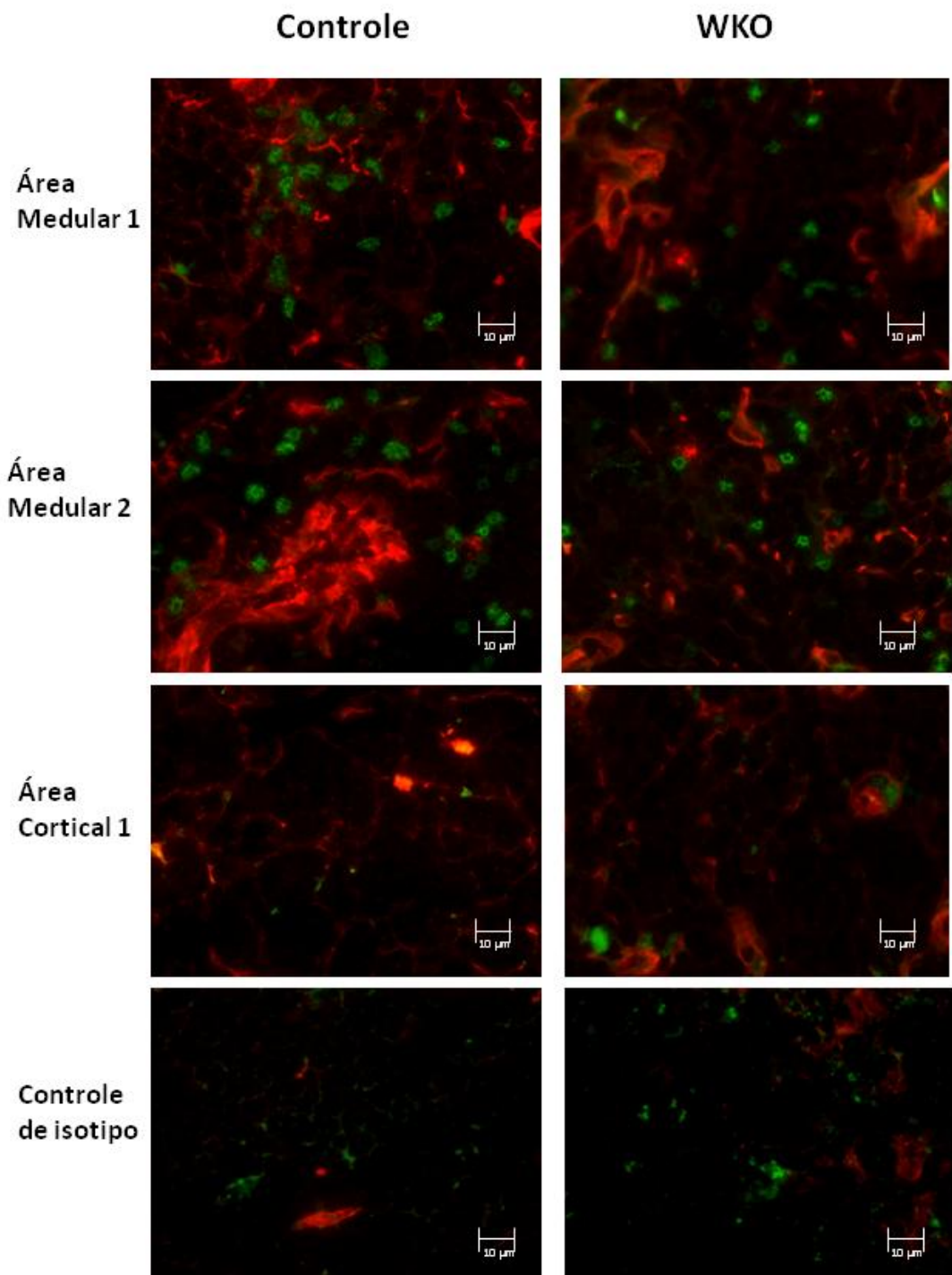
A fibronectina é mais encontrada na medula e nos septos do órgão (Berrih et al. 1985) e as células tTreg são basicamente encontradas na região medular onde é diferenciada e selecionada (Fontenot et al. 2005a). Desse modo, definimos para o início do trabalho, analisar e comparar as regiões medulares tímicas de animais controle e WKO, assim como a presença e o número de células tTreg nessas regiões (definidas pela marcação intracelular de Foxp3). Observamos uma acentuada diminuição de células tTreg em camundongos WKO em relação à quantidade observada em camundongos BALB/c (**Figura 12A-C**). De forma interessante, observamos também, uma redução na imunomarcação de fibronectina na região medular tímica de camundongos WKO, quando comparadas com a marcação vista em camundongos controle.

Análises em microscopia de fluorescência convencional corroboraram os resultados anteriores, onde, ao comparar as regiões medulares tímicas, revela-se uma diminuição de células tTreg em camundongos WKO em relação à quantidade observada em camundongos controle da linhagem 129/SvEv (**Figura 13**). Para quantificação da marcação de fibronectina, foi utilizado o programa Image J, com utilização do método de quantificação de Threshold (Jensen 2013). Esses dados revelaram diminuição significativa da intensidade de fluorescência da marcação de fibronectina em camundongos WKO em relação ao controle na região medular tímica (**Figura 14**).

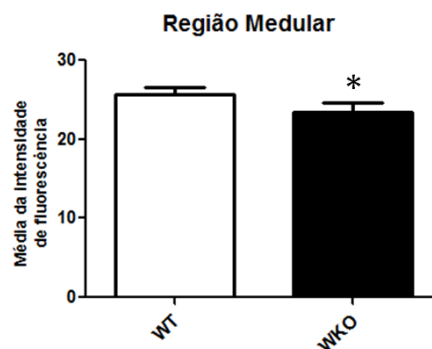


**Figura 12: Diminuição da rede de fibronectina e do número de células tTreg na região medular tímica de camundongos WKO.** (A) O painel mostra campos micrográficos representativos de análises por microscopia confocal de fluorescência em cortes de 50 μm de timos de camundongos controles BALB/c (fotos da coluna esquerda) e WKO (fotos da coluna direita), mostrando imunomarcção dupla de fibronectina (vermelho) e de Fcγ3 (verde). As setas indicam as regiões que foram analisadas por microscopia confocal, e os insertos representam o controle negativo da imunomarcção. (B) Foram realizadas sobreposições das camadas micrográficas e; (C) a reconstituição tridimensional das imunomarcções obtidas da região medular do timo de camundongos controle e WKO. Resultado de um experimento com n=1, 3 imagens utilizadas.





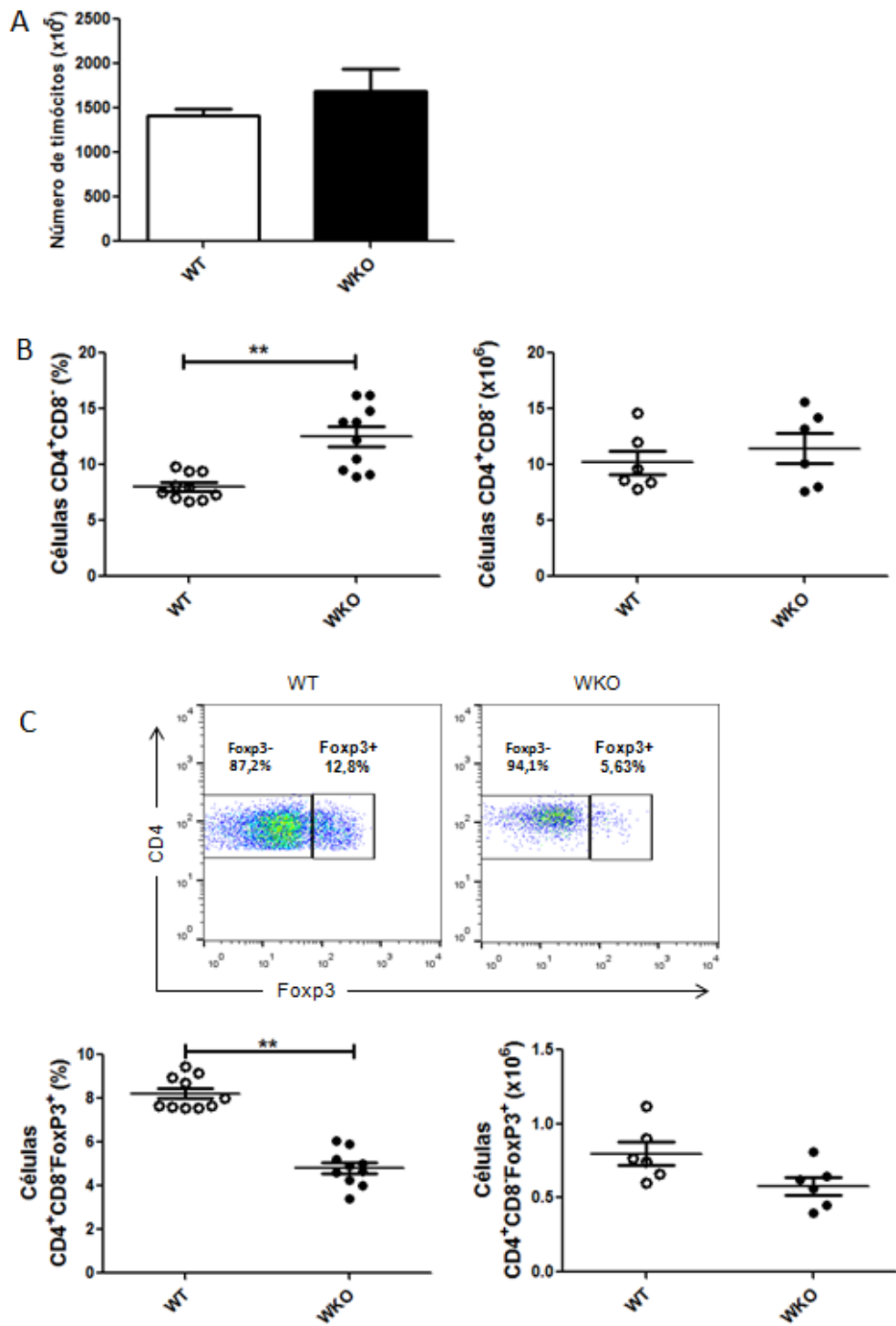
**Figura 13: Diminuição da rede de fibronectina e do número de células tTreg na região medular tímica de camundongos WKO por microscopia convencional.** O painel mostra campos micrográficos representativos de análises por microscopia de fluorescência em cortes de 5  $\mu$ m de timos de camundongos controle 129SvEv (fotos da coluna esquerda) e WKO (fotos da coluna direita), mostrando imunomarcção dupla de fibronectina (vermelho) e de Fc $\gamma$ 3 (verde) de áreas medulares e corticais. Nas áreas corticais não é possível observar células Fc $\gamma$ 3 positivas e a fibronectina encontra-se mais delgada que na região medular. Resultado de um experimento com n=2.



**Figura 14: Diminuição da rede de fibronectina na região medular tímica de camundongos WKO.** O gráfico mostra a análise da quantificação da fluorescência de 21 campos micrográficos em cortes de 5  $\mu$ m de timos de 3 camundongos controle 129SvEv (barra branca) e 3 WKO (barra preta). Estatística: teste Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos, com  $n=3$ .

## 5.2) O timo de camundongos WKO apresenta um aumento percentual de células CD4 SP e uma diminuição percentual de células tTreg

Devido à redução de células tTreg na região medular dos animais WKO observadas nos experimentos de imunofluorescência, decidimos analisar as populações de timócitos através de citometria de fluxo para confirmação da redução no número de células tTreg. Primeiramente, analisamos a celularidade tímica para comparação entre camundongos WT e WKO. Os resultados foram obtidos através da contagem das suspensões de células provenientes de timo em câmara de Neubauer. Apesar de os valores obtidos não serem estatisticamente significativos, observamos que os animais WKO apresentam um ligeiro aumento da celularidade, em termos de número de timócitos totais, quando comparados com os animais WT (**Figura 15A**). Ao analisarmos os valores relativos e absolutos das subpopulações  $CD4^+CD8^-$  (CD4 SP) e  $CD4^+CD8^-Foxp3^+$  (tTreg), observamos um aumento significativo na frequência de células CD4 SP e uma diminuição significativa na frequência de células tTreg em camundongos WKO, mas não em número absoluto desses grupos celulares (**Figura 15B-C**).



**Figura 15: Análise da celularidade e das populações de timócitos CD4 SP e tTreg em camundongos WKO e controle.** (A) Número absoluto de timócitos nos animais WT e WKO (n=10). (B) Percentagem (n=10) e valor absoluto (n=6) de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> nos animais WT e WKO. (C) Histograma bidimensional de análise CD4 *versus* Foxp3, mostrando a região de análise das células Foxp3<sup>+</sup> (painel superior); percentagem (n=10) e valor absoluto (n=6) de CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em animais WT e WKO (painel inferior). Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05; \*\* p< 0,01). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.

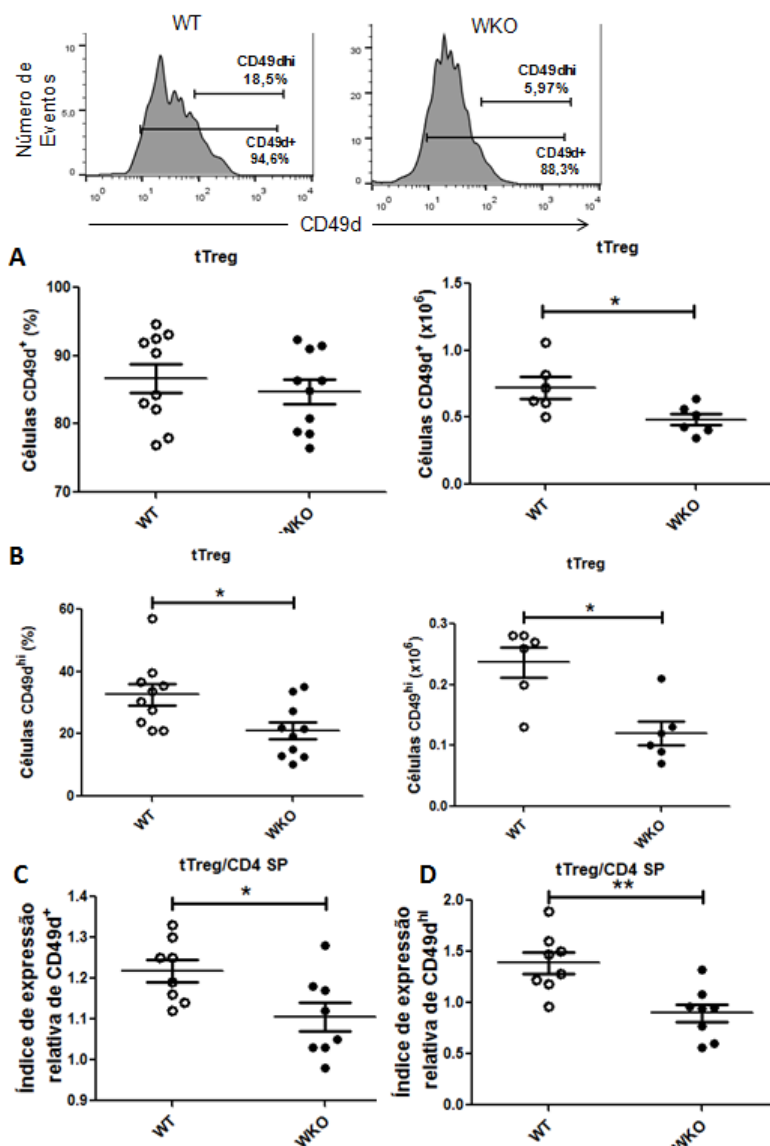
### 5.3) Diminuição de células tTreg expressando receptores para fibronectina no timo de camundongos WKO

Nossos resultados corroboram os estudos anteriores onde camundongos WKO apresentam menor número de células Treg (Snapper et al. 1998; Maillard et al. 2007). Esses dados, em conjunto com nosso achado de diminuição da fibronectina no arcabouço tímico, nos levaram a investigar se a relação entre tTreg e ECM tímica está envolvida na diminuição de Treg em camundongos WKO. Dessa forma, buscamos abordar a interação de células tTreg com a fibronectina. Inicialmente, analisamos a expressão dos receptores de fibronectina CD49d (cadeia alfa 4 do receptor VLA-4,  $\alpha 4\beta 1$ ) e CD49e (cadeia alfa 5 do receptor VLA-5,  $\alpha 5\beta 1$ ). Apesar de ser receptor de para laminina, decidimos avaliar a expressão de CD49f (cadeia alfa 6 do receptor VLA6,  $\alpha 6\beta 1$ ) para comparação com os receptores de fibronectina.

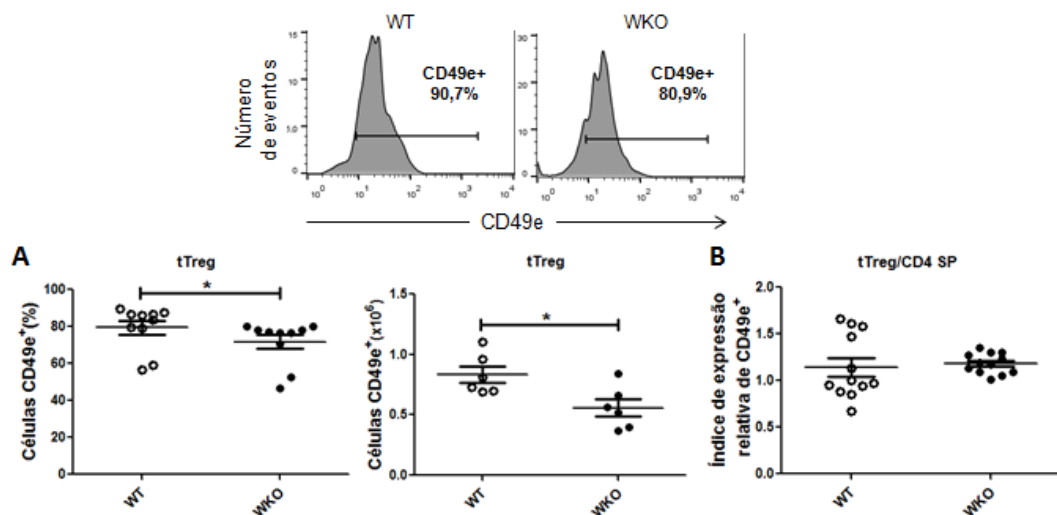
A análise da expressão da molécula CD49d por citometria de fluxo não mostrou diminuição entre WT e WKO na análise percentual, porém, observamos diminuição no número absoluto de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+$  expressando CD49d (**Figura 16A**). Células DN apresentam um subgrupo com alta densidade de moléculas CD49d em sua membrana e, dessa forma, são fenotipicamente definidas como células  $CD49d^{hi}$ ; partimos da análise dessa subpopulação para delimitar a subpopulação  $CD49d^{hi}$  dentro de células tTreg (**Figura 9C**). Essas análises mostraram, pela primeira vez, que células tTreg também apresentam uma clara subpopulação de células  $CD49d^{hi}$  (**Figura 9C e Figura 16**). Além disso, observamos uma diminuição significativa tanto na percentagem quanto no número absoluto de células tTreg  $CD49d^{hi}$  provenientes de camundongos WKO (**Figura 16B**). Ainda, análise da relação entre a frequência de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD49d^+$  e a frequência de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^-CD49d^+$  demonstrou diminuição significativa nos camundongos WKO em comparação aos controles WT (**Figura 16C**). De forma similar, uma diminuição significativa em WKO ocorreu quando foi analisada a razão entre a frequência de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD49d^{hi}$  e a frequência de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^-CD49d^{hi}$  (**Figura 16D**), esses resultado sugerem que a frequência maior de células  $CD49d^+$  e  $CD49d^{hi}$  em células tTreg comparada àquela em células CD4SP, visto em animais WT, está reduzida de forma importante nos camundongos WKO.

A análise citofluorométrica da molécula CD49e (**Figura 17**) demonstrou diminuição significativa nos números relativos e absolutos de células positivas para esse marcador nas células provenientes dos camundongos WKO em relação aos camundongos WT. No entanto, análise da razão entre a frequência de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD49e^+$  e a frequência de

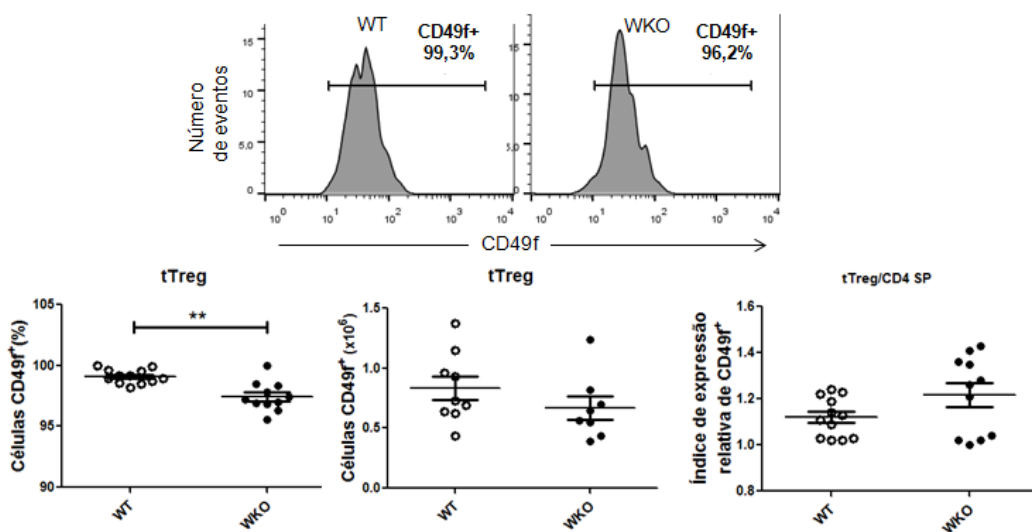
células  $CD4^+CD8^-Foxp3^-CD49e^+$  revelou a inexistência de diferença significativa entre os grupos WKO e WT. Visando avaliar se as alterações acima observadas são específicas para os receptores de fibronectina, decidimos analisar a expressão da molécula CD49f, um componente de receptor de laminina do tipo integrina. Essas análises mostraram diferença significativa no número relativo das células tTreg de camundongos WKO em relação ao de animais WT (**Figura 18**).



**Figura 16: Análise de CD49d em camundongos WKO e controle.** Histogramas de análise da molécula CD49d dentro da subpopulação  $CD4^+CD8^-Foxp3^+$  (painel superior). (A) Percentagem (n=10) e o número total (n=6) de células CD49d<sup>+</sup> dentro da subpopulação  $CD4^+CD8^-Foxp3^+$  (tTreg) de animais WT e WKO. (B) Percentagem (n=10) e o número total (n=6) de células CD49d<sup>hi</sup> dentro da subpopulação  $CD4^+CD8^-Foxp3^+$  de animais WT e WKO. (C) Índice de expressão de CD49d<sup>+</sup> com a razão entre a percentagem de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD49d^+$  sobre a percentagem de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^-CD49d^+$  (tTreg). (D) Índice de expressão de CD49d<sup>hi</sup> com a razão entre a percentagem de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD49d^{hi}$  sobre a percentagem de células  $CD4^+CD8^-Foxp3^-CD49d^{hi}$ . Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05; \*\* p< 0,01). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.



**Figura 17: Análise de CD49e em camundongos WKO e controle.** Histograma de análise da molécula CD49e dentro da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> (painel superior). (A) Percentagem (n=10) e o número total (n=6) de células CD49e<sup>+</sup> dentro da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> (tTreg) de animais WT e WKO (B) Índice de expressão de CD49e<sup>+</sup> com a razão entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49e<sup>+</sup> sobre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49e<sup>+</sup>. Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.

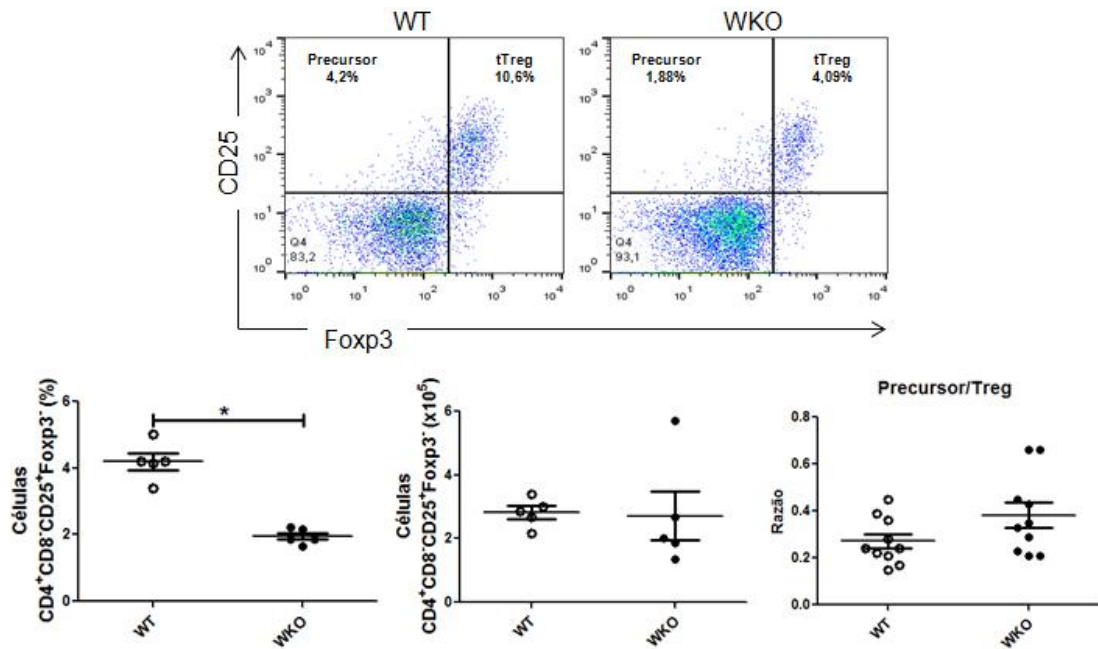


**Figura 18: Análise de CD49f em camundongos WKO e controle.** Histogramas de análise da molécula CD49f dentro da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> (painel superior). Percentagem (n=11) e o número total (n=9) de células CD49f<sup>+</sup> dentro da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> (tTreg) de animais WT e WKO. Índice de expressão de CD49f<sup>+</sup> com a razão entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup> sobre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>. Estatística: teste Mann-Whitney \*\* p< 0,01). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.

