

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RAFAELLA FERREIRA REIS

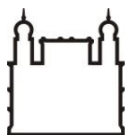
Estudo de células T regulatórias em camundongos deficientes em WASP

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

Orientadores: Profa. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: RAFAELLA FERREIRA REIS

**ESTUDO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES
EM WASP**

ORIENTADORES: Profa. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

Aprovada em: 09/06/2014

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Andréa Henriques Pons - Presidente

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos

Profa. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Profa. Dra. Adriana Cesar Bonomo (Revisora)

Profa. Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro, 9 de junho de 2014

DEDICATÓRIA

À minha família pela confiança e incentivo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Vinícius, por sua gentileza em me orientar, pela paciência nas horas de desespero e principalmente por todo carinho com que sempre me tratou. Muito obrigada por ter confiado em mim!

À minha orientadora Dani, por ter sido extremamente prestativa e paciente em todos os momentos em que precisei de sua ajuda. Obrigada Dani! Você é um amor!

À minha querida amiga Cynthia. Dindinha, sem você nada disso estaria acontecendo agora. Você é daquelas pessoas que nos fazem acreditar que os anjos existem e estão muito perto de nós! Eu amo você! Obrigada por tudo!

À minha querida companheira Carla. Obrigada pelo seu amor e compreensão, mas principalmente pela sua preocupação comigo. Obrigada também por cuidar de mim e por estar do meu lado em todos os momentos da minha vida. Você ao meu lado me faz muito feliz e eu te amo MUITO!

Aos meus filhos de coração, Brenno e Brunno pela força e positividade e por me ensinar o quão delicioso é formar uma família. Ah! E agradeço também à minha fiel escudeira Nayllinha, minha filha de quatro patas que me fez companhia em todos os momentos em que eu escrevia esta tese.

À minha querida mãe, por todo o seu amor! Obrigada por tudo que passou por mim! Prometo que sempre farei o meu melhor pra você se sentir orgulhosa!

Aos meus avós, por serem minha base, o meu porto seguro! Eu amo vocês!

Ao meu irmão, que é meu protetor, meu amigo e meu confidente! Regi, obrigada pela sua amizade! Você veio pra alegrar meu coração!

Ao meu pai Reginaldo, que por todos esses anos esteve ao lado da minha mãe ajudando na minha educação.

À D. Perci, Fernando, Maria e Eloá pela força e incentivo.

Aos meus queridos amigos: Marcelo, Kelly, Dani e Nathália. Foi maravilhoso ter conhecido vocês! Obrigada por estarem sempre do meu lado me apoiando em tudo!

À Dedeia, uma pessoa sensacional, carinhosa, que não mediu esforços hora nenhuma para me ajudar.

A todos os integrantes do LITEB, pela temporada em que passamos juntos trabalhando e nos divertindo.

A todos os integrantes do LPT, pela ajuda, pela força e por terem me recebido tão bem!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

ABREVIATURAS E SIGLAS

- 7AAD** – *7-aminoactinomycin D*, 7-aminoactinomicina D
- ACK** – *Ammonium-Chloride-Potassium lysis buffer*, solução para lise de eritrócitos
- ADP** – *Adenosine diphosphate*, adenosina difosfato
- AMP** – *Adenosine monophosphate*, adenosina monofosfato
- APC** – *Allophycocyanin*, alofococianina
- APC** – *Antigen presenting cell*, célula apresentadora de antígeno
- APC-Cy7** – *Allophycocyanin*, alofococianina conjugado ao Cy7
- Arp2/3** – *Actin-related protein-2/3*, proteínas relacionadas à actina 2/3
- ATP** – *Adenosine triphosphate*, adenosina trifosfato
- BCR** – *B cell receptor*, receptor de célula B
- BR** – *Basic region*, região básica
- BSA** – *Bovine serum albumin*, albumina sérica bovina
- CD** – *Cluster of differentiation*, grupo de diferenciação
- Cdc42** – *Cell division control protein 42*, proteína homóloga a 42, controladora da divisão celular
- CTLA-4** – *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*, molécula-4 associada a linfócitos T citotóxicos
- DCs** – *Dendritic cells*, células dendríticas
- DN** – *Double-negative*, duplo-negativo para as moléculas CD4 e CD8
- DP** – *Double-positive*, duplo-positivo para as moléculas CD4 e CD8
- EDTA** – *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etileno di-amino tetracético
- EVH1** – *Ena-Vasp homolog domain*, domínio homólogo a Ena-Vasp
- FITC** – *Fluorescein-5-isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína
- Foxp3** – *Forkhead box p3*, escurfina
- FR4** – *Folate receptor*, receptor de folato
- FSC** – *Forward scatter*, espalhamento de luz frontal
- GBD** – *GTPase-binding domain*, domínio de ligação de GTPase
- GITR** – *Glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene/protein*, gene/proteína relacionado à família de receptores de TNF induzida por glicocorticoides
- GVHD** – *Graft versus host disease*, doença enxerto versus hospedeiro
- IgE** – *Immunoglobulin E*, imunoglobulina E
- IL** – *Interleukin*, interleucina