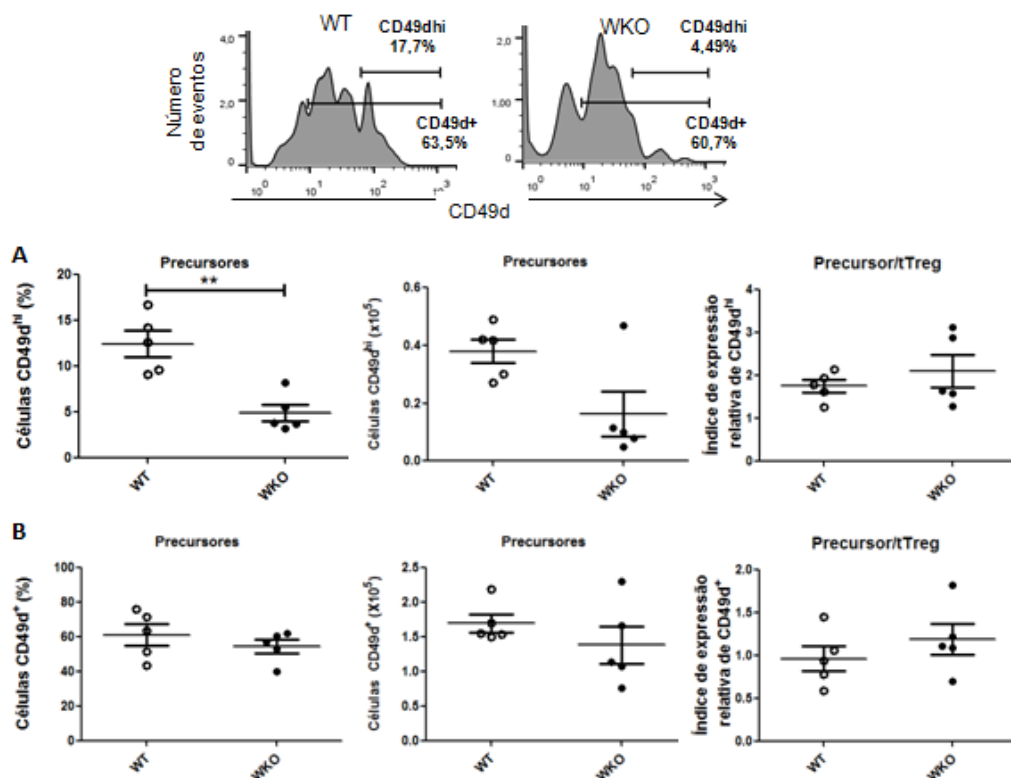
É importante ressaltar ainda que observamos diminuição na expressão membranar dessas moléculas, a partir de análises da mediana da de fluorescência (dados não mostrados).

#### 5.4) Diminuição em células precursoras de tTreg expressando receptores para fibronectina em timo de camundongos WKO

A população  $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$  é definida em diversos estudos como precursores diretos de células Treg, que são dependentes da sinalização via IL-2R/STAT-5 para a expressão de Foxp3 (Burchill et al. 2008). Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar se esses precursores também apresentavam diminuição para os receptores de fibronectina. Para essa análise, a partir da região que delimita a subpopulação CD4 SP, fizemos um gráfico de pontos para análise bidimensional dos parâmetros Foxp3 *versus* CD25, e delimitamos a região  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  (**Figura 11**). De forma interessante, observamos uma diminuição na frequência, mas não no número absoluto, de células  $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$  presente no timo de camundongos WKO, quando comparamos aos valores obtidos em animais WT (**Figura 19**). Além disso, ao analisar a razão entre precursores e células tTreg, não observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT e WKO (**Figura 19**).

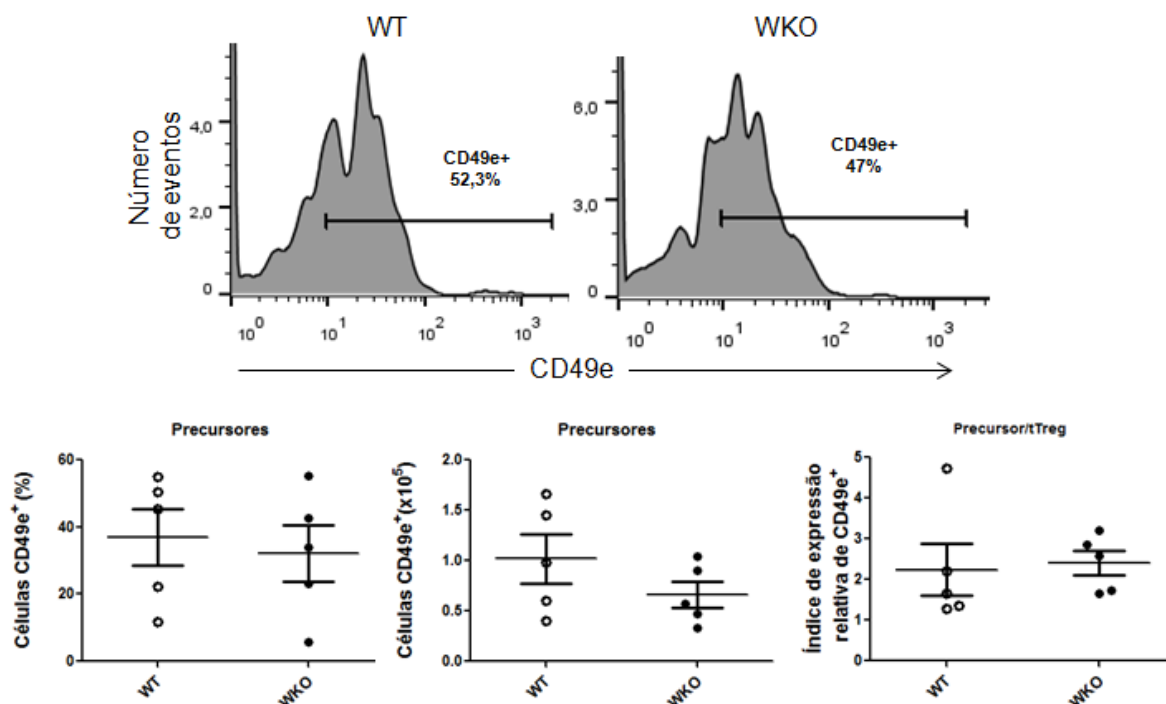


**Figura 19: Análise dos valores da população de precursores no timo de camundongos WT e WKO.** Histograma bidimensional de análise CD25 *versus* Foxp3 dentro da população  $CD4^+$ , mostrando a região de análise das células  $CD25^+Foxp3^-$  (painel superior); valores percentuais (n=5) e absolutos (n=5) da população  $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$  (precursores) no timo de animais WT e WKO, e a razão entre as células precursoras ( $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ ) e células tTreg ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) (painéis inferiores). Estatística: teste Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.



**Figura 20: Análise de CD49d em precursores de Treg de camundongos WKO e controle.** Histogramas de análise da molécula CD49d dentro da população de precursores (painel superior). (A) Percentagem (n=5) e o número total (n=5) de células CD49d<sup>hi</sup> dentro do subgrupo de precursores de Treg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) em timo de WT e WKO, e índice de expressão de CD49d<sup>hi</sup> com a razão entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49d<sup>hi</sup> sobre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> CD49d<sup>hi</sup>. (B) Percentagem (n=5) e o número total (n=5) de células CD49d<sup>+</sup> no subgrupo de precursores de tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) em WT e WKO, e o índice de expressão de CD49d<sup>+</sup> com a razão entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49d<sup>+</sup> sobre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> CD49d<sup>+</sup>. Estatística: teste Mann-Whitney (\*\* p< 0,01). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.





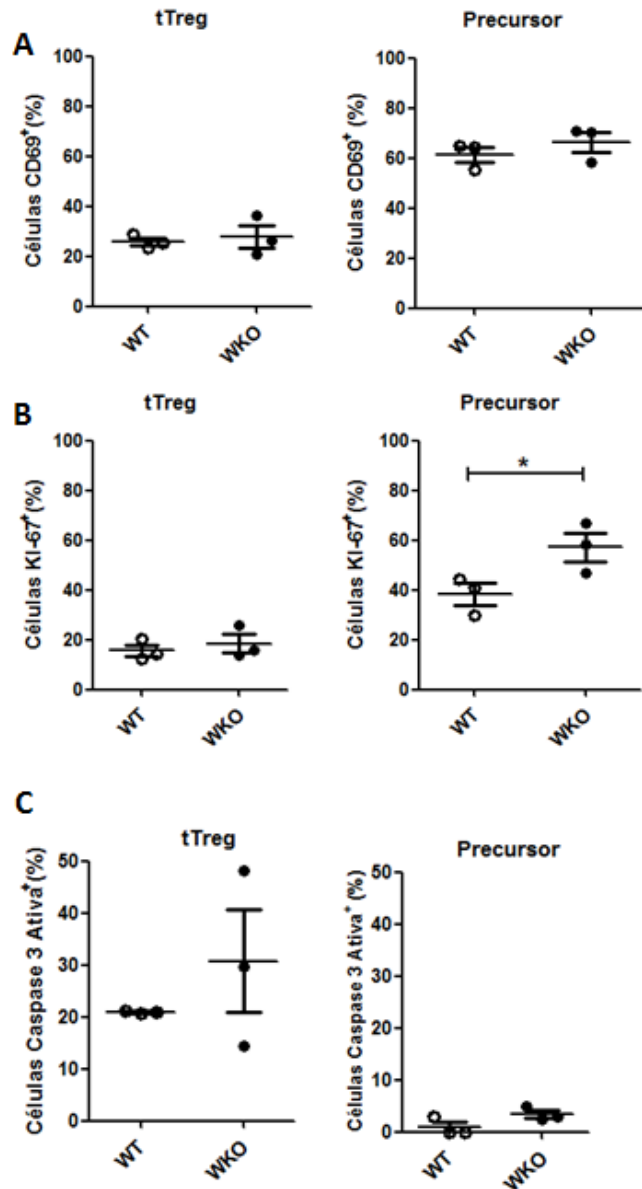
**Figura 21: Análise de CD49e em precursors de Treg de camundongos WKO e controle.** Histogramas de análise da molécula CD49f dentro da subpopulação de precursors (painel superior). (A) Percentagem (n=5) e o número total (n=5) de células CD49e<sup>+</sup> dentro da subpopulação de precursors de tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) no timo de WT e WKO e índice de expressão de CD49e<sup>+</sup> com a razão entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49e<sup>+</sup> sobre a percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD49e<sup>+</sup>. Estatística: teste Mann-Whitney. Os dados representam um conjunto de 3 experimentos.

### 5.5) Células tTreg e seus precursors provenientes de animais WKO apresentam alterações nas propriedades de ativação recente e proliferação após estimulação *in vitro*

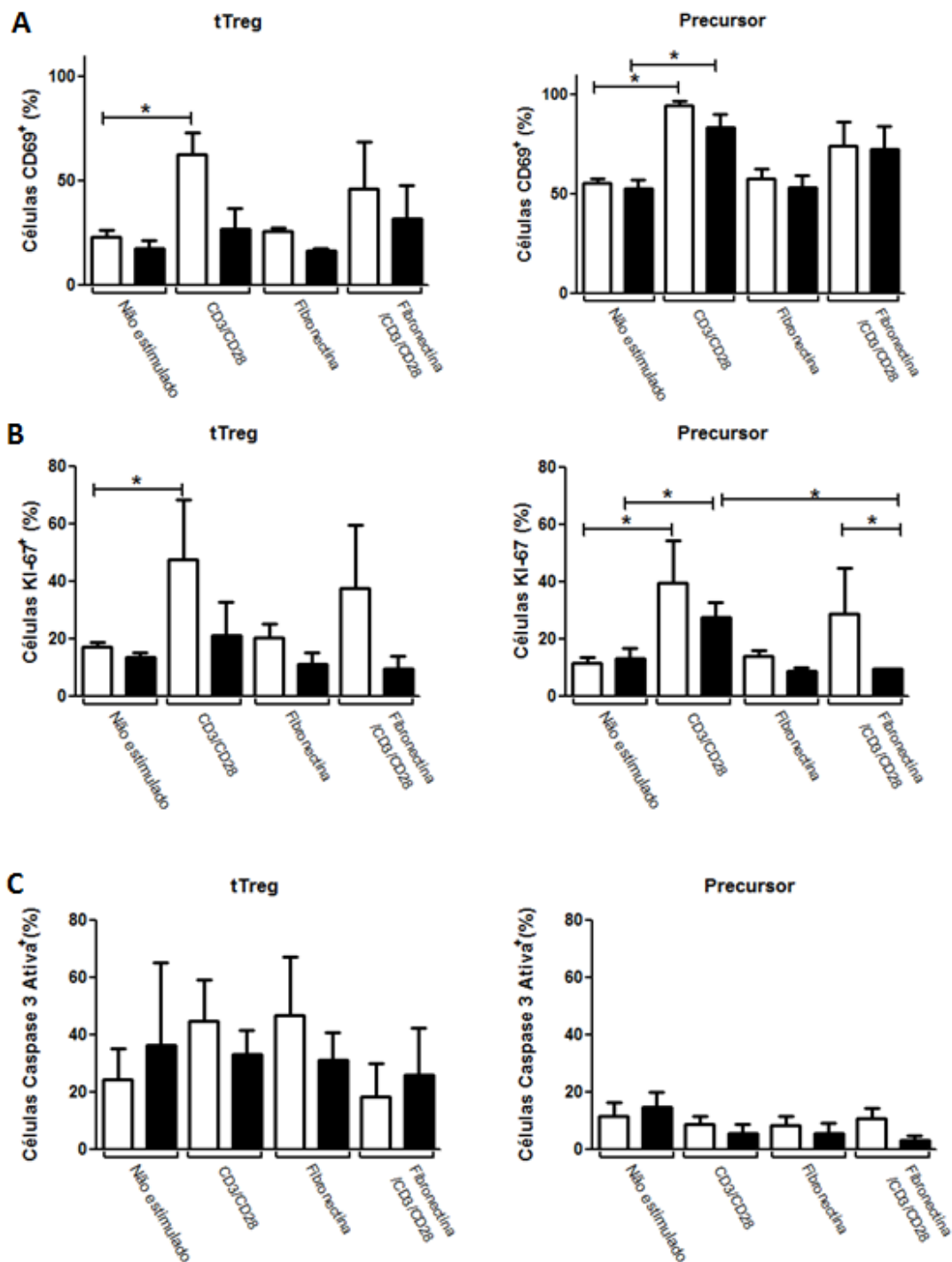
A ativação do TCR e a coestimulação via CD28 têm sido definidas como fundamentais no processo de diferenciação intratímica de células tTreg (revisado em Hsieh et al. 2012). Assim, decidimos investigar como as células derivadas de animais WKO se comportavam em cultura frente à estimulação pelo TCR (com anticorpos estimuladores anti-CD3 e anti-CD28) em conjunto com a adesão em fibronectina, avaliando a ativação, proliferação e morte. Inicialmente, avaliamos *ex vivo* a frequência de células ativadas, em proliferação e apoptóticas, respectivamente através da marcação de CD69, Ki-67 e caspase-3-ativa, nos subgrupos de células tTreg e seus precursors. Nossos resultados sugerem que as células precursoras encontram-se em estado de maior ativação e proliferação, bem como apresentam maior suscetibilidade à morte por apoptose, em comparação às células Treg, no timo de ambos os grupos de camundongos WT e WKO (**Figura 22A-C**). Além disso, não foi

possível observar diferenças nos níveis de expressão de CD69, uma molécula altamente expressa em células Treg ativadas, na membrana de células tTreg e seus precursores entre os grupos WT e WKO (**Figura 22A**). Por outro lado, a marcação para Ki-67 mostrou que os precursores de tTreg do timo de animais WKO estavam proliferando em níveis significativamente maiores, em comparação às células de camundongos WT (**Figura 22B**). Ainda, a marcação para caspase 3 ativa demonstrou um aumento não significativo na média da frequência de células precursoras apoptóticas em WKO em relação às células de animais WT (**Figura 22C**).

Em seguida, as células foram colocadas em cultura para estimulação via anti-CD3/anti-CD28, bem como via adesão à fibronectina. As análises prévias de ativação em períodos de 6-48 h mostraram altos níveis de expressão membranar de CD69 em células CD4 SP e tTreg após 6 h de ativação, bem como eficiente atividade proliferativa, medida através da marcação com Ki-67, com 48 h em estimulação (dados não mostrados). Dessa forma, ao avaliarmos a marcação de superfície para CD69 e a frequência de células que expressam a molécula Ki-67, observamos que células tTreg e seus precursores obtidos de camundongos-controle são ativadas na presença de anti-CD3/anti-CD28, mas não na presença de fibronectina (**Figura 23A-B**). Entretanto, quando analisamos a ativação dessas subpopulações de animais WKO, observamos que somente o grupo de precursores de tTreg são ativados via estimulação com anti-CD3/anti-CD28 (**Figura 23A-B**). Novamente, a adesão à fibronectina não leva à ativação ou proliferação de células WKO (**Figura 23A-B**). Além disso, observamos uma diminuição da proliferação de células tTreg de animais WKO, bem como de suas células precursoras, quando estimuladas via anti-CD3/anti-CD28 em presença de fibronectina (**Figura 23B**). Em relação à morte celular, observamos que os diferentes estímulos não alteram os níveis de apoptose nas células analisadas em ambos os grupos WT e WKO (**Figura 23C**). É importante ressaltar ainda a observação de que células tTreg apresentam níveis aumentados de apoptose com ou sem estímulos de ativação, quando comparadas com as células precursoras (**Figura 23C**).



**Figura 22: Análise *ex vivo* da ativação, proliferação e morte de células tTreg e precursores.** (A) Percentagem (n=3) de células CD69<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) no timo de WT e WKO. (B) Percentagem (n=3) de células KI-67<sup>+</sup> em tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) no timo de WT e WKO. (C) Percentagem (n=3) de células Caspase-3-ativa em tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) no timo de WT e WKO. Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos, com células isoladas de um animal por grupo em cada experimento.

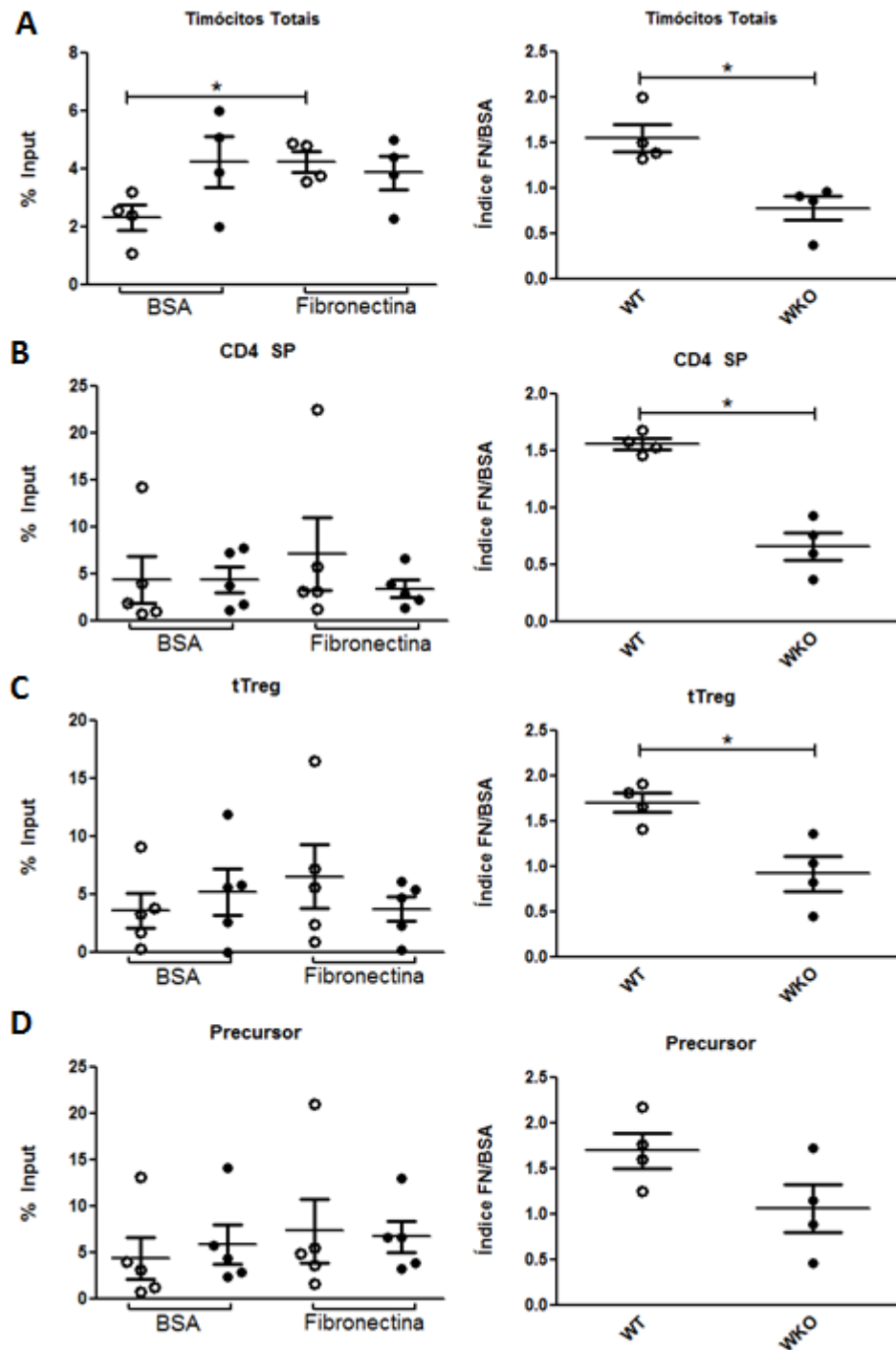


**Figura 23: Análise da ativação, proliferação e morte de células tTreg e precusores.** (A) Percentagem (n=3) de CD69<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precusores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) no timo de WT e WKO após 6 h de estimulação. (B) Percentagem (n=3) de KI-67<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precusores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) no timo de WT e WKO após 48 h de estimulação. (C) Percentagem (n=3) de Caspase-3-ativa<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precusores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) no timo de WT e WKO após 48 h de estimulação. Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05). Os dados representam um conjunto de 3 experimentos, com células isoladas de um animal por grupo em cada experimento.

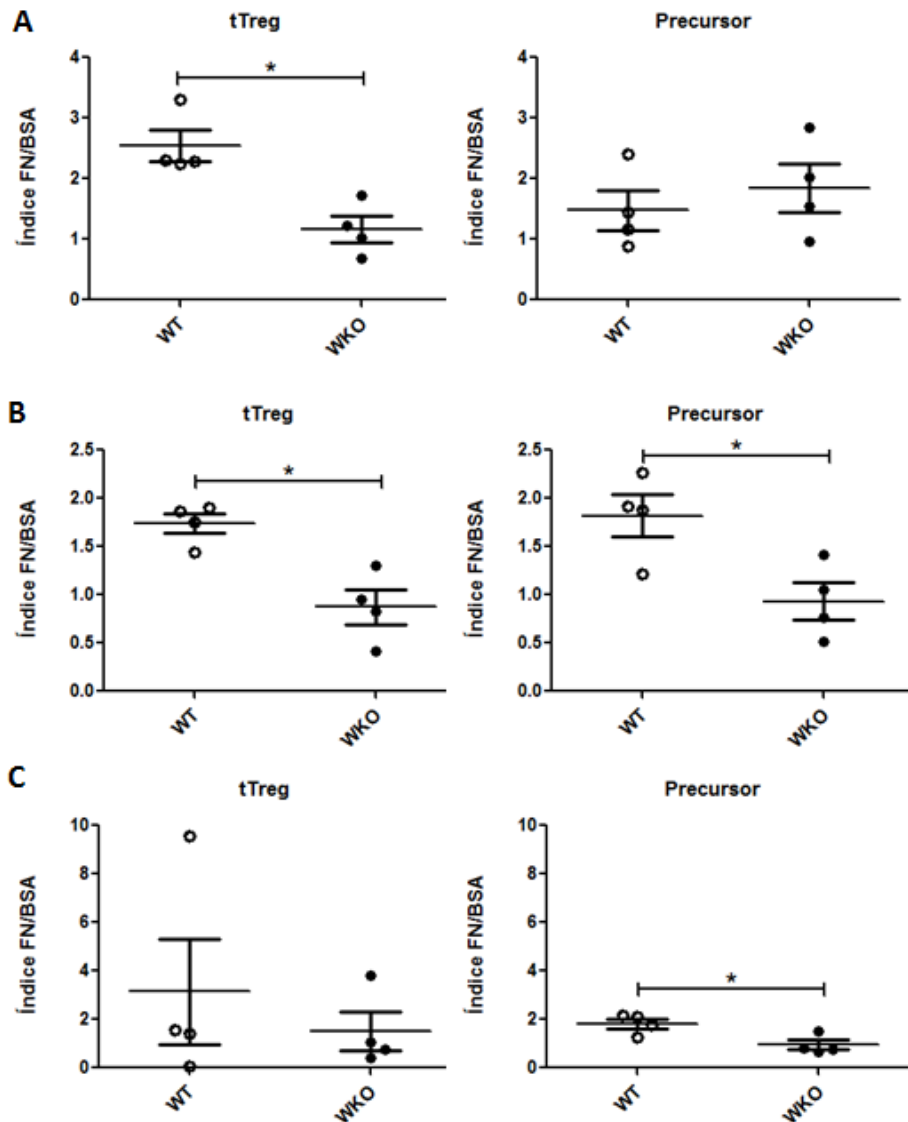
## 5.6) Células tTreg obtidas do timo de animais WKO aderem menos à fibronectina

Sabendo-se que durante a migração dos timócitos, os eventos de adesão e de-adesão são cruciais para que os timócitos entrem em contato com os sinais corretos para sua maturação e que a ECM é fundamental para esses eventos adesivos e de-adesivos (Savino *et al.*, 2004), decidimos avaliar as propriedades adesivas de células tTreg e seus precursores frente à fibronectina. A análise de timócitos aderentes demonstrou que as células provenientes de animais WT aderiam significativamente à fibronectina, em comparação ao ensaio do controle de adesão em BSA, enquanto os timócitos WKO parecem não apresentar a mesma capacidade adesiva à fibronectina (**Figura 24A**). Ainda, verificamos aumento não significativo nos números relativos de células CD4 SP e tTreg aderentes à fibronectina, quando obtidas do timo de animais WT, mas não quando eram isoladas de animais WKO (**Figura 24B-C**).

Levando-se em consideração o índice de adesão fibronectina/BSA, que permite individualizar a adesão em fibronectina e em BSA para o mesmo animal, notamos uma redução importante da capacidade adesiva de células provindas de animais WKO em comparação às células obtidas de animais WT (**Figura 24A-D**). Saliente-se que, embora tenha sido observado um pequeno aumento no número de células precursoras de tTreg WKO aderentes à fibronectina, a razão fibronectina/BSA também mostrou uma menor capacidade adesiva dessas células em relação àquelas do grupo controle WT (**Figura 24D**). A análise do número de células tTreg e precursores com capacidade adesiva à fibronectina e que expressam os receptores de fibronectina, CD49d e CD49e, demonstrou que células tTreg CD49d<sup>hi</sup> provenientes de animais WKO apresentam diminuição da adesão à fibronectina (**Figura 25A**), em relação às células CD49d<sup>+</sup>, tTreg e precursores de animais WKO apresentaram menor adesão à fibronectina (**Figura 25B**). Ainda foi possível avaliar que as células precursoras CD49e<sup>+</sup> de animais WKO apresentam menor adesão à fibronectina (**Figura 25C**).



**Figura 24: Análise da adesão de timócitos em fibronectina.** (A) Percentual de input e índice de fibronectina/BSA em timócitos totais de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). (B) Percentual de input e índice de fibronectina/BSA em timócitos CD4 SP de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). (C) Percentual de input e índice de fibronectina/BSA de células tTreg ( $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ ) de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). (D) Percentual de input e índice de fibronectina/BSA de precusores de Treg ( $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ ) de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). Estatística: teste Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ). Os dados representam um conjunto de 4 experimentos.



**Figura 25: Análise de CD49d e CD49e em células tTreg e precursoras.** (A) Índice de fibronectina/BSA de CD49d<sup>hi</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursoras (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). (B) Índice de fibronectina/BSA de CD49d<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursoras (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). (C) Índice de fibronectina/BSA de CD49e<sup>+</sup> em células tTreg (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e precursoras (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) de animais WT e WKO após 1 h de adesão à fibronectina (n=4). Estatística: teste Mann-Whitney (\* p<0,05). Os dados representam um conjunto de 4 experimentos.

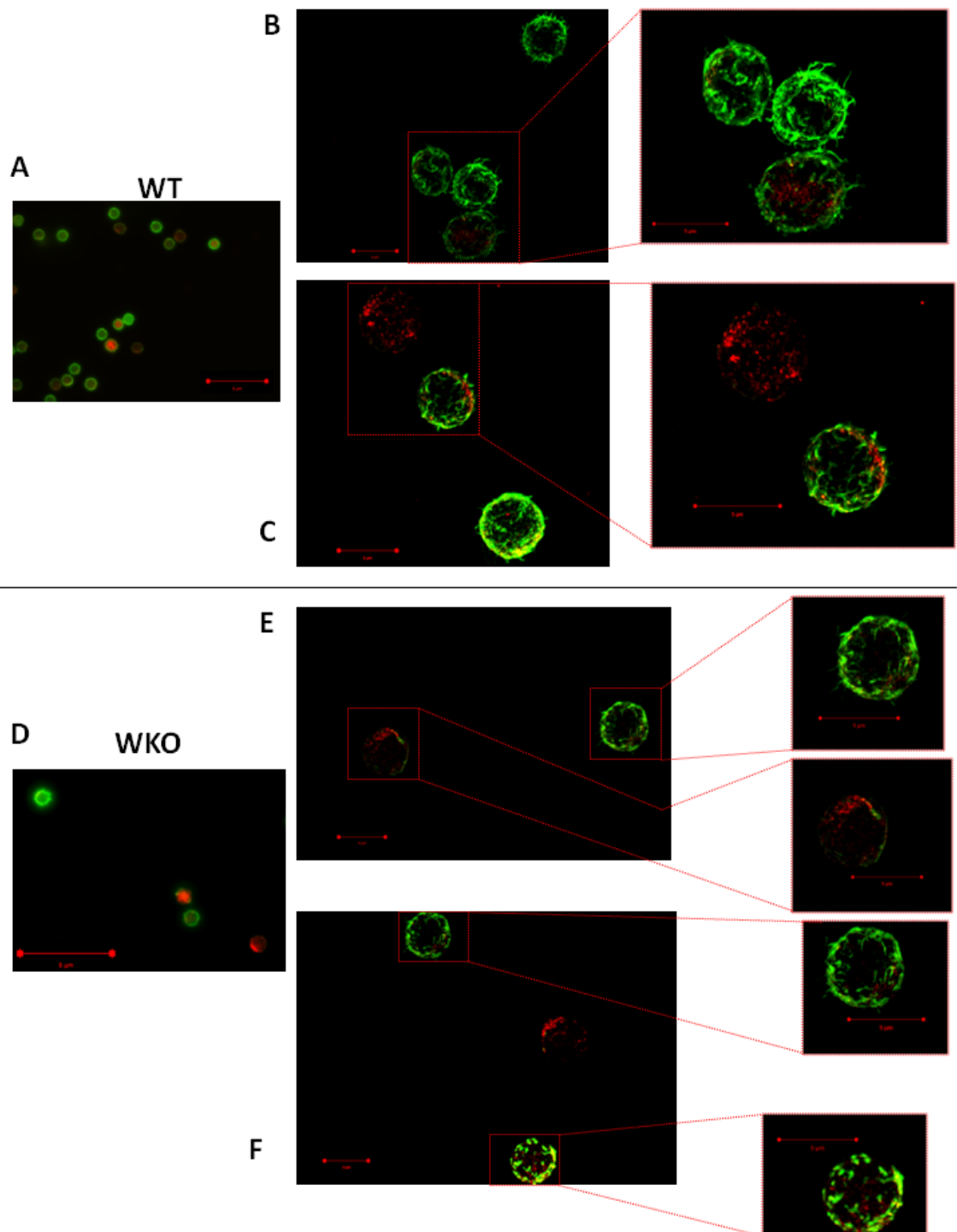
### 5.7) Células tTreg WKO aderentes à fibronectina apresentam alterações em estruturas celulares dependentes de rearranjo de citoesqueleto de actina

Tendo em vista que timócitos e células Treg de camundongos WKO apresentam deficiência no espalhamento celular *in vitro* em resposta à sinalização pelo TCR (Cotta-de-Almeida et al. 2007; Maillard et al. 2007b), decidimos investigar se células tTreg deficientes em WASP também apresentam alterações no remodelamento e polarização do citoesqueleto

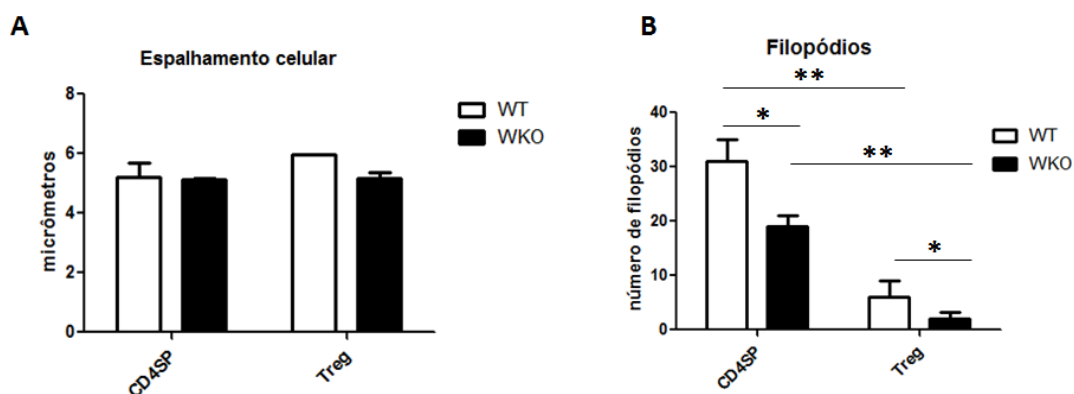
de actina após adesão à fibronectina. Para isso, utilizamos marcação de faloidina, uma molécula que, por apresentar alta afinidade aos filamentos de actina, permite analisar a formação do citoesqueleto de actina cortical e de lamelipódios e filopódios (fluorescência em verde; **Figura 26**). Análises em microscopia de fluorescência convencional mostraram uma clara estruturação da actina cortical nas células aderentes à fibronectina provenientes de ambos os grupos estudados, embora não tenham permitido distinguir com nitidez as estruturas de polarização celular, ricas em actinas, como os lamelipódios e filopódios (**Figura 26A-D**). Com isso, decidimos avaliar essas amostras em microscopia de super-resolução, de forma a buscar níveis mais detalhados de informações sobre a formação dessas estruturas após adesão à fibronectina. Essas análises demonstraram a formação de filopódios bem estruturados e em grande número nas células CD4 SP (**Figura 26B-C**). Por outro lado, podemos observar que as células tTreg (núcleo vermelho) apresentaram fraca marcação com faloidina, quando comparadas aos timócitos CD4 SP (**Figura 26B-C**). Quando analisamos células CD4 SP WKO, notamos uma clara diminuição no número de filopódios, em comparação a essa subpopulação de animais WT (**Figura 26E-F**). De forma interessante, as células tTreg de WKO apresentam clara deficiência na formação da rede de citoesqueleto cortical e de projeções membranares dependentes de rearranjo de citoesqueleto de actina, não apresentando filopódios convencionais, como aqueles observados nas células WT (**Figura 26E-F**). Nas imagens, observamos uma fraca marcação da fluorescência vermelha na superfície das células relativa ao anticorpo anti-CD4 acoplado ao fluorocromo APC-Cy7, usado no isolamento das células CD4 SP por citometria de fluxo, que foi captado pelo microscópio de super-resolução.

As análises no eixo Z em microscopia de super-resolução indicaram que as células estavam fortemente aderidas à fibronectina (dados não mostrados) e, assim, decidimos quantificar nas imagens obtidas o espalhamento celular e o número de filopódios nas células aderentes. A avaliação da medida em micrômetros do diâmetro total de timócitos CD4 SP e células tTreg, demonstrou que os espalhamentos celulares dessas subpopulações são semelhantes nos animais WT e WKO, apesar da observação de leve diminuição nas células Treg do camundongo WKO (**Figura 27A**). Em outra análise, ao avaliar os números de filopódios de três células representativas de cada tipo celular de cada animal, observamos uma clara diminuição de filopódios nas células CD4 SP e em células tTreg de animais WKO em relação às células do animal controle, além de uma diminuição significativa dessas estruturas em células tTreg em relação aos timócitos CD4 SP em ambos os grupos WT e WKO (**Figura 27B**).





**Figura 26: Interação das células T CD4 com a fibronectina.** (A) Fotomicrografia de fluorescência convencional com células CD4 SP e tTreg de animais WT. (B e C) Fotomicrografia de fluorescência de super-resolução com células CD4 SP e tTreg de animais WT com respectivos aumentos (D). Fotomicrografia de fluorescência convencional com células CD4 SP e tTreg de animais WKO. (E e F) Fotomicrografia de fluorescência de super-resolução com células CD4 SP e tTreg de animais WKO com respectivos aumentos. Em verde temos marcado a faloidina, e em vermelho o Foxp3 e as moléculas CD4.



**Figura 27: Espalhamento celular pós adesão e número de filopódios.** (A) O tamanho de cada célula foi medido no programa Zen Black da Zeiss. As células CD4 SP dos animais WT e WKO não apresentam diferença no espalhamento celular, no entanto, as células Treg dos animais WKO são menores que as células Treg do controle. (B) O número de filopódios foi contado a partir de 3 células CD4 SP e 3 células Treg de cada animal através dos diferentes níveis do eixo Z analisados no programa Zen Black (Zeiss). Estatística: teste 2-way Anova (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ).

## 6. DISCUSSÃO

As células do microambiente tímico e a ECM emitem múltiplos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos, e que são essenciais para a manutenção da população de células T circulantes. Em resposta a estes sinais, os timócitos em desenvolvimento são induzidos a proliferar e migrar através do parênquima tímico, diferenciando-se em linfócitos T maduros (Savino et al. 2004; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Durante a diferenciação e migração, os timócitos encontram vários componentes do microambiente tímico como uma rede de TECs que são diferentes no córtex e na medula, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, componentes da ECM, além de componentes solúveis como fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas. Todo esse arranjo tridimensional vai dirigindo os timócitos através do parênquima tímico levando às seleções positiva e negativa (Savino et al. 2003). Nesse contexto, as células Treg são produzidas no timo normal como uma subpopulação funcionalmente distinta de linfócitos T CD4, selecionadas durante a seleção negativa por um mecanismo chamado desvio clonal (Xing e Hogquist 2012; Ohkura et al. 2013; Schmitt e Williams 2013).

Estudos recentes apontam para a existência de importante disfunção em células Treg de pacientes com WAS e de camundongos deficientes em Wasp (Adriani et al. 2007; Humblet-baron et al. 2007b; Maillard et al. 2007a; Marangoni et al. 2007). Porém, os mecanismos responsáveis por essa diminuição ainda não estão bem estabelecidos. Por isso, esse trabalho visa ao entendimento de como a deficiência em Wasp pode causar uma deficiência numérica em tTreg e a disfunção em células Treg através da relação com a fibronectina, um componente da ECM, devido à importância, já descrita anteriormente, do microambiente e da ECM, e de fatores liberados por eles durante o desenvolvimento e maturação dos timócitos durante a migração pelo timo.

Dessa forma, a primeira parte do trabalho envolveu caracterizar a distribuição da fibronectina e das células Treg no timo dos animais WT e WKO. Nosso objetivo foi conhecer o arranjo tridimensional tímico desses animais para comparação de ambos. Como dito anteriormente, as células do microambiente tímico e a ECM expressam diversos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos em regiões anatômicas específicas do timo (Savino et al. 2004; Petrie and Zuniga, 2007; Crisa et al. 1996). Ao avaliarmos a fibronectina e as células Foxp3<sup>+</sup> em microscopia confocal com reconstituição tridimensional desse arcabouço, observamos que, além das células Treg estarem diminuídas na região medular tímica dos camundongos WKO, havia uma alteração na distribuição da rede de fibronectina

nesses animais. Essa alteração também foi observada em imagens de microscopia de fluorescência convencional. Essas imagens possibilitaram a quantificação da intensidade de fluorescência média da fibronectina no tecido. As análises dessa quantificação demonstraram uma diminuição da intensidade de fluorescência de fibronectina na região medular tímica dos animais WKO é significativa. Esse resultado nos leva a postular que a alteração de fibronectina no timo dos animais WKO esteja envolvida com alguma via ou mecanismo implicado na diminuição das células Treg nesses animais. De fato, alterações na rede de ECM no timo de animais com diferentes doenças podem levar a alterações no desenvolvimento de timócitos. Por exemplo, o timo de camundongo NOD, que desenvolve diabetes tipo 1 (DT1), apresenta a formação de espaços perivasculares gigantes com deposição de fibronectina, diminuição na expressão de VLA-5 em células Treg e uma migração fibronectina-dependente comprometida em timócitos (Cotta-de-Almeida et al. 2004; Mendes-da-Cruz et al. 2008). Nossos achados sobre a diminuição de células Treg corroboram estudos recentes, citados anteriormente, que descreveram disfunção em células Treg de pacientes com WAS e de camundongos deficientes em Wasp (Adriani et al. 2007; Humblet-Baron et al. 2007; Maillard et al. 2007; Marangoni et al. 2007). Além disso, pudemos observar nas imagens de imunofluorescência, que as células Treg dos animais controle e WKO parecem ter uma associação reduzida às fibras de fibronectina. No entanto, nos experimentos de adesão, essa redução só é proeminente nas células dos animais WKO, o que pode ser uma explicação para o defeito na geração de células Treg nesses animais, já que a ECM auxilia na migração e na exposição de fatores importantes para o desenvolvimento de timócitos. Experimentos de abordagem sobre esse postulado já estão planejados.

A constatação da alteração na distribuição de matriz no timo do animal WKO e uma concomitante diminuição das células Treg nesses animais nos levaram a questionar se a fibronectina teria um papel importante na diferenciação de células Treg e se essas células, provenientes dos camundongos WKO, poderiam ter um defeito na expressão dos receptores para fibronectina. A ECM é capaz de interagir com as células através de receptores específicos presentes na superfície celular. Esses receptores são os responsáveis por ativar diversas vias de sinalização intracelular que culminam com crescimento e diferenciação da célula, além de mediar a sobrevivência, fixação, polarização e migração da mesma (Rangarajan e Zaman 2008; Patsenker e Stickel 2011). De fato, a fibronectina é o maior componente estrutural do timo e é encontrada de forma majoritária na medula e nos septos tímicos, sugerindo um significado funcional na organização histológica córtico-medular

(Salomon et al. 1997). Em nossas análises fenotípicas de tTreg, observamos que, apesar de a percentagem e o número de timócitos CD4 SP estarem aumentados nos camundongos WKO, a percentagem de células Treg encontram-se significativamente diminuídas, conforme demonstrado previamente (Maillard et al. 2007a). Ao analisarmos os receptores de fibronectina nas células tTreg, encontramos uma diminuição das células CD49d<sup>hi</sup> em animais WKO, assim como de células CD49d<sup>+</sup>. Do mesmo modo, observamos uma diminuição no número total das células tTreg que expressam o outro receptor para fibronectina, o CD49e. Esses achados sugerem que as células tTreg nos animais WKO apresentam uma menor expressão membranar dos receptores de fibronectina, VLA-4 e VLA-5, o que pode estar relacionado com uma menor interação e sinalização frente à fibronectina, também já diminuída no tecido. Conseqüentemente, esses achados podem estar relacionados com a deficiência numérica de tTreg em camundongos WKO, levando-se em conta que a interação com a ECM possa ser um fator importante na geração de células Treg. Ainda nesse contexto, avaliamos também, o índice de expressão de CD49d e CD49e com a razão entre a percentagem de células positivas para essas moléculas em células tTreg e células T CD4 SP. Nossos dados demonstram uma significativa diminuição dessa relação, somente quando analisamos o CD49d, nos animais WKO em comparação com seus controles. Assim, eles mostram que a frequência maior de células CD49d<sup>hi</sup> e CD49d<sup>+</sup> em células tTreg comparada àquela em células T CD4 SP, visto em animais WT, está reduzida de forma importante nos camundongos WKO. Esses resultados comparativos sugerem que a subpopulação de células tTreg deficientes em Wasp está potencialmente mais prejudicada na capacidade adesiva à fibronectina em relação às células CD4 SP. Além disso, apontam para a necessidade de investigar um potencial efeito diferencial de componentes de ECM sobre as diferentes subpopulações de timócitos que poderiam interferir na diferenciação e destino funcional final. Um exemplo da importância da ECM na periferia é de que pelo menos um componente intacto de ECM, como o ácido hialurônico, pode desempenhar um papel ativo na manutenção da tolerância imunológica, promovendo a função de células tTreg com persistência do fator de transcrição Foxp3 a partir da ativação do CD44 (Bollyky et al. 2009a, 2009b).

A população CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> é definida como precursores de células Treg, (Burchill et al. 2008). Como observamos alterações para os receptores de fibronectina nas células Treg, julgamos que seria importante avaliar se os precursores já apresentavam as alterações observadas em Treg. As análises citofluorimétricas demonstraram uma redução na frequência das células precursoras nos animais WKO em relação ao WT, no entanto, a razão

entre células precursoras e células Treg apresentaram um aumento no animal WKO, o que está relacionado com uma maior redução de células Treg em animais WKO, que já foi vista. Ao avaliar a expressão dos receptores para fibronectina, observamos uma diminuição na frequência das células precursoras que expressam CD49d<sup>hi</sup> nos animais WKO, apesar disso, os números totais, e a razão com as células Treg não mostrou diferenças significativas. Do mesmo modo, as células CD49d<sup>+</sup> e CD49e<sup>+</sup> não demonstraram diferenças percentuais, numéricas ou na razão com as células Treg, entre os animais WKO e WT. Esses dados sugerem que durante o estágio de precursor as células não apresentam alterações substanciais na expressão dos receptores para fibronectina, e que, provavelmente, a diminuição dos receptores ocorre em uma etapa posterior da diferenciação das células Treg. Apesar de serem marcadores importantes para o desenvolvimento no timo, tendo expressões variadas de acordo com o estágio de maturação que o timócito se encontra (Lannes-Vieira et al. 1993; Savino et al. 1993; Gameiro et al. 2010), pouco se sabe da expressão desses receptores na doença WAS. Apesar disso, um estudo caracterizou alguns marcadores de ativação de células T de sangue periférico e de baço de pacientes com WAS. Eles observaram que há um aumento na expressão membranar de CD49d, CD49f, CD29 e CD45RO nas células T provenientes do paciente em relação as células das pessoas saudáveis (Gerwin et al. 1996). Embora este seja um resultado oposto ao que nós observamos, devemos compreender que se trata de um dado da periferia, e de que a expressão desses marcadores se dá pelo ambiente em que as células estão inseridas, sendo também, marcadores de ativação de linfócitos maduros periféricos.

A ativação do TCR e a coestimulação via CD28 são fundamentais na diferenciação intratímica de células tTreg (revisado em Hsieh et al. 2012) e, é sabido que células Treg em proliferação adquirem um fenótipo de células ativadas aumentando a expressão de moléculas como CD69 e CD44 e de outros marcadores em sua superfície (Fisson et al. 2003). Com base nisso, decidimos avaliar como as células Treg dos animais WKO se comportavam frente à estimulação do TCR (através de anticorpos estimuladores anti-CD3/anti-CD28) aliada à adesão em fibronectina avaliando a ativação, proliferação e morte. Pudemos observar que as células precursoras se encontram em estado de maior ativação e proliferação, mas não apresentam maior suscetibilidade à morte por apoptose, em comparação às células Treg, no timo de ambos os grupos de camundongos WT e WKO nos experimentos *ex vivo*. Nos experimentos de cultura para estimulação via anti-CD3/anti-CD28, bem como via adesão à fibronectina observamos, que células tTreg e seus precursores oriundos de camundongos WT são ativadas

na presença de anti-CD3/anti-CD28, mas não na presença de fibronectina, mas somente as células precursoras de camundongos WKO são ativadas pelo anti-CD3/anti-CD28.

Embora não tenhamos observado um claro efeito sinérgico ou inibidor da fibronectina sobre a estimulação do TCR em células tTreg, é importante considerar novas abordagens sobre um possível papel da ECM sobre a diferenciação/ativação dessas células em associação a outros fatores presentes no microambiente tímico. Diversos fatores, como citocinas, fatores de crescimento e hormônios, podem agir sobre as TECs e, particularmente, alterar a produção de componentes da ECM. De fato, fatores presentes no timo, como o hormônio do crescimento (GH) (revisado em Savino et al. 2015) e o TGF- $\beta$  (revisado por Jurberg et al. 2015), podem modificar a produção intratímica de ECM. Assim, sabendo-se que o TGF- $\beta$  é um dos fatores centrais de diferenciação intratímica de células Treg (Liu et al. 2008) e que associa-se a moléculas de ECM (Taipale et al. 1994), será interessante uma abordagem do papel conjunto desses componentes sobre as células Treg.

Em relação à morte celular, observamos que os diferentes estímulos não modificaram os níveis de apoptose nas células analisadas em ambos os grupos WT e WKO, mas, vale ressaltar que as células Treg apresentam níveis aumentados de apoptose com ou sem estímulos de ativação, quando comparadas com as células precursoras. Esse resultado mais uma vez sugere que a diminuição de células Treg vista em camundongos WKO não parece ser devido a um defeito até chegar no precursor, sendo provavelmente um problema que ocorre durante a diferenciação. No entanto, ainda são necessários experimentos envolvendo outras vias de morte importantes na geração de células Treg, como por exemplo, Bim (Pandiyani et al. 2007; Ouyang et al. 2010) e caspase 7 (Kubach et al. 2007).

Esses resultados nos levaram a questionar como as células Treg se comportavam na adesão frente à fibronectina. Nosso objetivo foi avaliar a adesão à ECM e o perfil fenotípico das células aderentes nos animais WKO e WT. A ativação de receptores do tipo integrina por ligação da ECM medeia a formação de adesões célula-matriz, que disparam diversas vias de sinalização. As integrinas recrutam diversas proteínas do citoesqueleto, como vinculina, talina, paxilina e caveolina-1. Essas proteínas recrutam outras proteínas que ativam GEFs (do inglês, “guanine nucleotide exchange factors”) e fosforilações subsequentes em diversas vias de sinalização (Moreno-Layseca e Streuli 2014). A via de Wasp é uma via ativada por essas GEFs e vão desencadear na polimerização de actina nas células de origem hematopoiética. Dessa forma, Wasp está associada com as integrinas e, portanto, se há um defeito em Wasp,

algumas respostas em que a integrina utilizaria a via de Wasp podem se encontrar defeituosas. Como por exemplo, os sinais desencadeados por meio do TCR induzindo a ativação de integrinas (sinalização do tipo “inside-out”), como pode ser visto na interação entre a cadeia  $\beta 2$  da integrina LFA-1 com ICAM-1 na superfície da APC, podem não ocorrer na ausência de Wasp (revisado em Cotta-de-Almeida et al. 2015). Decidimos avaliar as propriedades adesivas de células Treg e seus precursores frente à fibronectina. A análise de timócitos aderentes demonstrou que as células provenientes de animais WT aderiam significativamente à fibronectina enquanto os timócitos WKO parecem não apresentar a mesma capacidade adesiva à fibronectina. Do mesmo modo, células CD4 SP e tTreg aderentes à fibronectina obtidas do timo de animais WT apresentavam maior adesão à fibronectina do que as células provenientes de animais WKO. Ainda foi possível definir que células precursoras de tTreg WKO aderem menos que o controle. A análise dos precursores e Treg em relação aos receptores pra fibronectina demonstrou diminuição em células Treg CD49d<sup>hi</sup> e CD49d<sup>+</sup> e em células precursoras CD49d<sup>+</sup> e CD49e<sup>+</sup>. Esses resultados sugerem que as células provenientes de animais WKO apresentam menor adesão à fibronectina e que conseqüentemente as células Treg ou suas precursoras apresentam alteração na expressão membranar dos receptores de fibronectina, o que justifica a menor adesão.

Um estudo sobre a formação de podossomos demonstrou que integrinas ativadas por matriz podem formar diferentes estruturas de adesão (Yu et al. 2013). Os autores relataram que os fibroblastos desenvolvem podossomos quando espalhados sobre fluidos que contenham peptídeo RGD na superfície e que esses podossomos são protrusivos e caracterizados por anéis de RGD que cercam componentes principais, incluindo F-actina, N-WASP, e Arp2/Arp3. A formação de podossomos foi mediada pela ativação local do fosfoinositida-3-quinase (PI3K) e a produção de fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3) de um modo FAK/PYK2-dependente. Além disso, o enriquecimento de PIP3 precedeu a ativação de N-WASP e o recrutamento de RhoA (Yu et al. 2013). Nesse sentido, é interessante aprofundar se há de fato alterações na sinalização promovida pela ligação da ECM com a integrina em camundongos WKO, assim como o rearranjo de actina em células Treg na adesão à fibronectina. Os resultados das análises em microscopia de super-resolução pós-adesão possibilitou avaliar células T CD4 SP e Treg com maior nitidez e foco em maior nível de detalhamento, propiciando uma análise mais refinada do número de filopódios nas células provenientes dos animais WKO e WT. O espalhamento celular foi analisado através da medida em micrômetros do diâmetro das células, e podemos concluir que não há diferenças



entre as células T CD4 SP de WT e WKO. Do mesmo modo, o resultado do espalhamento em células Treg, apesar de sugerir uma diminuição em células provenientes do WKO, não foi significativo. Já é descrito na literatura que células T deficientes em Wasp, ao serem colocadas em contato com anti-CD3, apresentam um defeito na reorganização da polimerização da actina (Gallego et al. 1997). Contudo, não há relatos sobre alterações similares decorrentes de ativação derivada da ligação à ECM.

Nesse contexto, os nossos dados do número de filopódios demonstraram que as células CD4 SP e as células tTreg derivadas dos animais WKO apresentam um menor número de filopódios. Ainda foi possível concluir, que as células CD4 SP apresentam mais filopódios que as células Treg dentro das condições WT e WKO. Esses dados sugerem que há uma redução do rearranjo do citoesqueleto de actina nas células de origem WKO e que, mesmo em condições normais, as células Treg apresentam uma redução de filopódios em relação às células T CD4 SP e que isso se mantém nas células do WKO. Esses dados são corroborados com estudos na literatura, onde observaram que as células T derivadas do controle apresentavam a superfície celular com vários microvilos delgados e filopódios, enquanto as células provenientes dos pacientes com WAS eram desprovidas dessas estruturas ou a apresentavam de forma pequena e atenuada (Kenney et al. 1986; Molina et al. 1992). Essas alterações também acontecem em outras células hematopoiéticas. Um estudo recente em animais Wasp<sup>-/-</sup> observou que a molécula Wasp e o complexo Arp2/3 são importantes na agregação plaquetária, pois sua ausência impede a formação de estruturas relacionadas a podossomos entre as plaquetas, e que, conseqüentemente, contribui para a diátese hemorrágica vista em WAS (Poulter et al. 2015).

Modular a ECM ou seus receptores é um desafio para os pesquisadores e podem trazer técnicas inovadoras capazes de substituir tratamentos com medicamentos não específicos. Alguns testes já vão sendo feitos, como por exemplo, a utilização de um anticorpo monoclonal humanizado (natalizumab), dirigido contra a molécula VLA-4, para estudar os impactos da terapia sobre células Treg em esclerose múltipla (Stenner et al. 2008). Eles demonstraram que as células Treg dos pacientes têm menor expressão de VLA-4, e que, ao contrário de outras drogas imunomoduladoras, os efeitos terapêuticos benéficos do anticorpo monoclonal são em grande parte independentes das alterações na frequência ou função de células Treg. Nesse mesmo sentido, o CD49d pode ser utilizado como um novo biomarcador para diagnosticar pacientes com Distrofia Muscular de Duchene (DMD), prevendo a

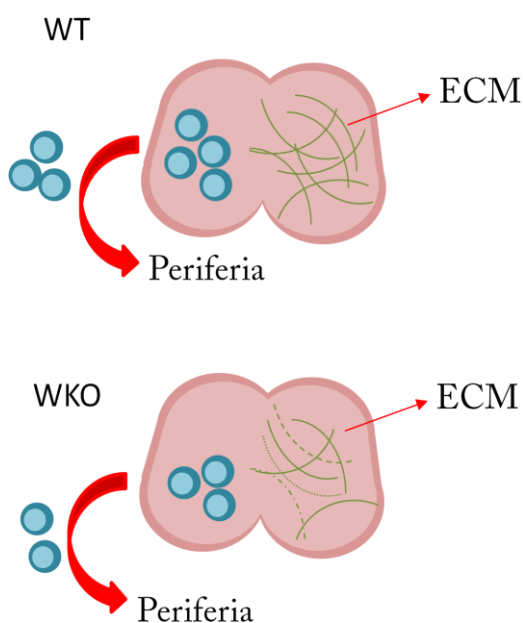
progressão da doença por ensaios clínicos e, a utilização de peptídeos anti-CD49d ou anticorpos podem ser usados como uma abordagem terapêutica para diminuir danos nos tecidos mediada por inflamação em DMD (Pinto-Mariz et al. 2015). Nesse sentido, em nosso estudo é necessário testar se a transferência de Tregs, isoladas em função do nível de expressão de receptores de ECM, resulta em melhoria dos processos patológicos em camundongos WKO, como por exemplo, melhoria na colite desenvolvida por esses animais.

Outra avaliação interessante é analisar a relação da ECM com as células Treg. Em vista disso, um estudo observou uma migração defeituosa, realizada em câmara transwell microporosa na presença de laminina e endotélio de cérebro humano, de células Tregs provenientes de pacientes com esclerose múltipla (Schneider-Hohendorf et al. 2010). Além disso, há o relato do papel de fibronectina no recrutamento de células Treg para tecido tumoral, onde bloqueio da fibronectina em modelo de glioma leva a paralização da proliferação celular pela redução da integrina  $\beta 1$  nas células tumorais e células Treg com consequente atraso na entrada de células Treg nas áreas de tumor (Sengupta et al. 2010). Todos esses dados, ainda que centrados na resposta de células Treg na periferia, demonstram um papel considerável da ECM nas patologias que envolvem ação de células Treg. No entanto, no tmo, pouco se sabe sobre o papel da matriz na geração e diferenciação das células Treg. Por isso, esse trabalho procurou entender como a deficiência em Wasp pode causar uma disfunção em células Treg através da relação com a fibronectina. Assim, ainda são necessários estudos para caracterização dos impactos da inativação de Wasp na geração de células Treg e na ECM tímica. Ainda, consideramos que a investigação da participação da sinalização desencadeada pela interação com a fibronectina na geração, migração e diferenciação de células Treg tímicas é fundamental para um melhor entendimento da WAS e dos mecanismos tímicos de maturação das células Treg.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A WAS gera diversos distúrbios no sistema imune, como a diminuição das células Treg, que pode estar envolvida no surgimento de desordens autoimunes na periferia. Entender o defeito tímico que leva à redução numérica dessas células é um passo importante para uma sobrevivência dos pacientes com a doença. Nesse contexto, o presente estudo, buscou avaliar a importância da ECM, mais precisamente a fibronectina, na geração e maturação intratímica das células Treg.

De forma geral, os resultados aqui apresentados reforçam a nossa hipótese sobre a existência de um papel da fibronectina na geração das células Treg e de um defeito na rede de fibronectina nos animais WKO que possa estar relacionado com a concomitante diminuição das células Treg (**Figura 28**).



**Figura 28: Hipótese de estudo.** O timo normal apresenta uma densa rede de ECM entremendo o órgão e direcionando, junto com o microambiente tímico, os timócitos aos diferentes estágios de maturação intratímica. Essa diferenciação altamente controlada culmina com a exportação de linfócitos T maduros para periferia. Especificamente, no caso das células tTreg, elas são selecionadas na medula e, então, estão prontas para desempenhar seu papel de regulação no sistema imune (painel superior). Em nosso modelo de estudo, a fibronectina encontra-se alterada na região medular do timo dos animais WKO e, concomitante a isso, é observada uma redução numérica e funcional das células Treg. Nossa hipótese é de que a alteração da fibronectina e de seus receptores levem à redução dos eventos adesivos das células tTreg (painel inferior), dificultando eventos de ativação e proliferação dessas células. Essas alterações em animais deficientes em Wasp podem, assim, resultar na redução de células tTreg e em consequentes eventos patológicos, como o desenvolvimento de colite.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Benoist C, Bluestone J a, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2013;14(4):307–8.
- Adriani M, Aoki J, Horai R, Thornton AM, Konno A, Kirby M, et al. Impaired in vitro regulatory T cell function associated with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol*. 2007;124(1):41–8.
- Adriani M, Jones K a., Uchiyama T, Kirby MR, Silvin C, Anderson SM, et al. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells. *Blood*. 2011;117(24):6608–11.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8).
- Aldrich R, Steinberg A, Campbell D. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*. 1954;13:133–9.
- Aschenbrenner K, D’Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, et al. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. 2007;8(4):351–8.
- Astrakhan A, Ochs HD, Rawlings DJ. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for homeostasis and function of invariant NKT cells. *J Immunol*. 2009;182(12):7370–80.
- Baecher-Allan C, Brown J a, Freeman GJ, Hafler D a. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245–53.
- Baine I, Basu S, Ames R, Sellers RS, Macian F. Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J Immunol*. 2013;190(3):1008–16.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269–80.
- Becker-Herman S, Meyer-Bahlburg A, Schwartz M a., Jackson SW, Hudkins KL, Liu C, et al. WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *J Exp Med*. 2011;208(10):2033–42.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
- Berrih S, Savino W, Cohen S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1985;33(7):655–64.
- Binks M, Jones G, Brickell P, Kinnon C, Katz D, Thrasher A. Intrinsic dendritic cell defects in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol*. 1998;28:3259–67.

- Von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: Receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol.* 2004;84(1977):201–38.
- Bollyky PL, Falk B a, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol.* 2009a;183(4):2232–41.
- Bollyky PL, Falk B a, Wu RP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2009b;86(3):567–72.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Mitri D Di, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225–33.
- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Frontline: Neuropilin-1: A surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):623–30.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild K a, Paepfer B, Clark LB, Yasayko S a, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27(1):68–73.
- Buhlmann JE, Elkin SK, Sharpe AH. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol.* 2003;170(11):5421–8.
- Burchill M a, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar M a. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;178(1):280–90.
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio C-WJ, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity.* 2008;28(1):112–21.
- Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, Thrasher AJ. Maturation of DC Is Associated with Changes in Motile Characteristics and Adherence. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004;57(2):118–32.
- Burrell B, Nakayama Y, Xu J, CC B, Bromberg J. Treg induction, migration, and function in transplantation. *J Immunol.* 2012;189(10):4705–11.
- Bystry RS, Aluvihare V, Welch K a, Kallikourdis M, Betz a G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol.* 2001;2(12):1126–32.
- Catucci M, Zanoni I, Draghici E, Bosticardo M, Castiello MC, Venturini M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in natural killer and dendritic cells affects antitumor immunity. *Eur J Immunol.* 2013;44(4):1039–45.

- Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1538–43.
- Chatila T a., Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106(12):75–81.
- Chen JC, Fong YC, Tang CH. Novel strategies for the treatment of chondrosarcomas: Targeting integrins. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
- Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* janeiro de 2007;23:463–93.
- Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol.* 1999;162(5):2546–54.
- Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000;218(2):213–34.
- Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, de Meis J, Ferreira Lima-Quaresma KR, et al. Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol.* 2003;33:2439–48.
- Cotta-de-Almeida V, DuprÃ© L, Guipouy D, Vasconcelos Z. Signal Integration during T Lymphocyte Activation and Function: Lessons from the Wiskottâ€Aldrich Syndrome. *Front Immunol.* 2015;6(February):1–11.
- Cotta-de-Almeida V, Serra Villa-Verde DM, Lepault F, Pléau JM, Dardenne M, Savino W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: A fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol.* 2004;34(6):1578–87.
- Cotta-de-Almeida V, Westerberg L, Maillard MH, Onaldi D, Wachtel H, Meelu P, et al. Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 de setembro de 2007;104(39):15424–9.
- Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell Adhesion and Migration Are Regulated at Distinct Stages of Thymic T Cell Development : The Roles of fibronectin, VLA4 and VLA5. *J Exp Med.* 1996;184:215–28.
- Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist’s view of the immune system. *Trends Immunol.* abril de 2004;25(4):210–7.
- Croft M. The TNF Family in T cell Differentiation and Function – Unanswered Questions and Future Directions. *Semin Immunol.* 2015;26(3):183–90.
- Crompton T, Moore M, MacDonald HR, Malissen B. Double-negative thymocyte subsets in CD3?? chain-deficient mice: Absence of HSA+CD44-CD25- cells. *Eur J Immunol.*

- 1994;24(8):1903–7.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942–9.
- Curotto de Lafaille M a., Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* Elsevier Inc.; 2009;30(5):626–35.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257–65.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell.* 1994;78(4):635–44.
- Devriendt K, Kim a S, Mathijs G, Frints SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001;27(3):313–7.
- Ding Y, Xu J, Bromberg J. T regulatory cell migration during an immune response. *Trends Immunol.* 2012;33(4):174–80.
- Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich ARM, Ohlen C, et al. Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* 2004;20(3):293–303.
- Dovas A, Gevrey J-C, Grossi A, Park H, Abou-Kheir W, Cox D. Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 21):3873–82.
- Drennan MB, Elewaut D, Hogquist K a. Thymic emigration: Sphingosine-1-phosphate receptor-1-dependent models and beyond. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):925–30.
- Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday a C. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity.* 1994;1(2):83–93.
- Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Regulates Lipid Raft Dynamics during Immunological Synapse Formation. *Immunity.* 2002;17(2):157.
- Edsall JT. SOME EARLY HISTORY OF COLD-INSOLUBLE GLOBULIN \*. *Ann New York Acad Sci.* 1978;1–10.
- van Ewijk W, Wang B, Hollander G, Kawamoto H, Spanopoulou E, Itoi M, et al. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol.* fevereiro de 1999;11(1):57–64.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):47–59.

- Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med*. 2005a;202(7):901–6.
- Fontenot JD, Gavin M a, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330–6.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005b;22(3):329–41.
- Francisco L, SAge P, Sharpe A. PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011;236:219–42.
- Franckaert D, Dooley J, Roos E, Floess S, Huehn J, Luche H, et al. Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3+ and Foxp3– T cells. *Immunol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2014;93(4):417–23.
- Freitas CS, Lyra JS, Dalmau SR, Savino W. In vivo and in vitro expression of tenascin by human thymic microenvironmental cells. *Dev Immunol*. 1995;4(2):139–47.
- Furtado GC, Curotto de Lafaille M a, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*. 2002;196(6):851–7.
- Gallego MD, de la Fuente M a., Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1?? *Int Immunol*. 2006;18(2):221–32.
- Gallego MD, Santamaría M, Peña J, Molina IJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood*. 1997;90(8):3089–97.
- Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr*. 1 de julho de 2010;4(3):382–90.
- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723–37.
- Gerwin N, Friedrich C, Perez-Atayde A, Rosen FS, Gutierrez-Ramos JC. Multiple antigens are altered on T and B lymphocytes from peripheral blood and spleen of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1996;106(2):208–17.
- Getnet D, Grosso J, Goldberg M, Harris T, Yen H, Bruno T, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Mol Immunol*. 2010;47(7-18):1595–600.
- Gismondi A, Cifaldi L, Mazza C, Giliani S, Parolini S, Morrone S, et al. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: Ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood*. 2004;104(2):436–43.
- Gray MJ, Wey JS, Belcheva A, McCarty MF, Trevino JG, Evans DB, et al. Neuropilin-1



- suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors. *Cancer Res.* 2005;65(9):3664–70.
- Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, et al. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2009;183(7):4360–70.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004;21(4):589–601.
- Guérin S, Mari B, Maulon L, Belhacène N, Mrguet D, Auburger P. CD10 plays a specific role in early thymic development. *FASEB J.* 1997;376–81.
- Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, et al. CD4+CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int Immunol.* 2008;20(3):307–15.
- Hall BYBM, Pearce NW, Gurley KAYE, Dorschi SE. SPECIFIC UNRESPONSIVENESS IN RATS WITH PROLONGED CARDIAC ALLOGRAFT SURVIVAL AFTER TREATMENT WITH CYCLOSPORINE III . Further Characterization of the CD4 + Suppressor Cell and its Mechanisms of Action Peripheral T cells are divided into two subpopulations ., *J Exp Med.* 1990;171(January 1990).
- Hauri-Hohl M, Zuklys S, Holländer G a, Ziegler SF. A regulatory role for TGF- $\beta$  signaling in the establishment and function of the thymic medulla. *Nat Immunol.* 2014;15(6):554–61.
- Henry L. Involution of the human thymus. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93(2):661–71.
- Hinterberger M, Aichinger M, da Costa OP, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2010;11(6):512–9.
- Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS.* 2004;112(10):629–41.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057–61.
- Horwitz D a., Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3+CD4+ CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 2008;29(9):429–35.
- Hsieh C-S, Lee H-M, Lio C-WJ. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2012;12(3):157–67.
- Humblet-baron S, Sather B, Anover S, Becker-herman S, Kasprowicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2007a;117(2):407–18.

- Humblet-baron S, Sather B, Anover S, Becker-herman S, Kasprovicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. 2007b;117(2).
- Iellem a, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2001;194(6):847–53.
- Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Gene*. 2004;103(2):456–64.
- Imai K, Nonoyama S, Ochs HD. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(6):427–36.
- Ishihara D, Dovas A, Park H, Isaac BM, Cox D. The chemotactic defect in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is due to the reduced persistence of directional protrusions. *PLoS One*. 2012;7(1):1–9.
- Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, et al. CCR7 with S1P 1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3 + regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol*. Elsevier Inc.; 2012;180(1):199–208.
- Jensen EC. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anat Rec*. 2013;296(3):378–81.
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):531–64.
- Jurberg AD, Vasconcelos-Fontes L, Cotta-de-Almeida V. A Tale from TGF- $\beta$  Superfamily for Thymus Ontogeny and Function. *Front Immunol*. 2015;6(August):1–15.
- Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M, Nishioka T, Takahashi T, Sakaguchi S, et al. Costimulation via Glucocorticoid-Induced TNF Receptor in Both Conventional and CD25+ Regulatory CD4+ T Cells. *J Immunol*. 2004;172(12):7306–14.
- Kenney D, Donnel E, Peterson J, Rosen F. Morphological abnormalities in the lymphocyte of Patients with the Wiskott-Aldrich. *Blood*. 1986;68(6):1329–32.
- Khaldoyanidi S, Denzel a, Zöller M. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol*. 1996;60(5):579–92.
- Khatttri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337–42.
- Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Hentschel J, Schnettler R, et al. mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular weight tenascin-C in different phases of human fracture healing. *Calcif Tissue Int*. 2008;83(2):101–11.
- Kim a S, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu G a, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*. 2000;404(6774):151–8.

- Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):11–6.
- Klein C, Nguyen D, Liu CH, Mizoguchi A, Bhan AK, Miki H, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: Rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood.* 2003;101(6):2159–66.
- Kleinewietfeld M, Kleinewietfeld M, Puentes F, Puentes F, Borsellino G, Borsellino G, et al. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25<sup>+</sup> T cell population. *Nat Immunol.* 2005;105(7):2877–86.
- Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2014;20(1):62–8.
- Kraft S, Klemis V, Sens C, Lenhard T, Jacobi C, Samstag Y, et al. Identification and characterization of a unique role for EDB fibronectin in phagocytosis. *J Mol Med.* 2015;
- Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Immunobiology.* 2007;110(5):1–32.
- de la Fuente M a, Sasahara Y, Calamito M, Antón IM, Elkhali A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):926–31.
- Lafouresse F, Cotta-de-Almeida V, Malet-Engra G, Galy A, Valitutti S, Dupré L. Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4<sup>+</sup> T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology.* 2012;137(2):183–96.
- Lannes-Vieira J, Chammas R, Villa-Verde DM, Vannier-dos-Santos M a, Mello-Coelho V, de Souza SJ, et al. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int Immunol.* 1993;5(11):1421–30.
- Le PT, Singer KH. Human thymic epithelial cells: adhesion molecules and cytokine production. *Int J Clin Lab Res.* 1993;23(2):56–60.
- Lee H, Hsieh C. Rare development of Foxp3<sup>+</sup> thymocytes in the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> subset. *J Immunol.* 2009;183(4):2261–6.
- Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.* 2002;196(10):1335–46.

- Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008;180(9):5916–26.
- Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell – driven B cell responses. *J Clin Invest.* 2004;114(11):1640–9.
- Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8(4):359–68.
- Liu T, Soong L, Liu G, König R, Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biol Direct.* 2009;4:40.
- Liu W. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701–11.
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(6):632–40.
- Locci M, Draghici E, Marangoni F, Bosticardo M, Catucci M, Aiuti A, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function. *J Exp Med.* 2009;206(4):735–42.
- Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz D a. Characterization of Protective Human CD4+CD25+ FOXP3+ Regulatory T Cells Generated with IL-2, TGF-?? and Retinoic Acid. *PLoS One.* 2010;5(12):1–12.
- M Y, C L, D D, JM G. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med.* 2012;190(7):995–1004.
- Mahmud S a, Manlove LS, Schmitz HM, Xing Y, Wang Y, Owen DL, et al. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2014;15(5):473–81.
- Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 19 de fevereiro de 2007a;204(2):381–91.
- Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007b;204(2):381–91.
- Mailloux AW, Young MRI. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(5):435–47.

- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med*. 2003;197(1):111–9.
- Mani M, Venkatasubrahmanyam S, Sanyal M, Levy S, Butte A, Weinberg K, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is an effector of Kit signaling. *Blood*. 2009;114(14):2900–8.
- Manilay JO, Anderson AC, Kang C, Robey E a. Impairment of thymocyte development by dominant-negative Kuzbanian (ADAM-10) is rescued by the Notch ligand, delta-1. *J Immunol*. 2005;174(11):6732–41.
- Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>FOXP3<sup>(+)</sup> natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):369–80.
- Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):144–54.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo C a., Young D a., Shevach EM, Collins M, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;16(2):311–23.
- De Meester J, Calvez R, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J Leukoc Biol*. 2010;88(5):1031–40.
- Melichar HJ, Ross JO, Taylor KT, Robey E a. Stable Interactions and Sustained TCR Signaling Characterize Thymocyte-Thymocyte Interactions that Support Negative Selection. *J Immunol*. 2014;194(3):1057–61.
- Mendes-da-Cruz D a, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*. 2008;180(7):4639–47.
- Meyer-Bahlburg A, Becker-Herman S, Humblet-Baron S, Khim S, Weber M, Bouma G, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. *Blood*. 2008;112(10):4158–69.
- Miki H, Miura K, Takenawa T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15(19):5326–35.
- Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*. 1998;391(6662):93–6.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899–911.
- Mojcik CF, Salomon DR, Chang a C, Shevach EM. Differential expression of integrins on

- human thymocyte subpopulations. *Blood*. 1995;86(11):4206–17.
- Molina IJ, Kenney DM, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med*. 1992;176(3):867–74.
- Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol*. 1993;151(8):4383–90.
- Morales-Tirado V, Sojka DK, Katzman SD, Lazarski C a., Finkelman FD, Urban JF, et al. Critical requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in Th2 effector function. *Blood*. 2010;115(17):3498–507.
- Moreno-Layseca P, Streuli CH. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol*. The Authors; 2014;34:144–53.
- Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol*. 2012;13(2):121–8.
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2014;15(12):771–85.
- Muto S, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, et al. Clinical significance of expanded Foxp3+ Helios- regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2015;47:2082–90.
- Nguyen DD, Maillard MH, Cotta-de-almeida V, Klein C, Fuss I, Nagler C, et al. Lymphocyte-dependent and TH2 cytokine-associated colitis in mice deficient in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1188–97.
- Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, Aria CD, Gandellini F, Ravelli C, et al. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia Brief report Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*. 2002;99(6):2268–9.
- Nunes-Cabaço H, Caramalho Í, Sepúlveda N, Sousa AE. Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *Eur J Immunol*. 2011;41(12):3604–14.
- Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*. 2007;179(6):3578–87.
- Ocampo JSP, de Brito JM, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol*. Elsevier Inc.; janeiro de 2008;254(1):1–9.
- Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, et al. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T

- cells. *J Immunol.* 2005;174(11):6993–7005.
- Ochs H, Slichter SJ, Harker L, Von Behrens W, Clark R, Wedgwood RJ. The Wiskott-Aldrich Syndrome: Studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood.* 1980;55(2):243–52.
- Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:725–38; quiz 739.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 21 de março de 2013;38(3):414–23.
- Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: Roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010;32(2):95–106.
- Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2003;198(2):259–66.
- Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10113–8.
- Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14151–6.
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity.* Elsevier Ltd; 2010;32(5):642–53.
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353–62.
- Park H, Dovas A, Lastrucci C, Cougoule C, Chem JB. Cell Biology: Tyrosine Phosphorylation of WASP by Hck Regulates Macrophage Function. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7897–906.
- Park JY, Kob M, Prodeus a. P, Rosen FS, Shcherbina a., Remold-O'Donnell E. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: Possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):104–10.
- Park JY, Shcherbina a., Rosen FS, Prodeus a. P, Remold-O'Donnell E. Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2005;139(2):297–305.
- Passos GA, Mendes-da-Cruz DA, Oliveira EH. The Thymic Orchestration Involving Aire, miRNAs, and Cell-Cell Interactions during the Induction of Central Tolerance. *Front*

- Immunol. 2015;6(July):1–7.
- Patsenker E, Stickel F. Role of integrins in fibrosing liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(3):G425–34.
- Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser a, Crispe IN, Shortman K. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):615–22.
- Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol.* janeiro de 2007;25:649–79.
- Piccirillo C a, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med.* 2002;196(2):237–46.
- Pinto-Mariz F, Rodrigues Carvalho L, Pruber De Queiroz Campos Araujo A, De Mello W, Gonçalves Ribeiro M, Cunha MDCSA, et al. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle. Skeletal Muscle;* 2015;5(1):45.
- Poulter NS, Pollitt AY, Davies A, Malinova D, Nash GB, Hannon MJ, et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2015;6:7254.
- Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D’Amico A, Steptoe RJ, et al. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(50):19869–74.
- Puklin-Faucher E, Sheetz MP. The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 2):179–86.
- Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol.* 2006;176(5):2808–16.
- Recher M, Burns SO, De La Fuente M a., Volpi S, Dahlberg C, Walter JE, et al. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood.* 2012;119(12):2819–28.
- Reicher B, Joseph N, David a., Pauker MH, Perl O, Barda-Saad M. Ubiquitylation-Dependent Negative Regulation of WASp Is Essential for Actin Cytoskeleton Dynamics. *Mol Cell Biol.* 2012;32(15):3153–63.
- Rengan R, Ochs HD, Sweet LI, Keil ML, Gunning WT, Lachant N a, et al. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood.*



- 2000;95(4):1283–92.
- Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer A-C, Abramson J, et al. Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue. 1<sup>o</sup> ed. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. Elsevier Inc.; 2015.
- Rosen F, Cooper M, Wedgwood R. The primary immunodeficiencies. Med Prog. 1995;333(7):431–40.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol. 2005;6(4):345–52.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995;155(3):1151–64.
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe a, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. Immunity. 2000;12(4):431–40.
- Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. Immunity. Elsevier Inc.; 2008;28(3):402–13.
- Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. J Exp Med. 2007;204(6):1335–47.
- Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz D a, et al. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? Braz J Med Biol Res. agosto de 2003;36(8):1015–25.
- Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. Proc Nutr Soc. novembro de 2010;69(4):636–43.
- Savino W, Mendes-da-Cruz D, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? Trends Immunol. junho de 2002;23(6):305–13.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Golbert DCF, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. Front Immunol. 2015a;6:1–13.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. Nat Rev Endocrinol. Nature Publishing Group; 2015b;.

- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc ...* 2004;75(June):951–61.
- Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today*. 1993;14(4):158–61.
- Schmetterer KG, Neunkirchner a., Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J*. 2012;26(6):2253–76.
- Schmitt EG, Williams CB. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Front Immunol*. janeiro de 2013;4(June):152.
- Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med*. 2004;200(4):469–79.
- Schneider M a, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(4):735–45.
- Schneider-Hohendorf T, Stenner M-P, Weidenfeller C, Zozulya AL, Simon OJ, Schwab N, et al. Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2010;40:3581–90.
- Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7):1–19.
- Seals DF, Courtneidge S a. The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 2003;17(1):7–30.
- Sengupta S, Nandi S, Hindi ES, Wainwright D a, Han Y, Lesniak MS. Short hairpin RNA-mediated fibronectin knockdown delays tumor growth in a mouse glioma model. *Neoplasia*. 2010;12(10):837–47.
- Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2009;30(5):636–45.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3(2):135–42.
- Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Lymphocyte/ECM Interact*. 1991;5:2292–9.
- Singer A, Adoro S, Park J. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4/CD8 lineage choice. *Nat Rev Immunol*. 2009;8(10):788–801.
- Snapper SB, Meelu P, Nguyen D, Stockton BM, Bozza P, Alt FW, et al. WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo Abstract : Intact cellular migration is critically im- portant for the induction and regulation of the

- im- tein ( WASP ) regulates surface receptor signaling to p. *J Leukoc Biol.* 2005;77(June):993–8.
- Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:905–29.
- Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, Cohen P, Khan W, Liu CH, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity.* 1998;9:81–91.
- Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith M a. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171(10):5042–50.
- So T, Seung-Woo L, Croft M. Immune Regulation and Control of Regulatory T cells by OX40 and 41BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:253–62.
- Soper DM, Kasprovicz DJ, Ziegler SF. IL-2R?? links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1817–26.
- Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc London.* 2001;356:609–16.
- Stenner MP, Waschbisch A, Buck D, Doerck S, Einsele H, Toyka K V., et al. Effects of natalizumab treatment on Foxp3+ T regulatory cells. *PLoS One.* 2008;3(10):1–9.
- Strom TS, Turner SJ, Andreansky S, Liu H, Doherty PC, Srivastava DK, et al. Defects in T-cell – mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector – mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells. *Blood.* 2003;102(9):3108–16.
- Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A Role for CD103 in the Retention of CD4+CD25+ Treg and Control of Leishmania major Infection. *J Immunol.* 2005;174(9):5444–55.
- Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol.* 2006;18(8):1197–209.
- Sullivan KE, Mullen C a., Blaese RM, Winkelstein J a. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125(6 I):876–85.
- Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 1994. p. 100–3.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med.* 2003;198(6):889–901.
- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of

- interleukin 2. *Nat Immunol.* 2005;6(2):152–62.
- Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):171–81.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10(12):1969–80.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192(2):303–10.
- Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, et al. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(6):1491–502.
- Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo C a, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172(11):6519–23.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *J Immunol.* 2010;184(7):3433–41.
- Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287–96.
- Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2010;10(3):182–92.
- Trifari S, Sita G, Aiuti A, Scaramuzza S, Marangoni F, Guidotti LG, et al. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol.* 2006;177(10):7451–61.
- Tuovinen H, Pekkarinen PT, Rossi LH, Mattila I, Arstila TP. The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(6):523–9.
- Verhagen J, Wraith D. Comment on “Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells”. *J Immunol.* 2010;184:3433–41.

- Villa a, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnani D, et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet.* 1995;9(4):414–7.
- Villa-Verde DMS, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol.* maio de 2002;32(5):1434–44.
- Weist BM, Kurd N, Boussier J, Chan SW, Robey E a. Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2015;(May).
- Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernández C, Thrasher AJ, Ferna C. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Immunobiology.* 2005;105(3):1144–52.
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001;27(1):18–20.
- Wu L. T lineage progenitors: The earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(2):121–6.
- Xing Y, Hogquist K a. T-Cell tolerance: Central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:1–15.
- Xu L, Kitani A, Stuelten C, McGrady G, Fuss I, Strober W. Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I. *Immunity.* Elsevier Inc.; 2010;33(3):313–25.
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16(11):1643–4656.
- Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Ogata K, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, et al. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol.* 2006;7(1):67–75.
- Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;181(12):8391–401.
- Yu CH, Rafiq N, Krishnasamy A, Hartman K, Jones G, Bershadsky A, et al. Integrin-matrix clusters form podosome-like adhesions in the absence of traction forces. *Cell Rep.* The Authors; 2013;5(5):1456–68.
- Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park B V., Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios + regulatory T cells. *PLoS One.* 2012;7(3):1–10.

- Zhang H, Schaff UY, Green CE, Chen H, Sarantos MR, Hu Y, et al. Impaired Integrin-Dependent Function in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-Deficient Murine and Human Neutrophils. *Immunity*. 2006;25(2):285–95.
- Zhang J, Shehabeldin a, da Cruz L a, Butler J, Somani a K, McGavin M, et al. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*. 1999;190(9):1329–42.
- Zhang Q, Cui F, Fang L, Hong J, Zheng B, Zhang JZ. TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol*. 2013;85–98.
- Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz D a. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*. 2007;178(4):2018–27.
- Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz D a. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol*. 2006;176(6):3321–9.
- Zicha D, Allen WE, Brickell PM, Kinnon C, Dunn G a., Jones GE, et al. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol*. 1998;101(4):659–65.
- Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-hogan M, Mottram P, et al. Bone Marrow Is a Reservoir for CD4 + CD25 + Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12 / CXCR4 Signals Bone Marrow Is a Reservoir for CD4 % CD25 % Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12 / CXCR4 Signals. *Cancer Res*. 2004;64:8451–5.

## 9. ANEXOS

### 9.1) ANEXO 1

Co-autoria em artigo publicado durante o período do mestrado.

**“A tale from TGF- $\beta$  superfamily for thymus ontogeny and function”**. Arnon Dias Jurberg, Larissa Vasconcelos-Fontes e Vinícius Cotta-de-Almeida. *Frontiers in Immunology*, 2015 (doi: 10.3389/fimmu.2015.00442).



# A tale from TGF- $\beta$ superfamily for thymus ontogeny and function

Arnon Dias Jurberg<sup>1,2\*</sup>, Larissa Vasconcelos-Fontes<sup>1</sup> and Vinicius Cotta-de-Almeida<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil,

<sup>2</sup>Graduate Program in Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Multiple signaling pathways control every aspect of cell behavior, organ formation, and tissue homeostasis throughout the lifespan of any individual. This review takes an ontogenetic view focused on the large superfamily of TGF- $\beta$ /bone morphogenetic protein ligands to address thymus morphogenesis and function in T cell differentiation. Recent findings on a role of GDF11 for reversing aging-related phenotypes are also discussed.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Geraldo Aleixo Passos,  
University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Natalio Garbi,  
University of Bonn, Germany  
Amanda Freire Assis,  
University of São Paulo, Brazil

### \*Correspondence:

Arnon Dias Jurberg and  
Vinicius Cotta-de-Almeida,  
Laboratory on Thymus Research,  
Oswaldo Cruz Foundation,  
Oswaldo Cruz Institute, Avenida  
Brasil 4365, Pavilhão Leônidas  
Deane, 5º andar – Sala 510,  
Manguinhos, Rio de Janeiro  
21040-360., Rio de Janeiro, Brazil  
ajurberg@ioc.fiocruz.br;  
ajurberg@gmail.com;  
vca@ioc.fiocruz.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Immunological Tolerance, a section of  
the journal *Frontiers in Immunology*

**Received:** 20 June 2015

**Accepted:** 14 August 2015

**Published:** 10 September 2015

### Citation:

Jurberg AD, Vasconcelos-Fontes L  
and Cotta-de-Almeida V (2015) A tale  
from TGF- $\beta$  superfamily for thymus  
ontogeny and function.  
*Front. Immunol.* 6:442.  
doi: 10.3389/fimmu.2015.00442

**Keywords:** TGF- $\beta$ , BMP, thymus, thymopoiesis, T cell development

## Introduction

The adaptive immune system evolved as a complex set of defense mechanisms amplified by the specificity properties of antigen receptor-bearing B and T lymphocytes (1). Following blood trafficking into the thymus, bone marrow-derived lymphoid progenitors become committed to T cell lineage development. Within this organ, cell specialization occurs gradually in a manner that T cell development results in the generation of conventional CD4 and CD8  $\alpha\beta$  T cells along with natural killer T cell (NKT; an innate-like T cell subpopulation), regulatory T cell (Treg), and  $\gamma\delta$  T cell subsets (2). Classically, commitment to T cell lineage was found to rely on the Delta-class Notch ligand Delta-like 4 (DLL4) and the interleukin-7 (IL-7) along with kit and flt3 ligands at stages usually prior to TCR $\beta$  chain assembling (3–6). Branching into distinct paths can be observed throughout the mainstream developmental pathway, from the double-negative (DN; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) T cell precursors to the highly expanded double-positive (DP; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) cells, and the resulting mature single-positive (SP; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> or CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) stages. Thus, at specific niches, the thymus provides to developing T cells signals that trigger a series of ordered events leading to cell proliferation, TCR gene rearrangements, and selective checkpoints along with massive cell death (7). Altogether, these events culminate in a proper repertoire of distinct and specialized mature thymocyte subpopulations able to emigrate to the periphery. In this review paper, we highlight the role of members of the large transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily (**Box 1**) during thymic ontogeny, thymic epithelial cell (TEC) differentiation and function, as well as T cell maturation. Lastly, we discuss recent information on a possible regenerative potential of TGF- $\beta$  ligands to rescue aging-related thymus atrophy.

## TGF- $\beta$ Signaling and Thymus Formation

Organogenesis relies on well-organized interactions between distinct germ layers and differentiating cell types controlled by intricate molecular hierarchies. Thymus development occurs from common parathyroid bilateral rudiments in the epithelial endodermal lining of the third pharyngeal pouch around embryonic days (E) 9.0–9.5 in mice and early week 5 in humans (**Figure 2A**) (41–44). As growth continues through E10.5 in mice and early week 6 in humans, the contact between the third pharyngeal pouch and the third pharyngeal cleft ectoderm determines paired organ primordia with



**BOX 1 | Multiple roads for signaling by TGF- $\beta$  superfamily members.**

The TGF- $\beta$  superfamily comprises TGF- $\beta$ 1–3, bone morphogenetic proteins (BMPs), growth and differentiation factors (GDFs), Nodal, activins/inhibins, Müllerian inhibiting substance (MIS)/anti-Müllerian hormone (AMH), and Lefty. These ligands were initially grouped accordingly to the functional roles observed following their original identification (8–11). As it became clear that most ligands play multiple functions depending on cell type, developmental stage, or tissue conditions, they are now classified by sequence similarity and the downstream pathway they activate (12). Each family member has an overall basic structure, in which inactive forms are produced with an N-terminal secretion peptide and a large propeptide domain known as latency-associated peptide (LAP). Cleavage of the propeptide domain by proprotein convertases releases a mature domain at the C-terminus, which eventually dimerizes (13). The propeptide domain has major regulatory roles. It influences protein stability and functions as chaperone during secretion, also mediating diffusion through interactions with the extracellular matrix and inhibiting the active peptide form even after cleavage (14–16).

Signaling by TGF- $\beta$  superfamily members occurs through a similar mechanism, but operates with distinct components. Ligands bind single-pass transmembrane receptor serine/threonine kinases, which relay the signal for intracellular effectors capable of translocating into the nucleus to modulate gene transcription (Figure 1). More specifically, these receptors are classified into two structurally similar types. Ligand binding occurs only through type II receptors, which then recruit and phosphorylate type I receptors [e.g., Ref. (17, 18)]. Type II receptors, such as ActRII (*Acvr2a*) or ActRIIB (*Acvr2b*), may take part in many distinct pathways or may be specific for a given group of ligands, such as AMHR2 (*Amhr2*) for MIS/AMH, BMPRII (*Bmpr2*) for most BMPs and Gdf9, and T $\beta$ RII (*Tgfb2*) for TGF- $\beta$ s (19, 20). Type I receptors are also known as activin receptor-like kinases (ALKs) due to their sequence similarity to activin receptors (21). These receptors are usually specific to a more restricted set of ligands. For instance, Nodal, Gdf1, Gdf11, activins, and inhibins bind ActRII to recruit Alk4 (*Acvr1b*) and Alk7 (*Acvr1c*) or they bind ActRIIB to recruit either Alk4, Alk7, or Alk5 (*Tgfb1*) (19). Together, type II and type I receptors form a heterotetrameric complex, in which the type I receptor further phosphorylates intracellular effectors of the Smad family (22). Depending on the ligand/receptor complex they are responding to, receptor-activated Smads (R-Smads) can be subdivided into two groups: a BMP-related set gathers Smad1, Smad5, and Smad9 (formerly Smad8), whereas Smad2 and Smad3 are responsive to TGF- $\beta$ -related signals (Figure 1). An N-terminal MH1 domain negatively regulates the MH2 domain, being indispensable for Smad translocation into the nucleus and DNA binding (23–25). However, these functional properties do not hold true for all R-Smads. In particular, Smad2 seems to interact to DNA only indirectly (24).

A common mediator Smad (co-Smad), or Smad4, integrates signals from both branches by associating with the R-Smads (Figure 1). They form transcriptional complexes able to translocate into the nucleus (26–28). Nuclear transportation of Smads depends on accessory proteins, particularly importins, exportins, and nucleoporins (29, 30). The presence of DNA molecules harboring Smad-binding elements favors heterodimerization between R-Smads and co-Smad (28). They ultimately associate with cell-type-specific transcription factors and co-activators to regulate a plethora of target genes (31).

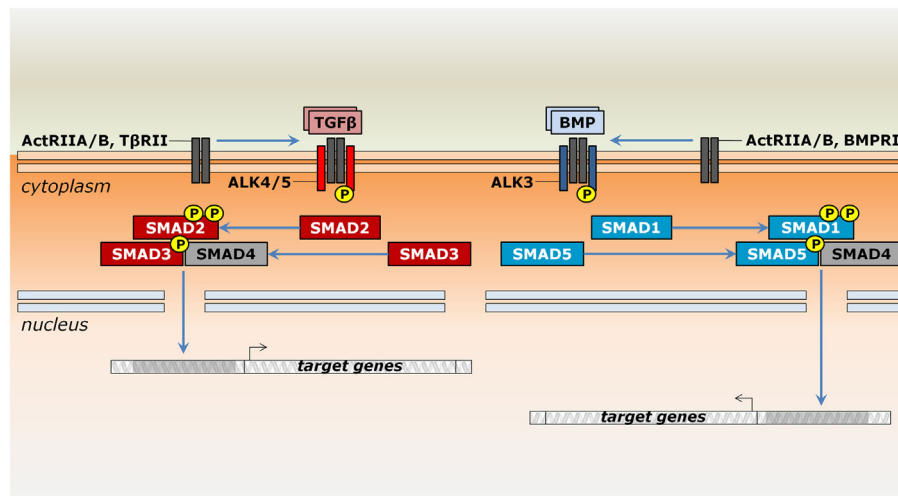
Regulation of Smad activity occurs through multiple mechanisms (32). Two inhibitory Smads (I-Smads) impair signaling by competing with R-Smads for receptors or by co-Smad interaction (33). For instance, Smad6 forms stable interactions with type I receptors, blocking phosphorylation of Smad2 and Smad1, but not Smad3 (34, 35). Similarly, Smad7, the other I-Smad member, also binds type I receptors and suppresses further phosphorylation by targeting them for proteasome-dependent degradation (35, 36). The available literature on the molecular interactions of TGF- $\beta$  superfamily members is vast, but not in the scope of this review. Further information can be found elsewhere (33, 37–40).

stratified epithelium and a central lumen lined by precursors of medullary thymic epithelial cells (mTECs). These cells are characterized by the expression of both claudin-3/4 and cytokeratin-5 (K5) (46, 47). Further development of thymic medulla also

depends on the successful establishment of the cortical region, as observed in mice with arrested T cell development (48). Within each primordium, a dorso-rostralmost domain expressing *Gcm2* gives rise to a parathyroid gland from E9.5 in mice or as early as the onset of week 6 in humans, whereas a ventro-caudalmost domain identified by *Foxn1* expression produces a thymic lobe from E11.25 in mice or mid-week 6 in humans (Figure 2B) (44, 49–52). Epithelial cell proliferation fills the pharyngeal pouch lumen by forming cord-like structures with smaller lumina, similar to branching morphogenetic events in other organs (Figure 2C) (47). In this context, activation of *Foxn1* blocks the respiratory development (53) and, along with subsequent colonization by lymphocyte precursors, seems to be responsible to produce a concentric medulla less densely cellular than the surrounding cortex (47). Fetal liver-derived lymphocyte progenitors colonize the embryonic thymus from E11.5 in mice and week 8 in humans (54, 55), whereas short-term apoptotic events around E12.0 disconnect the developing anlagen from the embryonic pharynx (41). The rudiments migrate downwards at different paces, gradually resolving the *Gcm2*- and *Foxn1*-restricted domains into two morphologically distinct structures enclosed by neural crest-derived mesenchyme (Figures 2C–F) (51, 56). Parathyroid primordia usually lag behind and move toward the tracheal region dorsally to the thyroid gland, whereas thymic rudiments move ventrally and more caudally into the thoracic cavity (Figures 2D,E). The thymic primordia ultimately fuse at the midline to produce a bi-lobed organ above the developing heart (Figure 2F). Unlike mice, humans exhibit superior parathyroid glands derived from the fourth pharyngeal pouch (Figure 2) (43), whereas organogenesis of the human thymus is essentially similar to mice both morphologically and molecularly (44). Each of these morphogenetic events during thymus organogenesis is controlled by a multitude of signals, including members of the TGF- $\beta$  superfamily.

### Thymus Specification and Thymic Epithelial Cell Differentiation

Early production of *Bmp4* by the endoderm, the surrounding neural crest-derived mesenchyme, and the overlying ectoderm of the third pharyngeal arch and cleft raised the possibility that bone morphogenetic protein (BMP) signals may trigger thymus and parathyroid formation (57). However, conditional inactivation of *Bmp4* in both pharyngeal endoderm and mesenchyme using a *Foxg1-Cre* line had no effect in organ induction, but resulted in abnormal morphogenesis (see below) (58). This could be the result of a short-time window of 24 h necessary to establish the prospective thymic and parathyroid domains as observed in chicken embryos (59). Indeed, Patel et al. have observed using a *Bmp4<sup>lacZ</sup>*-reporter line that the onset of *Bmp4* production occurred at E9.5 in the ventral pharynx close to the third pouch entrance, but not in the pouch endoderm or mesenchyme proper (57). Expression in these tissues was later achieved and expanded to the overlying ectoderm (57). The realization that endoderm patterning occurs before primitive gut and pharyngeal pouch formation still hampers the identification of signals responsible for thymus specification *in vivo* and other members of the TGF- $\beta$  superfamily may also be at play (60). Particularly, activin A is



**FIGURE 1 | Signaling by ligands of the TGF- $\beta$  superfamily in the thymus.**

Members of the TGF- $\beta$  superfamily may signal by either the TGF- $\beta$  (reddish) or the BMP branch (bluish). Upon binding to type II serine/threonine receptors occurs the recruitment of type I receptors, which further phosphorylate Smad proteins. Whereas ActRIIA and ActRIIB may be shared between both pathways, T $\beta$ RII and BMPRII are specific to TGF- $\beta$  and BMP signaling,

respectively. In general, Smad2 and Smad3 relay signals from the Alk4, Alk5, and Alk7 receptors, while Smad1, Smad5, and Smad8/9 are phosphorylated by Alk2, Alk3, and Alk6 receptors. However, Alk2, Alk6, and Alk7 are not expressed during thymocyte maturation. Modulation of gene expression occurs after Smad complex translocates into the nucleus and depends on the interaction with additional protein complexes (not shown).

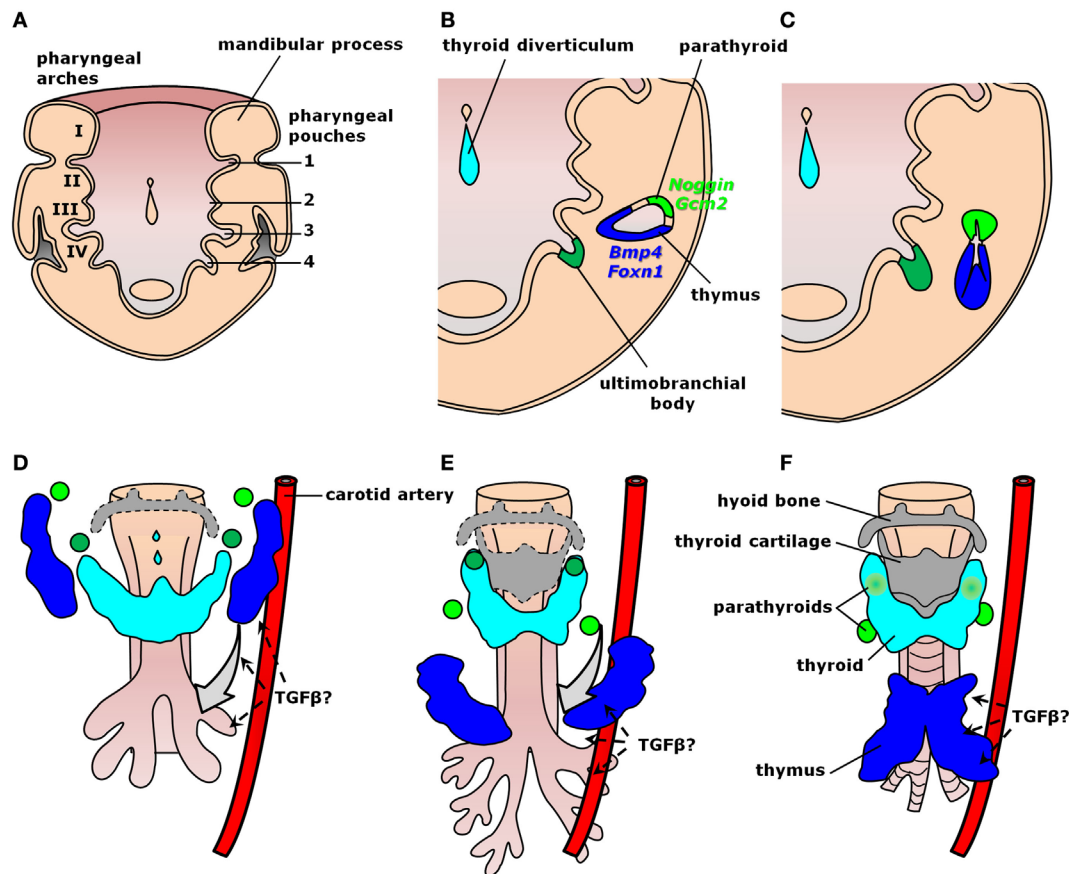
required to induce definitive endoderm prior to the differentiation of third pharyngeal pouch endoderm *in vitro* (61). Since gene targeting of some superfamily ligands or their receptors results in embryonic lethality (62–64), new conditional mutants should be produced taking into consideration that gene deletion may have to occur earlier and at different embryonic compartments than previously thought.

The possibility that thymus induction depends on synergistic effects of TGF- $\beta$  superfamily ligands with non-superfamily signals is a likely case (59). Endoderm-derived undifferentiated epithelial cells comprise a homogeneous population phenotypically defined as cytokeratin (K)5<sup>+</sup>K8<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>MTS24<sup>+</sup> in the thymic primordium of mouse embryos at E12.0 (65). When a single progenitor cell labeled with enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) was microinjected into an unlabeled syngeneic thymus rudiment with the same age, and transplanted under the kidney capsule, both cortical and medullary portions showed scattered eYFP<sup>+</sup> TECs also positive for region-specific markers after 4 weeks, revealing that common bipotent progenitors are able to produce both epithelial lineages during embryogenesis (65). Recently, thymic epithelial progenitor cells (TEPCs) bearing stem-cell features were also identified in the thymus of adult mice as a MHCII<sup>low</sup> $\alpha$ 6 integrin<sup>high</sup>Sca-1<sup>high</sup> subset (66). They mature in a highly complex stepwise process not fully understood, ultimately producing cortical TECs (cTECs) or mTECs (67).

Cortical TECs are sparsely distributed and may be identified as CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>Ly51(CD249)<sup>+</sup>*Ulex europaeus* lectin 1 (UEA-1)-K5<sup>-</sup>K8<sup>+</sup> cells with high levels of both MHC II and the proteasome subunit  $\beta$ 5t (68–71). Considering the TGF- $\beta$ -related pathways, cells from neonatal mice express both the *Acvr2a* (ActRII) and *Acvr2b* (ActRIIB) genes for the common receptors, in addition to *Acvr1* (Alk2), *Bmpr1a* (Alk3), and *Bmpr2* (BMPRII)

for the BMP-specific receptors, and the TGF- $\beta$ -specific type I receptors, Alk4 (*Acvr1b*) and Alk5 (*Tgfb1*), and type II receptor T $\beta$ RII (*Tgfb2*) (71, 72). This set of receptor genes allows cTEC to respond to both signaling branches of the TGF- $\beta$  superfamily, even though the BMP receptor, *Bmpr1b* (Alk6), and the TGF- $\beta$  receptor, *Acvr1c* (Alk7), are not present. Yet, expression of subunit genes *Inha* and *Inhbb* for inhibins and activins, *Bmp2* and *Bmp4*, and *Tgfb1* and *Tgfb3* makes possible the existence of an autocrine circuitry for thymic homeostasis, and indicate that these factors might influence early thymopoiesis (71, 72).

In the thymic medulla, mTECs are characterized by a CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup>K5<sup>+</sup>K8<sup>-</sup> phenotype with variable levels of UEA-1, MHCII, CD80, and Aire (67). These distinct expression profiles seem to take part in the differentiation program in which MHCII<sup>high</sup>CD80<sup>high</sup> mature mTECs expressing Aire are responsible for the production of numerous peripheral self-antigens in the thymus, a critical event for central tolerance (67, 73–77). Hence, SP cells that strongly interact with self peptides through MHC molecules (pMHC) arrest migration, exhibit sustained TCR activation, persistent high levels of cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and early caspase activation, leading to macrophage-dependent phagocytosis (78, 79). Surprisingly, thymocyte apoptosis triggers the production of all three TGF- $\beta$  ligands by dendritic cells (DC), macrophages, and TECs in the medullary region of neonate or adult thymuses, a phenotype that was partially impaired in *Bim* mutants (80). In addition, apoptosis-driven production of TGF- $\beta$  signals resulted in an increased generation of thymic regulatory T (tTreg) cells (see below) (80). Interestingly, mTECs are the cell type in the thymus that express most ligand genes of the TGF- $\beta$  superfamily and their cognate receptors – *Inha* and *Inhbb*, *Bmp2*, *Bmp3*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Bmp6*, and *Gdf6/Bmp13*, *Gdf3*, *Gdf6/Bmp13*, *Gdf8/myostatin*, *Gdf10*, *Gdf11*, and *Gdf15*, *Lefty1* and *Lefty2*,



**FIGURE 2 | Signaling by TGF- $\beta$  superfamily members during thymus organogenesis.** Schematic representation of thymus formation at different stages of development. **(A–C)** Thymus specification viewed dorsally at the ventral half of the pharyngeal region. **(A)** The common parathyroid–thymus primordium arises from the third pharyngeal pouch endoderm. **(B)** Within each anlage, mTEC precursors line a central lumen surrounded by a dorso-rostralmost domain expressing the BMP-antagonist *Noggin* and the parathyroid specific gene *Gcm2* (light green), whereas the ventro-caudalmost domain expresses *Bmp4* and the thymus-specific gene *Foxn1* (blue). **(C)** Each primordium grows in size while proliferating cells fill the rudiment lumen, later

colonized by lymphocyte precursors to produce an inner medulla. **(D–F)** Thymus migration toward the heart. The inferior parathyroid (light green) and the thymus (blue) primordia are gradually resolved as they migrate downwards. **(D)** TGF- $\beta$  cues from the endothelium of pharyngeal blood vessels (e.g., carotid arteries) seem to orient thymic and parathyroid migration toward their final location. **(E)** The third pharyngeal pouch-derived thymic and the inferior parathyroid rudiments pass by the primordia of the superior parathyroid (dark green), which migrate only a short distance downward the tracheal region. **(F)** Fusion of the thymic primordia occurs at the midline just above the developing heart (not shown) [modified from Ref. (45)].

*Tgfb1*, *Tgfb2*, and *Tgfb3* along with *Acvr2a* (ActRII), and *Acvr2b* (ActRIIB), *Acvr1* (Alk2), *Bmpr1a* (Alk3), and *Bmpr2* (BMPRII) for BMP/growth and differentiation factor (GDF) signaling, and *Acvr1b* (Alk4) and *Tgfr1* (Alk5) for the TGF- $\beta$ /Activin/Nodal pathway, in addition to the type III receptor gene *Tdfr1* (Cripto) (71, 72, 81, 82).

The possibility that members of the TGF- $\beta$  superfamily produced by mTECs may influence T cell differentiation or impact thymus physiology cannot be ruled out and remains to be thoroughly investigated. For instance, despite the previously identified BMP ligands in mTECs – *Bmp3*/osteogenin, *Bmp5*, *Bmp6*, and *Bmp13* – there is no available functional information regarding their activities in the thymus to our knowledge. It is known, on the other hand, that *Bmp6* exerts an antiproliferative effect in peripheral CD19<sup>+</sup> B cells and induces apoptosis in CD27<sup>+</sup> memory B cells (83). By contrast, *Tgfr2* deficiency in

differentiating T cells increased apoptosis of TCR $\beta^{\text{high}}$ CD4<sup>+</sup> and TCR $\beta^{\text{high}}$ CD8<sup>+</sup> mature SP cells after anti-CD3 treatment or of TCR $\beta^{\text{high}}$ OT-II T cells after antigen-dependent stimulation, thus revealing that TGF- $\beta$  signals might be involved in thymocyte-negative selection (84). Interestingly, loss of *Tgfr2* in TECs using a *Foxn1-Cre* mouse line resulted in an expansion of the mTEC compartment – especially MHCII<sup>high</sup> cells – without affecting cTEC cellularity and the morphology of the corticomedullary junction (85). Indeed, other lymphocyte-derived signals than TGF- $\beta$  ligands are known to influence mTEC maturation, a phenomenon that is largely known as “thymic cross-talk” (86).

Signaling by TGF- $\beta$  superfamily members appears to play a secondary role in regulating a master regulator of thymus development and function. Inactivation of the transcription factor *Foxn1* results in an athymic phenotype despite the formation of an epithelial anlagen during embryogenesis (49, 87). Expression

of *Foxn1* in thymic primordia is anticipated by the production of *Bmp4* and *Wnt4* in the epithelium and the adjacent mesenchyme of the third pharyngeal pouch from E10.5 in mice and from mid-week 6 in human embryos (23, 57, 88). Accordingly, *in vitro* treatment of fetal thymic organ culture (FTOC) with BMP4 or overexpression of *Wnt4* in a TEC cell line upregulated the expression of *Foxn1* (88, 89). However, conditional inactivation of *Bmp4* in the pharyngeal endoderm and mesenchyme did not affect *Foxn1* expression (58), similarly to transgenic embryos expressing the BMP-antagonist *Noggin* in TECs (90). In turn, information on blockage of *Wnt4* and its effect over the expression of *Foxn1* is limited. In particular, Talaber et al. have shown that a single administration of dexamethasone caused the reduction of both *Wnt4* and *Foxn1* levels (91). Interestingly, conditional deletion of  $\beta$ -catenin in mTECs using a *BK5-CreER<sup>T</sup>* line resulted in *Foxn1* downregulation (92). Altogether, the available evidence suggests that induction or maintenance of such an essential transcription factor in the thymic epithelia relies on an intricate molecular hierarchy with a key participation for BMP and WNT signals, which may provide some kind of redundancy for TEC differentiation and function.

With a great potential for translational medicine, differentiation of TEPCs from mouse or human embryonic stem cells (ESCs) can be achieved under culture conditions by the addition of selected growth factors, including TGF- $\beta$  superfamily ligands. For instance, Lai and Jin have initially reported that incubation with *Fgf7*, *Bmp4*, *Egf*, and *Fgf10* produced  $K5^+K8^+EpCAM^+$  cells from mouse ESCs (93). These cells were able to further differentiate into medullary  $K5^+K8^-$  and cortical  $K5^-K8^+$  TECs when transplanted with  $CD4^-CD8^-CD45^+$  thymocytes under the kidney capsule and sustain normal T cell maturation (93). In humans, an Activin A-dependent inductive stepwise process first differentiates ESCs into definitive endoderm (94), and later into *SOX2+FOXA2+CDX2-* anterior foregut endodermal cells by the concurrent inhibition of BMP and Activin/TGF- $\beta$  signaling using *Noggin* and the type I receptor-specific inhibitor SB-431542, respectively (95). Further development into TEPC may be achieved by relatively similar approaches, generally modulating retinoic acid, canonical Wnt, and BMP level (61, 96).

### Thymus Colonization by Lymphoid Precursors

Colonization of the thymic primordia occurs through intermittent cell flow based on chemokine-dependent mechanisms (55, 97–100). It begins discretely prior to organ vascularization with T cell-restricted progenitors that are unable to definitely populate the thymus (55, 97). Cell influx is transiently interrupted during thymus migration to the thoracic cavity (42). Then, a second wave of cell colonization brings multipotent T cell- and NK-cell progenitors before birth (55). The most significant chemokines currently identified for attracting early T lineage progenitors (ETPs) to the developing avascularized thymus are CCL25 and CCL21 (98). Curiously, whereas CCL25 is produced by both *Foxn1*-positive TECs and the adjacent parathyroid primordium, CCL21 is expressed only by *Gcm2*-positive cells (99, 101). These ligands signal, respectively, through the CCR9 and CCR7 receptors present in  $CD45^+$  ETPs (102–105). However, it is still poorly defined whether members

of the TGF- $\beta$  superfamily directly or indirectly influence or are modulated by these chemokines during thymus colonization. In particular, Gordon et al. observed delayed ETP homing into *Bmp4*-deficient thymic primordia at E11.5, but no significant differences in CCL25 expression in relation to wild-type thymus (58). The relationship with CCL21, other chemokines and their cognate receptors in the embryonic thymus, if present, remains to be determined. Of note, many pathological conditions and morphogenetic events show participation of TGF- $\beta$ s, BMPs/GDFs, and activins/inhibins in the modulation of chemokine production and *vice versa* (106–113).

Interaction of immigrating lymphocyte progenitors with the thymic stroma is critical for adult thymus organization, but not for TEC differentiation during embryonic development. Using *CD3e* transgenic mouse embryos, known to exhibit arrested T cell maturation at the triple negative (TN)  $CD3^-CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$  ETP stage (114, 115), Jenkinson et al. have shown that  $K5^+K8^+$  bipotent TEPCs normally differentiate into functional  $K5^+K8^-$  medullary and  $K5^-K8^+$  cortical TECs, although adult thymus in these transgenic animals exhibit persistent flat organization with morphologically abnormal cortex (115, 116). In particular, transfer of normal bone marrow cells into *RAG2<sup>-/-</sup>*; *tge26* chimeric mice, in which bone marrow cells from mice mutant for the recombination activating gene 2 (*RAG2*) were previously transplanted into newborn *tge26* mice, rescued thymic organization and cellularity in the adult (48).

### Thymus Migration

The subsequent migration of the thymus into the thoracic cavity also relies on signaling by members of the TGF- $\beta$  superfamily and depends on neural crest cells. Despite a minor contribution in thymus cellularity, forced production of the BMP-antagonist *Noggin* in the caudal hindbrain prior to neural crest migration using *B2-NC:Noggin* transgenic mice culminated in thymic hypoplasia or aplasia later in development (117). Indeed, *Bmp2* induces *Cdc42*-dependent actin cytoskeleton reorganization and filopodia formation in neural crest cells, consequently affecting their subsequent migration (118). Moreover, conditional loss of *Bmp4* in mice expressing *Foxg1-Cre* impaired the separation between correctly patterned parathyroid and thymus, which also exhibited a partially compromised capsule (58). Yet, based on observations performed for thyroid migration (119), Gordon and Manley have proposed that the downward migration of the thymus may be driven by signals from the pharyngeal blood vessels, more specifically the carotid arteries (**Figures 2D–F**) (42). Remarkably, mouse embryos with cardiac neural crest cells deficient for the type I receptor *Alk5* (*Tgfb1*) show defective cardiac outflow development, with atypical branching of carotid arteries and failed migration of still connected parathyroid and capsule-encased thymus (120). This raises the possibility that the directional cue for thymus migration might be *Alk5* ligand (e.g., TGF- $\beta$ 1–3 or *Gdf11*), possibly secreted or released through the endothelium (**Figures 2D–F**). By contrast, conditional inactivation of *Tgfb2* in TECs by a *Foxn1-Cre* mouse line does not affect thymus final positioning (121). Although producing distinct phenotypes, each signaling branch by members of the TGF- $\beta$  superfamily is involved in the downward migration of thymic

primordia and reveals a critical, but still poorly understood role for the neural crest-derived capsule during thymus organogenesis. Neural crest cells may also differentiate into endothelial cells, pericytes, and smooth muscle cells, and were found to persist in adult mice up to the onset of thymus involution (122).

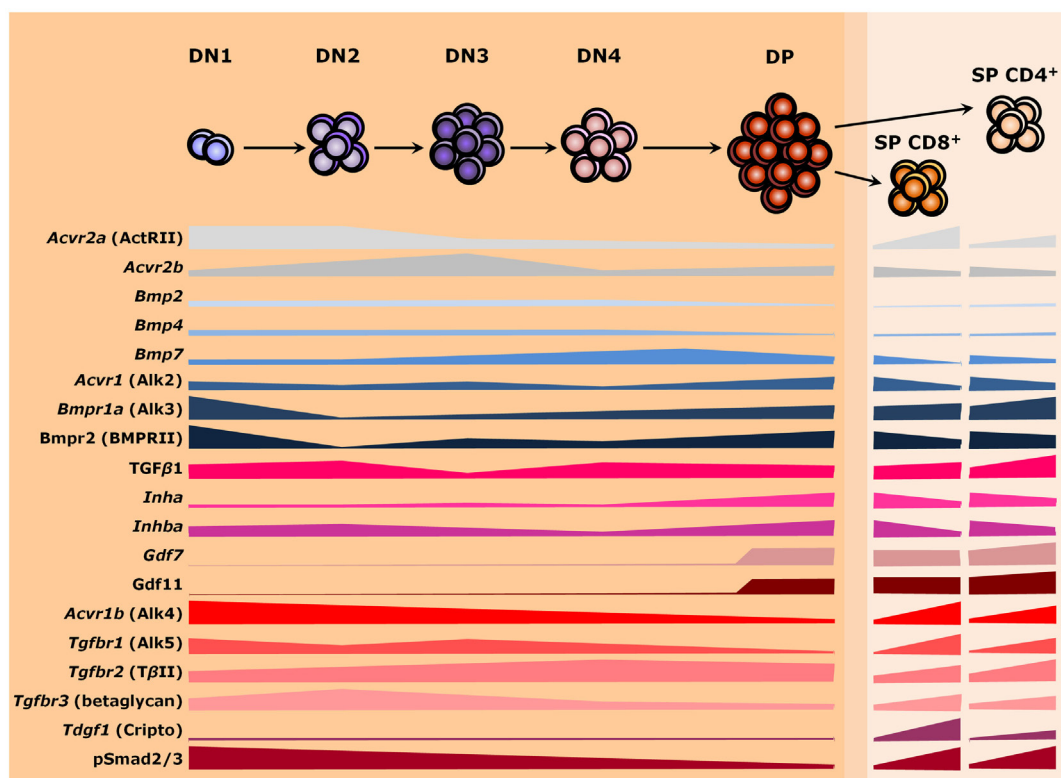
## Thymus Organization and Maturation of T Cells Under TGF- $\beta$ Superfamily Signals

The adult thymus exhibits two gross anatomical regions easily identified by their histological staining patterns. The peripheral cortex harbors more immature and mostly small thymocytes, and is darker-stained due to a higher cell density. A corticomedullary junction supplied by numerous septal blood vessels makes the transition between the cortex and the central medulla. This latter region is paler due to cell size and a lower T cell density (123–125). A capsule of connective tissue encases the organ. It consists of an outer layer rich in type I collagen and an inner layer of reticular fibers containing type III collagen, and projects type I collagen-containing septa into the parenchyma, partially subdividing the thymus into smaller lobules (126).

Signals from members of the TGF- $\beta$  superfamily have a major influence on T cell differentiation and thymus homeostasis. As secreted molecules, they may be locally produced by thymic

stromal cells and act over developing T cells as paracrine factors or be produced by the thymocytes themselves and work autocrinely. Alternatively, factors from the developing T cells may similarly operate over stromal cells to support thymus homeostasis. However, thymocytes do not express most members of the TGF- $\beta$  superfamily and the ones present vary in expression as cells differentiate (Figure 3). Similar changes are also found for receptor genes (127). Such differences in gene expression occur during T cell maturation, but also when comparing the same stage from fetal and adult thymuses (127–131). Nevertheless, provision of soluble growth factors seems to rely mostly to stromal cells, particularly TECs (71, 127). It is still possible that members of the TGF- $\beta$  superfamily also act over large distances, being produced by other organs and reaching the thymus through the circulatory system (132). The importance of endocrine stimuli for intrathymic T cell maturation has been largely investigated (133), but whether a given TGF- $\beta$  ligand exerts long-range effects over thymopoiesis remains to be properly addressed.

Changes in phosphorylation levels of Smad2/3 (pSmad2/3) and Smad1/5/8 (pSmad1/5/8), respectively, used as read-outs for the activities of TGF- $\beta$ /Activin/Nodal and BMP/GDF signaling, follow differences in the expression of respective cognate receptors as thymocytes mature (134, 135). Thymocytes differentiate in a stepwise process that involves the somatic rearrangement



**FIGURE 3 | TGF- $\beta$  superfamily during thymopoiesis.** Levels of selected ligands, receptors, and Smad intracellular effectors during the differentiation of  $\alpha\beta$  T lymphocytes. Common receptors between the TGF- $\beta$  and the BMP branches are colored in shades of gray, whereas components of the BMP and the TGF- $\beta$  pathways are colored in shades of blue and red, respectively. The

darker orange region of the scheme represents the thymic cortex, whereas light orange represents the thymic medulla. A thin corticomedullary region is represented in between the cortex and medulla. Omitted components are either not present during thymocyte maturation or no information is available at present. DN, double-negative; DP, double-positive; SP, single-positive.

of T cell receptor (TCR) genes while migrating in close contact with stromal cells and the extracellular matrix (ECM) throughout thymic compartments (136, 137). In this process, a major group of  $\alpha\beta$  TCR-bearing T cells are produced, which ultimately function by recognizing peptide antigens presented by class I or class II major histocompatibility complexes (MHC I or MHC II, respectively) on the surface of host cells (138). Alternatively, a distinct lineage of T cells bearing  $\gamma\delta$  TCR chains develop, which recognize a quite unique group of molecules (139). Noteworthy, intrathymic lineage restriction and cell fate are determined not only by the type of TCR and its avidity for self-antigens but also by the acquisition of co-receptors that relay signals to intracellular effectors during T cell activation. Hence, generation of distinct cell types are tightly controlled as thymocyte progresses through thymic niches (7). Herein, we will point out some key aspects of the expression and influence of TGF- $\beta$  superfamily signaling molecules on the distinct paths of thymocyte development: from CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN T cell precursors (further subdivided in DN1 to DN4 stages based on the surface expression of CD44 and CD25) to the highly expanded immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP cells, and upon the mature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> or CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> SP cells.

### DN1 to DN2 Cells

Entry of bone marrow-derived Lin<sup>-</sup>cKit<sup>high</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells, or ETPs, into the thymus occurs through the corticomedullary junction. In this intermediate region, these immature cells with T cell–B cell–myeloid potential come into contact with K5<sup>+</sup>K8<sup>+</sup> bipotent TEPCs and mature T cells (67, 124, 140). They subsequently move into the thymus cortex toward the subcapsular zone as DN cells, as defined by the lack of CD4 and CD8 co-receptors (7, 141). In the cortex, developing thymocytes then upregulate CD25 – the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor – to become CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> DN2 cells, which undergo D $\beta$  to J $\beta$  recombination of the  $\beta$ -chain locus (142, 143). This DN1 to DN2 transition is accompanied by a strong downregulation of *Bmpr1a* (Alk3) and *Bmpr2* (BMPRII) expression (127, 129). Most cells at this stage present high levels of pSmad2 along with Alk4 (*Acvr1b*) and ActRII (*Acvr2a*) on their cell surface, although a few cells also exhibit Alk5 (*Tgfb1*) and T $\beta$ RII (*Tgfb2*) receptors (134). DN cells also express the type III co-receptor betaglycan/T $\beta$ RIII (*Tgfb3*), with highest levels at DN3 cells (144). Betaglycan seems to increase the binding strength of some ligands with their cognate receptors, therefore potentializing their effects (145–147). Thymocytes express no *Bmpr1b* (Alk6), *Acvr1* (Alk2), and *Acvr1c* (Alk7) during thymopoiesis (127, 129). Yet, high levels of inhibin  $\beta$ A subunit (*Inhba*) and TGF- $\beta$ 1 (*Tgfb1*) contrast with reduced levels of the inhibin  $\alpha$  subunit (*Inha*), Bmp2, Bmp4, and Bmp7 at the DN2 stage (81, 82, 127, 130). When *Inha* mutants were used for E14.0 FTOC, a partial arrest at the DN2 stage impaired further T cell maturation (148). Likewise, antibody-dependent blocking of betaglycan in E14.0 FTOC resulted in a reduction of both DN2 and DP cells (144). By contrast, addition of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 in E14.0 FTOC strongly inhibited T cell development by mainly impairing the differentiation of DN1 cells into DN2 (149). A slightly less strong impact after BMP4 treatment of E15.0–E15.5 FTOC or suspension cultures of fetal thymocytes resulted in cell cycle arrest at the DN1 stage without induction of apoptosis (89, 150). The

use of BMP4-treated chimeric human–mouse FTOC produced similar findings (81), revealing a conserved role for Bmp4 during evolution. Besides, partial redundancy between BMP ligands also seems to occur in the thymus, since treatment of FTOC with BMP2, but not with BMP7, similarly affected the production of DP cells (150).

### DN2 to DN3 Cells

Following T cell differentiation into CD44<sup>-/low</sup>CD25<sup>+</sup> DN3 cells, V $\beta$  to DJ $\beta$  recombination gives rise to the  $\beta$  chain of the pre-TCR (143). At this stage, the levels of *Inha*, *Bmp2*, and *Bmp4* remain relatively low, *Bmp7* becomes upregulated up to the CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> intermediate single-positive (ISP) stage, and expression of *Inhba* and *Tgfb1* declines (82, 127, 130). Levels of Alk4 (*Acvr1c*), Alk5 (*Tgfb1*), and ActRII (*Acvr2a*) gradually reduce as thymocytes mature, in contrast to T $\beta$ RII, which is slowly upregulated – at this stage, Alk4 and Alk5 are co-expressed (134). Expression of *Bmpr1a* (Alk3) and *Bmpr2* (BMPRII) presents a small recovery at the DN3 and DN4 stages (127, 129). Nevertheless, conditional inactivation of *Bmp7* in the hematopoietic lineage using a *vav-iCre* line had no significant impact on T cell differentiation and total cell numbers, likely because endoderm-derived cTECs and mTECs may supply enough Bmp7 or other redundant factor for the mutant thymocytes (71, 82, 150). In particular, subcapsular cTECs, cortical DCs, and mTECs express *Bmp2* and *Bmp4* (71, 81, 82). Activation of the Bmp4 pathway in stromal cells indirectly impacts the DN to DP transition, as revealed by reconstitution experiments with thymocyte-depleted stroma treated with BMP4 or untreated stroma with BMP4-treated DN cells (89). Of note, although highly expressed up to the transition from DN2 to DN3, being downregulated up to the DP stage, and sustained at low levels at SP subsets (127), the gene referred as *Bmp1* is a procollagen C-proteinase involved in ventral body wall closure during embryogenesis. To our knowledge, there is no available functional information regarding its role during thymopoiesis, except that it was also found in cTECs and mTECs (71, 151).

### DN3 to DN4 Cells

Should rearrangements result in unproductive  $\beta$  chains, DN3 cells undergo apoptosis and are phagocytized by cortical macrophages or DCs in a process termed  $\beta$ -selection (143, 152). Otherwise, successful recombination leads to a reduction in CD25 expression and the expansion of CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> DN4 thymocytes (153, 154). Both activin A and inhibin A similarly stimulate the DN3 to DN4 transition, as revealed in FTOC from wild-type fetuses at E14.0. However, treatment with activin A led to higher numbers of mature CD24<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>high</sup> T cells at the expense of CD4<sup>+</sup> cells, in contrast to inhibin A treatment, which stimulated the transition from DN4 to DP cells (148).

### DP Cells

Rearrangement of the TCR $\alpha$  chain occurs at the DP stage and cells move from the cortical zone toward the thymic medulla (143, 155). During this migration, cTECs present self peptides through MHC molecules (pMHC) to the TCR of intermingling DP thymocytes in a process known as positive selection, in which interactions of low-avidity drive clones to survive and continue

maturation (156). At the DP stage, *Alk4* (*Acvr1b*), *Alk5* (*Tgfb1*), and *ActRII* (*Acvr2a*) reach their lowest levels, but the number of cells concomitantly presenting *Alk5* and *pSmad2* increases in relation to *Alk4*-positive cells (134). By contrast, *Bmpr1a* (*Alk3*) and *Bmpr2* (*BMPRII*) are highly expressed (127, 129). Two members of the GDF subgroup, *Gdf7* and *Gdf11*, seem to be induced in DP cells and sustained at SP stages, with *CD4*<sup>+</sup> T cells presenting relatively higher levels than *CD8*<sup>+</sup> T cells (127). *Gdf7* signals through BMP-specific receptors as *Alk3* and *BMPRII*, whereas *Gdf11* binds TGF- $\beta$ -related receptors, as *Alk4* and *Alk5* (157–159). Their roles on T cell function are largely obscure, if any. Mouse mutants for *Gdf7* exhibit variable hydrocephalus and fail to produce a class of commissural neurons (160). Male mutants are sterile due to impaired differentiation and branching morphogenesis of the seminal vesicle, with no other affected reproductive structure (161). In turn, mutants for *Gdf11* show homeotic transformations due to a delayed trunk to tail transition (162, 163). They die after birth because of renal defects, which may vary from hypoplasia to complete bilateral agenesis (164). Curiously, oral infection with Gram-negative bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, in rats led to a chronic upregulation of *Gdf11* expression among other cytokines in both peripheral *CD45RA*<sup>+</sup>*CD4*<sup>+</sup> T cells and B cells (165). At present, however, little is known on the effects of GDFs over thymopoiesis.

## SP Cells

Still in the cortex, differentiating thymocytes start to lose the expression of either *CD4* or *CD8* and migrate toward the medulla. The choice for either *CD4* or *CD8* SP lineage seems to occur at a transitional step defined as *CD4*<sup>+</sup>*CD8*<sup>low</sup> and depends on TCR interaction with the MHC class II or class I, respectively (166, 167). Additionally, it also relies on the triggering of a transcriptional machinery that operates distinctly for final differentiation (165, 166). Noteworthy, the SP cells sustain *Bmpr1a* (*Alk3*) and *Bmpr2* (*BMPRII*) expression, and upregulate *Alk5* (*Tgfb1*) and *T $\beta$ RII* (*Tgfb2*), which lead to increased levels of *pSmad2* (84, 127, 129, 134). At this stage, fine-tuning of TGF- $\beta$  signaling may occur by type III co-receptors – *CD4*<sup>+</sup>*CD8*<sup>-</sup> cells upregulate *Tgfb3* (betaglycan), whereas *CD4*<sup>-</sup>*CD8*<sup>+</sup> cells exhibit higher levels of *Cripto* (*Tdgl1*) (127, 144). Genetic loss of *Tgfb3* in FTOC resulted in decreased numbers of both DP and SP cells, probably related to the high rates of apoptosis in DN, DP, and *CD4*<sup>+</sup> SP subsets (144). An apoptotic phenotype was also observed in the liver of *Tgfb3* mutants (168). However, a functional role for *Cripto* during thymopoiesis is currently unresolved, despite its importance for TGF- $\beta$  binding and inhibition (169). Mutants for this gene present a strong deleterious phenotype during gastrulation and die shortly afterward (170, 171). Modulation of TGF- $\beta$  family members, their receptors, and co-receptors at the DP stage is therefore associated with the terminal differentiation of thymocytes.

## Impact of TGF- $\beta$ Signals on the Differentiation of Thymic Regulatory T Cells

Regulatory T (Treg) cells have the ability to suppress autoreactive T cells, and they can originate from the thymus or be induced

in the periphery (172). Thymus-derived Treg (tTreg) arise in the thymus from SP *CD4*<sup>+</sup> T cells that escape negative selection during maturation by presenting TCR signals of variable affinities (80, 172–174). More specifically, TCRs with high avidity for self-antigens trigger a new upregulation of *CD25* (IL-2 receptor  $\alpha$  chain) and therefore exhibit an increased responsiveness to IL-2, ultimately inducing the expression of the transcription factor forkhead box P3 (*Foxp3*) through a STAT5-dependent mechanism (175–177). *Foxp3* is the critical transcription factor for Treg cell lineage, as its loss abolishes tTreg cells and lead to systemic autoimmunity and death (178, 179). Conversely, forced expression of *Foxp3* in *CD25*<sup>-</sup>*CD45RB*<sup>high</sup>*CD4*<sup>+</sup> SP cells transferred into severe combined immunodeficiency (SCID) hosts suppressed exacerbated inflammation (180). Unlike previously thought (181), however, expression of *Foxp3* in developing tTreg cells induced apoptosis instead of cell survival. Cell death is prevented by limiting concentrations of  $\gamma$ c-mediated survival signals enough to sustain only fewer than one million *Foxp3*<sup>+</sup> cells (182).

Signals from members of TGF- $\beta$  superfamily also play important roles over the differentiation and survival of tTreg cells. In particular, conditional loss of *Tgfb1* (*Alk5*) in thymocytes seems to be involved in tTreg specification, since a *Lck-Cre* mouse line completely blocked differentiation of tTreg cells in neonatal mice, whereas later inactivation of *Tgfb1* by a *Foxp3-Cre* line produced no differences in tTreg numbers as compared to wild-type mice (80, 183). In addition, the intrathymic injection of an anti-TGF- $\beta$  antibody suppressed *Foxp3* expression in a TCR transgenic *CD4*<sup>+</sup>*CD25*<sup>-</sup> SP cells (80). Of note, impaired *Alk5* signaling induced by the *Lck-Cre* line caused no significant impact on *CD4*<sup>+</sup> and *CD8*<sup>+</sup> SP cell numbers (183). A later increase in Treg cells induced in the periphery (pTreg) in these mutant mice relied on IL-2 signaling, since ablation of this cytokine produced no detectable cells in organs, such as the spleen and liver (183). Similarly, thymocyte deficiency of *Tgfb2* from a *CD4-Cre* mouse line resulted in reduced numbers of tTreg cells due to Bim-dependent apoptosis likely independent of  $\gamma$ c-signaling, without affecting TCR- $\beta$ <sup>high</sup>*CD4*<sup>+</sup>*Foxp3*<sup>-</sup> mature T cells in neonatal mice (84). Unlike *Tgfb1*-mutant thymocytes, conditional deletion of *Tgfb2* also resulted in low numbers of pTreg cells (84). Induction of pTreg cells relies on the *Smad3*-dependent upregulation of *Foxp3* triggered by activation of both TCR and TGF- $\beta$  signaling and facilitated by retinoic acid, which increased *pSmad3* accessibility to regulatory sequences of the *Foxp3* promoter and concurrently counteracted the suppressing effects of a c-Jun N-terminal Kinase (JNK) inhibitor (184, 185). Genetic analyses of the regulatory CNS1 region of *Foxp3*, which contains binding sites for NFAT, *Smad3*, and RAR/RXR, revealed that tTreg cell development occurs independently of its activation, whereas its chromosomal deletion largely impaired the production of pTreg cells in secondary lymphoid organs (184–186). In accordance to the different requirements revealed for tTreg in comparison to pTreg populations, TGF- $\beta$ 1 is essential for the peripheral differentiation and maintenance of pTreg cells, but seems to be dispensable for tTreg maturation (187).

Taking into consideration the upregulation of all three TGF- $\beta$  ligands by stromal cells upon thymocyte apoptosis in the thymus, along with recent findings regarding mutants for distinct

TGF- $\beta$ -specific receptors (80, 84, 183), it is possible that TGF- $\beta$  ligands may play a redundant yet underestimated role in the immune system. Noteworthy, mutants for TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 also exhibit perinatal mortality, a characteristic that complicates the examination of their role in adults (188–190). Although at first sight, the phenotypes observed in these mutants were generally non-overlapping, some particular structures showed similar defects between single mutants (e.g., cleft palate in either TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 mutants) or exclusive abnormalities in compound mutants, such as abnormal brain vascular morphogenesis and impaired midline fusion along with earlier embryonic lethality in *Tgfb1<sup>RGE</sup>;Tgfb3* and *Tgfb2;Tgfb3* compound mutants, respectively (191, 192). However, development of tTreg was never evaluated in these compound mutants. An alternative explanation may consider the participation of a previously unappreciated ligand of the TGF- $\beta$  superfamily in the differentiation of tTreg cells. Whether this is indeed the case, this candidate ligand should probably signal through Alk5 and T $\beta$ RII receptors to phosphorylate Smad2 and Smad3 intracellular effectors. Thereby, likely ligands to be thoroughly evaluated due to their expression pattern and receptor affinity are Gdf11 and Gdf8/myostatin – curiously two members that showed redundancy in patterning the axial skeleton as revealed by *Gdf11;Mstn* double mutants. Unfortunately, examination of fetal thymus morphology and T cell differentiation using FTOC was not performed in these mutants (193).

Noteworthy, TGF- $\beta$  signals also regulate the thymic development of IL-17-producing cells. A subset of  $\gamma\delta$  T cells acquire the capacity to produce IL-17 inside the thymus via a TGF- $\beta$ 1-dependent machinery, and both *Tgfb1<sup>-/-</sup>* and *Smad3<sup>-/-</sup>* mice were shown to be completely devoid of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells (194). Additionally, NKT17 cells comprise a thymic-derived IL-17-producing, CD1d-restricted, and glycolipid antigen-reactive T cell subset (195, 196). These cells express high levels of T $\beta$ RII and depend on TGF- $\beta$  signals for differentiation and survival within the thymus and in the periphery (197, 198).

## A TGF- $\beta$ Member for Thymus Rejuvenation?

Aging is an inherent process of living beings, normally associated with gradual loss of function and structure over time – accumulation of reactive species, DNA damage, abnormally folded proteins, and telomere shortening are just some of the molecular changes that may be followed by increased apoptosis, cell transformation, or other cellular event that will ultimately lead to death (199). Although this negative scenario was initially thought to be irreversible, numerous evidences point out that at least in part it is possible to slow down or eventually reverses some specific aging phenotypes. Taking the thymus as example, aging is easily recognizable by a sharp decrease in cellularity of both lymphoid and stromal compartments, whereas the number of thymic adipocytes inversely increases (200, 201). Ultimately, these thymic changes lead to a reduction of naïve T cells in the periphery along with an increase of memory T cells, which reflects in the organism ability to respond to both infection and tumorigenesis (202).

Multiple factors may trigger thymic involution, including the production of sex steroid hormones from puberty, increased

calorie intake, or diminished levels of some growth factors and cytokines, such as fibroblast growth factor 7 (FGF7)/keratinocyte growth factor (KGF), insulin-like growth factor (IGF-1), growth hormone (GH), interleukin-7 (IL-7), and IL-22 (203). Modulation of each of them is able to rescue the aged thymic phenotype and restore the immune function at some level (204–210). However, some of these strategies may be inefficient, invasive, non-specific, or produce undesirable side effects to be used in humans (211). A quest for thymic rejuvenation therapies therefore faces daunting challenges in the clinic. Of particular interest, forced expression of *Foxn1* was shown to effectively reprogram fibroblasts into TECs or regenerate fully involuted thymuses at many different experimental setups, both *in vitro* or *in vivo* (212–214). In this context, signals that control *Foxn1* expression might be used to restore the integrity of the thymic epithelial niche and subsequently flourish thymopoiesis in the elderly. In this scenario, administration of soluble factors, such as ligands of the TGF- $\beta$  superfamily, may be used as regenerative drugs.

Recent findings have revealed that levels of some circulating factors vary with age and that heterochronic parabiosis, i.e., a surgical procedure that connects the circulatory systems of animals with different ages, was able to reverse age-related phenotypes as cardiac hypertrophy (132). These authors further identified the TGF- $\beta$  member Gdf11 as responsible for restoring cardiac function in old mice, a finding that was further expanded to other systems. In particular, daily treatment of old mice with recombinant GDF11 improved skeletal muscle mass and strength, as well as the integrity of brain vasculature and cognitive function (215, 216). In culture, Gdf11 promoted osteoblastogenesis while inhibiting adipogenesis in bone marrow-derived cells (217). Administration of GDF11 in endothelial progenitor cells triggered cell sprouting and migration, also revealing a role in the formation of blood vessels (218).

Whether Gdf11 or other circulating factor can be used as a rejuvenating cytokine for the thymus remains to be thoroughly assessed. Indeed, *Gdf11* is expressed in the thymus of young mice (132), whereas the levels of its non-exclusive receptors, Alk4 and Alk5, vary in thymocytes and TECs, as previously discussed. Of note, however, therapy with Gdf11 produced some side effects in mice (219), and a recent study by Egerman et al. has recently questioned the aforementioned observations (220). Whereas these controversial data on Gdf11 await further investigation, it is noteworthy that heterochronic parabiosis did not reverse thymic involution, but caused atrophy with mild effects on T cell subpopulations of young mice and a reduction in the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in old partners to the level of the young pair (221). Although a putative rejuvenating factor for the thymus still awaits to be determined, this controversial matter helps to bring the debate on the role of TGF- $\beta$  superfamily members for the thymus function.

## Concluding Remarks

Although the differentiation of T cells is mainly driven by the rearrangement of TCR genes, many members of the TGF- $\beta$  superfamily exert critical roles in their stepwise progression during thymic migration. Historically, special attention had been



given to the activity of TGF- $\beta$  ligands in the induction of Treg cells and tolerance to self-antigens, as well as to BMP signaling on thymus organogenesis. However, other members are also produced by developing thymocytes, thymic stromal cells, or may circulate throughout the body by the blood stream and reach the thymus. These ligands signal through the same limited sets of type I and type II receptors to produce dissimilar outcomes either by affecting distinct stages or cell types (e.g., thymocytes versus TECs). How such TGF- $\beta$  superfamily ligands affect T cell maturation, thymus proper physiology, or its involution remain poorly understood and should be the focus of future research. In addition, a scenario in which a TGF- $\beta$  superfamily member or its

inhibitor acts to rejuvenate the aged thymus may be a likely case for future research.

## Acknowledgments

This work benefited from data assembled by the ImmGen consortium and was supported by grants from the Brazilian Research Council/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Rio de Janeiro State Research Council/Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (to ADJ and VC-A). LV-F received a Masters' fellowship from CNPq.

## References

- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* (2010) **11**:47–59. doi:10.1038/nrg2703
- Cowan JE, Jenkinson WE, Anderson G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant  $\gamma\delta$  T cells, and invariant NKT cells: what we learn from intrathymic migration. *Eur J Immunol* (2015) **45**:652–60. doi:10.1002/eji.201445108
- Agosti V, Corbacioglu S, Ehlers I, Waskow C, Sommer G, Berrozpe G, et al. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med* (2004) **199**:867–78. doi:10.1084/jem.20031983
- Fry TJ, Sinha M, Milliron M, Chu YW, Kapoor V, Gress RE, et al. Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood* (2004) **104**:2794–800. doi:10.1182/blood-2003-11-3789
- Besseyrias V, Fiorini E, Strobl LJ, Zimmer-strobl U, Dumortier A, Koch U, et al. Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* (2007) **204**:331–43. doi:10.1084/jem.20061442
- Magri M, Yatim A, Benne C, Balbo M, Henry A, Serraf A, et al. Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur J Immunol* (2009) **39**:1231–40. doi:10.1002/eji.200838765
- Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* (2007) **25**:649–79. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115715
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* (1965) **150**:893–9. doi:10.1126/science.150.3698.893
- De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1978) **75**:4001–5. doi:10.1073/pnas.75.8.4001
- Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980) **77**:3494–8. doi:10.1073/pnas.77.6.3494
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1983) **80**:3676–80. doi:10.1073/pnas.80.12.3676
- Wrana JL. Signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013) **5**:a011197. doi:10.1101/cshperspect.a011197
- Constam DB. Regulation of TGF $\beta$  and related signals by precursor processing. *Semin Cell Dev Biol* (2014) **32**:85–97. doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.008
- Degnin C, Jean F, Thomas G, Christian JL. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* (2004) **15**:5012–20. doi:10.1091/mbc.E04-08-0673
- Nelsen SM, Christian JL. Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem* (2009) **284**:27157–66. doi:10.1074/jbc.M109.028506
- Li Z, Kawasumi M, Zhao B, Moisyadi S, Yang J. Transgenic over-expression of growth differentiation factor 11 propeptide in skeleton results in transformation of the seventh cervical vertebra into a thoracic vertebra. *Mol Reprod Dev* (2010) **77**(11):990–7. doi:10.1002/mrd.21252
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* (1994) **370**:341–7. doi:10.1038/370341a0
- Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J. The TGF- $\beta$  family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* (1997) **11**:984–95. doi:10.1101/gad.11.8.984
- Massagué J, Gomis RR. The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS Lett* (2006) **580**:2811–20. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.033
- Mueller TD, Nickel J. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett* (2012) **586**:1846–59. doi:10.1016/j.febslet.2012.02.043
- Ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, et al. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* (1993) **8**:2879–87.
- Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* (2000) **287**:92–7. doi:10.1126/science.287.5450.92
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* (1998) **94**:585–94. doi:10.1016/S0092-8674(00)81600-1
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* (1998) **1**:611–7. doi:10.1016/S1097-2765(00)80061-1
- Makkar P, Metpally RPR, Sangadala S, Reddy BVB. Modeling and analysis of MH1 domain of Smads and their interaction with promoter DNA sequence motif. *J Mol Graph Model* (2009) **27**:803–12. doi:10.1016/j.jmkgm.2008.12.003
- Xiao Z, Latek R, Lodish HF. An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* (2003) **22**:1057–69. doi:10.1038/sj.onc.1206212
- Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* (2004) **15**:813–23. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.016
- Baburajendran N, Jauch R, Tan CYZ, Narasimhan K, Kolatkar PR. Structural basis for the cooperative DNA recognition by Smad4 MH1 dimers. *Nucleic Acids Res* (2011) **39**:8213–22. doi:10.1093/nar/gkr500
- Chen X, Xu L. Specific nucleoporin requirement for Smad nuclear translocation. *Mol Cell Biol* (2010) **30**:4022–34. doi:10.1128/MCB.00124-10
- Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J* (2015) **282**:445–62. doi:10.1111/febs.13163
- Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin C-H. Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene* (2012) **32**:1–7. doi:10.1038/onc.2012.191
- Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* (2008) **40**:383–408. doi:10.1016/j.biocel.2007.09.006
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* (2003) **113**:685–700. doi:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* (1997) **389**:622–6. doi:10.1038/39355
- Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, Shimanuki T, Imamura T, Miyazono K. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* (2001) **155**:1017–27. doi:10.1083/jcb.200106023
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the

- TGF $\beta$  receptor for degradation. *Mol Cell* (2000) **6**:1365–75. doi:10.1016/S1097-2765(00)00134-9
37. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in Tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2005) **21**:659–93. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018
  38. Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* (2009) **16**:329–43. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.012
  39. Massagué J, Xi Q. TGF- $\beta$  control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett* (2012) **586**:1953–8. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.023
  40. Xie F, Zhang Z, van Dam H, Zhang L, Zhou F. Regulation of TGF- $\beta$  superfamily signaling by SMAD mono-ubiquitination. *Cells* (2014) **3**:981–93. doi:10.3390/cells3040981
  41. Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, et al. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol* (2004) **5**:546–53. doi:10.1038/ni1064
  42. Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* (2011) **138**:3865–78. doi:10.1242/dev.059998
  43. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (2012).
  44. Farley AM, Morris LX, Vroegindewij E, Depreter MLG, Vaidya H, Stenhouse FH, et al. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development* (2013) **140**:2015–26. doi:10.1242/dev.087320
  45. Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* (1998) **195**:1–15. doi:10.1006/dbio.1997.8827
  46. Hamazaki Y, Fujita H, Kobayashi T, Choi Y, Scott HS, Matsumoto M, et al. Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol* (2007) **8**:304–11. doi:10.1038/ni1438
  47. Muñoz JJ, Cejalvo T, Tobajas E, Fanlo L, Cortés A, Zapata AG. 3D immunofluorescence analysis of early thymic morphogenesis and medulla development. *Histol Histopathol* (2015) **30**:589–99. doi:10.14670/HH-30.589
  48. Van Ewijk W, Holländer G, Terhorst C, Wang B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* (2000) **127**:1583–91.
  49. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz R, Schüddekopf K, Smith AJ, et al. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* (1996) **272**:886–9. doi:10.1126/science.272.5263.886
  50. Günther T, Chen ZF, Kim J, Priemel M, Rueger JM, Amling M, et al. Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* (2000) **406**:199–203. doi:10.1038/35018111
  51. Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC, Manley NR. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev* (2001) **103**:141–3. doi:10.1016/S0925-4773(01)00333-1
  52. Liu Z, Farley A, Chen L, Kirby BJ, Kovacs CS, Blackburn CC, et al. Thymus-associated parathyroid hormone has two cellular origins with distinct endocrine and immunological functions. *PLoS Genet* (2010) **6**:e1001251. doi:10.1371/journal.pgen.1001251
  53. Dooley J, Erickson M, Roelink H, Farr AG. Nude thymic rudiment lacking functional Foxn1 resembles respiratory epithelium. *Dev Dyn* (2005) **233**:1605–12. doi:10.1002/dvdy.20495
  54. Haynes BF, Heinly CS. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med* (1995) **181**:1445–58. doi:10.1084/jem.181.4.1445
  55. Ramond C, Berthault C, Burlen-Defranoux O, de Sousa AP, Guy-Grand D, Vieira P, et al. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat Immunol* (2014) **15**:27–35. doi:10.1038/ni.2782
  56. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* (2000) **127**:1607–16.
  57. Patel SR, Gordon J, Mahbub F, Blackburn CC, Manley NR. Bmp4 and Noggin expression during early thymus and parathyroid organogenesis. *Gene Expr Patterns* (2006) **6**:794–9. doi:10.1016/j.modgep.2006.01.011
  58. Gordon J, Patel SR, Mishina Y, Manley NR. Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev Biol* (2010) **339**:141–54. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.026
  59. Neves H, Dupin E, Parreira L, Le Douarin NM. Modulation of Bmp4 signalling in the epithelial-mesenchymal interactions that take place in early thymus and parathyroid development in avian embryos. *Dev Biol* (2012) **361**:208–19. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.022
  60. Moore-Scott BA, Opoka R, Lin S-CJ, Kordich JJ, Wells JM. Identification of molecular markers that are expressed in discrete anterior-posterior domains of the endoderm from the gastrula stage to mid-gestation. *Dev Dyn* (2007) **236**:1997–2003. doi:10.1002/dvdy.21204
  61. Sun X, Xu J, Lu H, Liu W, Miao Z, Sui X, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into thymic epithelial progenitor-like cells reconstitutes the thymic microenvironment in vivo. *Cell Stem Cell* (2013) **13**:230–6. doi:10.1016/j.stem.2013.06.014
  62. Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, Barth KS, Kispert A, Herrmann B, et al. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* (1994) **120**:1919–28.
  63. Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* (1996) **122**:2977–86.
  64. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* (1999) **13**:424–36. doi:10.1101/gad.13.4.424
  65. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* (2006) **441**:988–91. doi:10.1038/nature04813
  66. Wong K, Lister NL, Barsanti M, Lim JMC, Hammett MV, Khong DM, et al. Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep* (2014) **8**:1198–209. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.029
  67. Danzl NM, Jeong S, Choi Y, Alexandropoulos K. Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and Traf6. *PLoS One* (2014) **9**:e86129. doi:10.1371/journal.pone.0086129
  68. Farr AG, Anderson SK. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J Immunol* (1985) **134**:2971–7.
  69. Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) **95**:11822–7. doi:10.1073/pnas.95.20.11822
  70. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, et al. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* (2007) **316**:1349–53. doi:10.1126/science.1141915
  71. St-Pierre C, Brochu S, Vanegas JR, Dumont-Lagacé M, Lemieux S, Perreault C. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci Rep* (2013) **3**:1860. doi:10.1038/srep01860
  72. Schluns KS, Grutkoski PS, Cook JE, Engelmann GL, Le PT. Human thymic epithelial cells produce TGF- $\beta$  3 and express TGF- $\beta$  receptors. *Int Immunol* (1995) **7**:1681–90. doi:10.1093/intimm/7.10.1681
  73. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* (2002) **298**:1395–401. doi:10.1126/science.1075958
  74. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* (2005) **23**:227–39. doi:10.1016/j.immuni.2005.07.005
  75. Derbinski J, Gäbler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* (2005) **202**:33–45. doi:10.1084/jem.20050471
  76. Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Zhanybekova S, Murata S, et al. Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from  $\beta$ 5t-expressing progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:9885–90. doi:10.1073/pnas.1301799110
  77. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* (2001) **2**:1032–9. doi:10.1038/ni723
  78. Melichar HJ, Ross JO, Herzmark P, Hogquist KA, Robey EA. Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci Signal* (2013) **6**:ra92. doi:10.1126/scisignal.2004400
  79. Dzhagalov IL, Chen KG, Herzmark P, Robey EA. Elimination of self-reactive T1 cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol* (2013) **11**:e1001566. doi:10.1371/journal.pbio.1001566
  80. Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, Grainger JR, Chen W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) **111**:E465–73. doi:10.1073/pnas.1320319111

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**:94–104. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02541.x
82. Passa O, Tsalavos S, Belyaev NN, Petryk A, Potocnik AJ, Graf D. Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironments and functional implications. *Immunology* (2011) **134**:349–59. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03495.x
83. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* (2005) **6**:9. doi:10.1186/1471-2172-6-9
84. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* (2010) **32**:642–53. doi:10.1016/j.immuni.2010.04.012
85. Hauri-Hohl M, Zuklys S, Holländer GA, Ziegler SF. A regulatory role for TGF- $\beta$  signaling in the establishment and function of the thymic medulla. *Nat Immunol* (2014) **15**:554–61. doi:10.1038/ni.2869
86. Marrella V, Poliani PL, Notarangelo LD, Villa A. Rag defects and thymic stroma: lessons from animal models. *Front Immunol* (2014) **5**:529. doi:10.3389/fimmu.2014.00259
87. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* (1994) **372**:103–7. doi:10.1038/372103a0
88. Balcunaite G, Keller MP, Balcunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* (2002) **3**:1102–8. doi:10.1038/ni850
89. Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* (2003) **102**:3947–53. doi:10.1182/blood-2003-05-1657
90. Bleul CC, Boehm T. BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* (2005) **175**:5213–21. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5213
91. Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, et al. Wnt-4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone-induced senescence. *Rejuvenation Res* (2011) **14**:241–8. doi:10.1089/rej.2010.1110
92. Liang C-C, You L-R, Yen JJ, Liao N-S, Yang-Yen H-F, Chen C-M. Thymic epithelial  $\beta$ -catenin is required for adult thymic homeostasis and function. *Immunol Cell Biol* (2013) **91**:511–23. doi:10.1038/icb.2013.34
93. Lai L, Jin J. Generation of thymic epithelial cell progenitors by mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* (2009) **27**:3012–20. doi:10.1002/stem.238
94. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* (2005) **23**:1534–41. doi:10.1038/nbt1163
95. Green MD, Chen A, Nostro M-C, d'Souza SL, Schaniel C, Lemischka IR, et al. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* (2011) **29**:267–72. doi:10.1038/nbt.1788
96. Parent AV, Russ HA, Khan IS, Laflam TN, Metzger TC, Anderson MS, et al. Generation of functional thymic epithelium from human embryonic stem cells that supports host T cell development. *Cell Stem Cell* (2013) **13**:219–29. doi:10.1016/j.stem.2013.04.004
97. Douagi I, Andre I, Ferraz JC, Cumano A. Characterization of T cell precursor activity in the murine fetal thymus: evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. *Eur J Immunol* (2000) **30**:2201–10. doi:10.1002/1521-4141(2000)30:8<2201:AID-IMMU2201>3.0.CO;2-2
98. Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, et al. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus. *Blood* (2005) **105**:31–9. doi:10.1182/blood-2004-04-1369
99. Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, Love P, et al. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* (2006) **108**:2531–9. doi:10.1182/blood-2006-05-024190
100. Calderón L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**:7517–22. doi:10.1073/pnas.1016428108
101. Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* (2000) **30**:3371–9. doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3371:AID-IMMU3371>3.0.CO;2-L
102. Zaballos A, Gutiérrez J, Varona R, Ardavin C, Márquez G. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol* (1999) **162**:5671–5.
103. Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* (1999) **94**:2533–6.
104. Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* (1998) **273**:7118–22. doi:10.1074/jbc.273.12.7118
105. Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, Jenkinson EJ, et al. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol* (2007) **37**:2090–6. doi:10.1002/eji.200737212
106. Hillyer P, Mordelet E, Flynn G, Male D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol* (2003) **134**:431–41. doi:10.1111/j.1365-2249.2003.02323.x
107. Lambrecht S, Smith V, De Wilde K, Coudenys J, Decuman S, Deforce D, et al. Growth differentiation factor 15, a marker of lung involvement in systemic sclerosis, is involved in fibrosis development but is not indispensable for fibrosis development. *Arthritis Rheumatol* (2014) **66**:418–27. doi:10.1002/art.38241
108. Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med* (2011) **17**:581–8. doi:10.1038/nm.2354
109. Carrillo-García C, Prochnow S, Simeonova IK, Strelau J, Hözl-Wenig G, Mandl C, et al. Growth/differentiation factor 15 promotes EGFR signalling, and regulates proliferation and migration in the hippocampus of neonatal and young adult mice. *Development* (2014) **141**:773–83. doi:10.1242/dev.096131
110. Zhao X, Huang Y, Huang Y, Lei P, Peng J, Wu S, et al. Transforming growth factor-beta1 upregulates the expression of CXCR4 in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* (2010) **31**:347–54. doi:10.1038/aps.2009.204
111. Yu S, Crawford D, Tsuchihashi T, Behrens TW, Srivastava D. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn* (2011) **240**:384–93. doi:10.1002/dvdy.22549
112. Park BY, Hong CS, Sohail FA, Saint-Jeannet JP. Developmental expression and regulation of the chemokine CXCL14 in *Xenopus*. *Int J Dev Biol* (2009) **53**:535–40. doi:10.1387/ijdb.092855bp
113. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* (2014) **192**:3858–67. doi:10.4049/jimmunol.1302821
114. Wang B, Biron C, She J, Higgins K, Sunshine MJ, Lacy E, et al. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**:9402–6. doi:10.1073/pnas.91.20.9402
115. Holländer GA, Wang B, Nichogiannopoulou A, Platenburg PP, van Ewijk W, Burakoff SJ, et al. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* (1995) **373**:350–3. doi:10.1038/373350a0
116. Jenkinson WE, Rossi SW, Jenkinson EJ, Anderson G. Development of functional thymic epithelial cells occurs independently of lymphostromal interactions. *Mech Dev* (2005) **122**:1294–9. doi:10.1016/j.mod.2005.08.003
117. Ohnemus S, Kanzler B, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE, Boehm T, Mallo M. Aortic arch and pharyngeal phenotype in the absence of BMP-dependent neural crest in the mouse. *Mech Dev* (2002) **119**:127–35. doi:10.1016/S0925-4773(02)00345-3
118. Liu Y, Jin Y, Li J, Seto E, Kuo E, Yu W, et al. Inactivation of Cdc42 in neural crest cells causes craniofacial and cardiovascular morphogenesis defects. *Dev Biol* (2013) **383**:239–52. doi:10.1016/j.ydbio.2013.09.013
119. Alt B, Elsallini OA, Schrupf P, Haufs N, Lawson ND, Schwabe GC, et al. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development* (2006) **133**:3797–804. doi:10.1242/dev.02550
120. Wang J, Nagy A, Larsson J, Dudas M, Sucov HM, Kaartinen V. Defective ALK5 signaling in the neural crest leads to increased postmigratory neural

- crest cell apoptosis and severe outflow tract defects. *BMC Dev Biol* (2006) 6:51. doi:10.1186/1471-213X-6-51
121. Hauri-Hohl MM, Zuklys S, Keller MP, Jeker LT, Barthlott T, Moon AM, et al. TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution. *Blood* (2008) 112:626–34. doi:10.1182/blood-2007-10-115618
  122. Foster K, Sheridan J, Veiga-Fernandes H, Roderick K, Pachnis V, Adams R, et al. Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol* (2008) 180:3183–9. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3183
  123. Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol* (2004) 25:210–7. doi:10.1016/j.it.2004.02.008
  124. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* (2006) 34:504–14. doi:10.1080/01926230600865549
  125. Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr* (2010) 4:382–90. doi:10.4161/cam.4.3.11789
  126. Berrih S, Savino W, Cohen S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem* (1985) 33:655–64. doi:10.1177/33.7.3891843
  127. Heng TSP, Painter MW. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* (2008) 9:1091–4. doi:10.1038/ni1008-1091
  128. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* (2002) 169:5496–504. doi:10.4049/jimmunol.169.10.5496
  129. 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) 13:324–33. doi:10.4161/cc.27118
  130. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* (2006) 235:1124–32. doi:10.1002/dvdy.20707
  131. Mingueneau M, Kreslavsky T, Gray D, Heng T, Cruse R, Ericson J, et al. The transcriptional landscape of  $\alpha\beta$  T cell differentiation. *Nat Immunol* (2013) 14:619–32. doi:10.1038/ni.2590
  132. Loffredo FS, Steinhäuser 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) 153:828–39. doi:10.1016/j.cell.2013.04.015
  133. Savino W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. *Neuroimmunomodulation* (2010) 17:142–5. doi:10.1159/000258708
  134. Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *Int Immunol* (2003) 15:1401–14. doi:10.1093/intimm/dxg139
  135. Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol* (2012) 42:749–59. doi:10.1002/eji.201141702
  136. Sanos SL, Nowak J, Fallet M, Bajenoff M. Stromal cell networks regulate thymocyte migration and dendritic cell behavior in the thymus. *J Immunol* (2011) 186:2835–41. doi:10.4049/jimmunol.1003563
  137. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* (2004) 75:951–61. doi:10.1189/jlb.1003455
  138. Von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol* (2004) 84:201–38. doi:10.1016/S0065-2776(04)84006-9
  139. Ferreira LMR. Gammadelta T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol* (2013) 32:223–48. doi:10.3109/08830185.2013.783831
  140. Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, et al. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat Immunol* (2012) 13:412–9. doi:10.1038/ni.2255
  141. Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2007) 23:463–93. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123547
  142. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* (2004) 200:469–79. doi:10.1084/jem.20040394
  143. Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* (1994) 1:83–93. doi:10.1016/1074-7613(94)90102-3
  144. Aleman-Muench GR, Mendoza V, Stenvers K, Garcia-Zepeda EA, Lopez-Casillas F, Raman C, et al. Betaglycan (T $\beta$ RIII) is expressed in the thymus and regulates T cell development by protecting thymocytes from apoptosis. *PLoS One* (2012) 7:e44217. doi:10.1371/journal.pone.0044217
  145. López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* (1993) 73:1435–44. doi:10.1016/0092-8674(93)90368-Z
  146. López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* (1994) 124:557–68. doi:10.1083/jcb.124.4.557
  147. Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG. Betaglycan inhibits TGF- $\beta$  signaling by preventing type I-type II receptor complex formation: glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* (2002) 277:823–9. doi:10.1074/jbc.M105110200
  148. 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* (2009) 381:229–35. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.029
  149. Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* (1995) 154:5789–98.
  150. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merckenschlager 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* (2002) 196:163–71. doi:10.1084/jem.20020276
  151. Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L, Dunn R, Fogo AB, et al. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by *Bmp1*, a mammalian gene related to *Drosophila* tolloid. *Development* (1996) 122:3587–95.
  152. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* (1994) 372:100–3. doi:10.1038/372100a0
  153. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Ogata K, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, et al. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* (2006) 7:67–75. doi:10.1038/ni1290
  154. Crompton T, Moore M, MacDonald HR, Malissen B. Double-negative thymocyte subsets in CD3 $\zeta$  chain-deficient mice: absence of HSA+CD44-CD25-cells. *Eur J Immunol* (1994) 24:1903–7. doi:10.1002/eji.1830240828
  155. Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser A, Crispe IN, Shortman K. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* (1993) 178:615–22. doi:10.1084/jem.178.2.615
  156. Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol* (2012) 13:121–8. doi:10.1038/ni.2190
  157. Oh SP, Yeo C-Y, Lee Y, Schrewe H, Whitman M, Li E. Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes Dev* (2002) 16:2749–54. doi:10.1101/gad.1021802
  158. Mazerbourg S, Sangkuhl K, Luo CW, Sudo S, Klein C, Hsueh AJW. Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J Biol Chem* (2005) 280:32122–32. doi:10.1074/jbc.M504629200
  159. Andersson O, Reissmann E, Ibáñez CF. Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor-beta receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. *EMBO Rep* (2006) 7:831–7. doi:10.1038/sj.embor.7400752
  160. Lee KJ, Mendelsohn M, Jessell TM. Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural

- interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev* (1998) **12**:3394–407. doi:10.1101/gad.12.21.3394
161. Settle S, Marker P, Gurley K, Sinha A, Thacker A, Wang Y, et al. The BMP family member Gdf7 is required for seminal vesicle growth, branching morphogenesis, and cytodifferentiation. *Dev Biol* (2001) **234**:138–50. doi:10.1006/dbio.2001.0244
162. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet* (1999) **22**:260–4. doi:10.1038/10320
163. Jurberg AD, Aires R, Varela-Lasheras I, N voa A, Mallo M. Switching axial progenitors from producing trunk to tail tissues in vertebrate embryos. *Dev Cell* (2013) **25**:451–62. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.009
164. Esqueda AF, Lee S-J. Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Dev Biol* (2003) **257**:356–70. doi:10.1016/S0012-1606(03)00100-3
165. Li Y, Messina C, Bendaoud M, Fine DH, Schreiner H, Tsiagbe VK. Adaptive immune response in osteoclastic bone resorption induced by orally administered *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in a rat model of periodontal disease. *Mol Oral Microbiol* (2010) **25**:275–92. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00576.x
166. Singer A, Adoro S, Park J-H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**:788–801. doi:10.1038/nri2416
167. Adoro S, McCaughy T, Erman B, Alag A, Van Laethem F, Park J-H, et al. Coreceptor gene imprinting governs thymocyte lineage fate. *EMBO J* (2012) **31**:366–77. doi:10.1038/emboj.2011.388
168. Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Graill D, et al. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* (2003) **23**:4371–85. doi:10.1128/MCB.23.12.4371-4385.2003
169. Gray PC, Shani G, Aung K, Kelber J, Vale W. Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGF-beta signaling. *Mol Cell Biol* (2006) **26**:9268–78. doi:10.1128/MCB.01168-06
170. Ding J, Yang L, Yan YT, Chen A, Desai N, Wynshaw-Boris A, et al. Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* (1998) **395**:702–7. doi:10.1038/27215
171. Xu C, Liguori G, Persico MG, Adamson ED. Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development* (1999) **126**:483–94. doi:10.1006/dbio.1998.8862
172. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* (2013) **38**:414–23. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.002
173. Lee HM, Bautista JL, Scott-Browne J, Mohan JF, Hsieh CSA. Broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity* (2012) **37**:475–86. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.009
174. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* (2014) **14**:377–91. doi:10.1038/nri3667
175. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* (2006) **108**:1571–9. doi:10.1182/blood-2006-02-004747
176. Zeiser R, Negrin RS. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle* (2008) **7**:458–62. doi:10.4161/cc.7.4.5454
177. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio C-WJ, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* (2008) **28**:112–21. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.022
178. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepel B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* (2001) **27**:68–73. doi:10.1038/83784
179. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* (2003) **4**:330–6. doi:10.1038/ni904
180. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* (2003) **299**:1057–61. doi:10.1126/science.1079490
181. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* (2007) **445**:771–5. doi:10.1038/nature05543
182. Tai X, Erman B, Alag A, Mu J, Kimura M, Katz G, et al. Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* (2013) **38**:1116–28. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.022
183. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* (2008) **9**:632–40. doi:10.1038/ni.1607
184. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* (2008) **9**:194–202. doi:10.1038/ni1549
185. Xu L, Kitani A, Stuelten C, McGrady G, Fuss I, Strober W. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* (2010) **33**:313–25. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.001
186. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* (2012) **482**:395–9. doi:10.1038/nature10772
187. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* (2005) **201**:1061–7. doi:10.1084/jem.20042276
188. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* (1995) **11**:415–21. doi:10.1038/ng1295-415
189. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* (1997) **124**:2659–70.
190. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, et al. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* (1995) **11**:409–14. doi:10.1038/ng1295-409
191. D nker N, Kriegelstein K. Tgf 2-/-Tgf 3-/- double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol (Berl)* (2002) **206**:73–83. doi:10.1007/s00429-002-0273-6
192. Mu Z, Yang Z, Yu D, Zhao Z, Munger JS. TGF 1 and TGF 3 are partially redundant effectors in brain vascular morphogenesis. *Mech Dev* (2008) **125**:508–16. doi:10.1016/j.mod.2008.01.003
193. McPherron AC, Huynh TV, Lee S-J. Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. *BMC Dev Biol* (2009) **9**:24. doi:10.1186/1471-213X-9-24
194. Do J, Fink PJ, Li L, Spolski R, Robinson J, Leonard WJ, et al. Cutting edge: spontaneous development of IL-17-producing gamma delta T cells in the thymus occurs via a TGF-beta 1-dependent mechanism. *J Immunol* (2010) **184**:1675–9. doi:10.4049/jimmunol.0903539
195. Michel M-L, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, Lochner M, Schneider E, Dy M, et al. Critical role of ROR- t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**:19845–50. doi:10.1073/pnas.0806472105
196. Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol* (2013) **14**:1146–54. doi:10.1038/ni.2731
197. Monteiro M, Almeida CF, Agua-Doce A, Graca L. Induced IL-17-producing invariant NKT cells require activation in presence of TGF-  and IL-1 . *J Immunol* (2013) **190**:805–11. doi:10.4049/jimmunol.1201010
198. Havenar-Daughton C, Li S, Benlagha K, Marie JC. Development and function of murine ROR t+ iNKT cells are under TGF-signaling control. *Blood* (2012) **119**:3486–94. doi:10.1182/blood-2012-01-401604
199. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* (2012) **148**:46–57. doi:10.1016/j.cell.2012.01.003

200. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* (1998) **396**:690–5. doi:10.1038/25374
201. Coelho VDM, Bunbury A, Rangel LB, Giri B, Weeraratna A, Morin PJ, et al. Fat-storing multilocular cells expressing CCR5 increase in the thymus with advancing age: potential role for CCR5 ligands on the differentiation and migration of preadipocytes. *Int J Med Sci* (2010) **7**:1–14. doi:10.7150/ijms.7.1
202. Müller L, Pawelec G. Aging and immunity – impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun* (2014) **39**:8–22. doi:10.1016/j.bbi.2013.11.015
203. Ventevogel MS, Sempowski GD. Thymic rejuvenation and aging. *Curr Opin Immunol* (2013) **25**:516–22. doi:10.1016/j.coi.2013.06.002
204. Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, Uldrich AP, Berzins SP, Heng TS, et al. Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol* (2005) **175**:2741–53. doi:10.4049/jimmunol.175.4.2741
205. Hirakata A, Okumi M, Griesemer AD, Shimizu A, Nobori S, Tena A, et al. Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transpl Immunol* (2010) **24**:76–81. doi:10.1016/j.trim.2010.08.001
206. Berent-Maoz B, Montecino-Rodriguez E, Signer RAJ, Dorshkind K. Fibroblast growth factor-7 partially reverses murine thymocyte progenitor aging by repression of Ink4a. *Blood* (2012) **119**:5715–21. doi:10.1182/blood-2011-12-400002
207. Min D, Panoskaltis-Mortari A, Kuro-o M, Holländer GA, Blazar BR, Weinberg KI. Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood* (2007) **109**:2529–37. doi:10.1182/blood-2006-08-043794
208. Morrhaye G, Kermani H, Legros J-J, Baron F, Beguin Y, Moutschen M, et al. Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *PLoS One* (2009) **4**:e5668. doi:10.1371/journal.pone.0005668
209. Taub DD, Murphy WJ, Longo DL. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* (2010) **10**:408–24. doi:10.1016/j.coph.2010.04.015
210. Phillips JA, Brondstetter TI, English CA, Lee HE, Virts EL, Thoman ML. IL-7 gene therapy in aging restores early thymopoiesis without reversing involution. *J Immunol* (2004) **173**:4867–74. doi:10.4049/jimmunol.173.8.4867
211. Velardi E, Dudakov JA, Van den Brink MRM. Clinical strategies to enhance thymic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett* (2013) **155**:31–5. doi:10.1016/j.imlet.2013.09.016
212. Zook EC, Krishack PA, Zhang S, Zeleznik-Le NJ, Firulli AB, Witte PL, et al. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* (2011) **118**:5723–31. doi:10.1182/blood-2011-03-342097
213. Breidenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* (2014) **141**:1627–37. doi:10.1242/dev.103614
214. Breidenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXP1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol* (2014) **16**(9):902–8. doi:10.1038/ncb3023
215. Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* (2014) **344**:649–52. doi:10.1126/science.1251152
216. 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* (2014) **344**:630–4. doi:10.1126/science.1251141
217. 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* (2014) **557**(2):6–11. doi:10.1016/j.gene.2014.12.039
218. Finkenzeller G, Stark GB, Strassburg S. Growth differentiation factor 11 supports migration and sprouting of endothelial progenitor cells. *J Surg Res* (2015) **198**(1):1–7. doi:10.1016/j.jss.2015.05.001
219. Suragani RNV, Cadena SM, Cawley SM, Sako D, Mitchell D, Li R, et al. Transforming growth factor- $\beta$  superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat Med* (2014) **20**:408–14. doi:10.1038/nm.3512
220. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al. GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* (2015) **22**(1):1–11. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.010
221. Pishel I, Shytikov D, Orlova T, Peregudov A, Artyuhov I, Butenko G. Accelerated aging versus rejuvenation of the immune system in heterochronic parabiosis. *Rejuvenation Res* (2012) **15**:239–48. doi:10.1089/rej.2012.1331

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Jurberg, Vasconcelos-Fontes and Cotta-de-Almeida. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.