IPEX - *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked*, desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia associada ao cromossoma X

MHC – *Major histocompatibility complex*, complexo principal de histocompatibilidade

NK - *Natural killer*, exterminadoras naturais

NOD – *Non-obese diabetic*, diabético não-obeso

Nrp1 – *Neuropilin 1*, neuropilina 1

N-WASP – *Neural WASP*, WASP neural

PBS – *Phosphate buffered saline*, solução salina tamponada com fosfato

PD-1- *Programmed cell death-1*, receptor de morte celular programada-1

PE – *Phycoerythrin*, ficoeritrina

Pe-Cy7 – *Phycoerythrin*, ficoeritrina conjugado ao Cy7

PerCP – *Activated peridinin-chlorophyll-protein complex*, complexo proteína clorofila piridina ativado

PPP - *Polyproline domain*, região rica em prolina

RNA – *Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

RPMI - Meio Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro fetal bovino

S1P – *Sphingosine-1-phosphate*, esfingosina-1-fosfato

SP – *Simple-positive*, simples-positivo para as moléculas CD4 e CD8

SPHK1 e SPHK2 – *Sphingosine kinases 1/2*, esfingosina quinases ½

SSC – *Side scatter*, espalhamento de luz lateral

TCR – *T cell receptor*, receptor de células T

TEC – *Thymic epithelial cells*, células epiteliais tímicas

TGF-β – *Transforming growth factor β*, fator de transformação de crescimento β

Th17 – *T helper 17*, T auxiliar 17

Treg – *Regulatory T cells*, Células T regulatórias

VCA - *Verprolin homology domain, cofilin homology domain, acidic region*, domínio homólogo a verprolina, homólogo a cofilina, região ácida

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular

WAS – *Wiskott-Aldrich syndrome*, síndrome de Wiskott-Aldrich

WASP – *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*, Proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich

WAVE1-3 – *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family verprolin homologous 1-3*, homólogo 1(-3) de verprolina da família WASP

WH1 – *Wasp homolog*, domínio homólogo a WASP

WIP - *WASP-interacting protein*, proteína de interação com WASP

WKO – *Wasp knock-out*, Wasp nocaute (camundongo geneticamente deficiente em Wasp)

XLN – *X-linked neutropenia*, neutropenia ligada ao cromossoma X

XLT - *X-linked thrombocytopenia*, trombocitopenia ligada ao cromossoma X

Índice

1. Introdução	
1.1. A Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	1
1.2 WASP: função, domínios estruturais e mutações.....	3
1.3 Efeitos da deficiência de WASP em células do sistema imune.....	6
1.4 Células Treg.....	11
1.4.1 Marcadores de células Treg.....	13
1.4.2 Subpopulações de Treg.....	14
1.4.3 Geração de células Treg no timo.....	16
1.4.4 Mecanismos de ação das células Treg.....	19
1.4.5 Moléculas envolvidas na migração das células Treg.....	22
1.5 As células T regulatórias na Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	23
2. Justificativa / Racional.....	25
3. Objetivos.....	26
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Animais.....	27
4.2. Obtenção de células.....	27
4.3 Anticorpos e compostos fluorescentes.....	28
4.4 Citometria de fluxo.....	28
4.5 Atividade de pStat5.....	30
4.6 Ensaios de sobrevivência/morte celular.....	30
4.7 Ensaios de transmigração <i>in vitro</i>	31
4.8 Imunohistoquímica.....	31
4.9 Análises estatísticas.....	32
5. Resultados.....	33
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	55
8. Referências Bibliográficas.....	56
9. Apêndice.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das conformações inativa e ativa de WASP.....	5
Figura 2. Desenho esquemático de defeitos descritos em células deficientes em WASP.....	8
Figura 3. Desenho esquemático do desenvolvimento das células Treg Foxp3 ⁺	19
Figura 4. Sequência lógica para a análise das subpopulações.....	30
Figura 5. Análise da celularidade do timo e dos valores relativos e absolutos de timócitos DN, DP, CD4 SP e CD8 SP.....	33
Figura 6. Análise dos valores relativos e absolutos da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ Foxp3 ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	34
Figura 7. Análise dos valores relativos, absolutos e MFI da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	35
Figura 8. Análise da expressão de marcadores de ativação de células Treg no timo de camundongos WT e WKO.....	37
Figura 9. Análise dos valores relativos, absolutos e MFI da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ no timo de camundongos WT e WKO.....	38
Figura 10. Análise dos valores relativos e absolutos das populações CD4 ⁺ CD8 ⁻ Foxp3 ⁺ Helios ⁺ e CD4 ⁺ CD8 ⁻ Foxp3 ⁺ Helios ⁻ no timo de camundongos WT e WKO.....	40
Figura 11. Análise dos valores relativos e absolutos das populações CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Helios ⁺ e CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Helios ⁻ no timo de camundongos WT e WKO.....	41
Figura 12. Análise dos valores relativos e absolutos da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ Foxp3 ⁺ 7AAD ⁺ e da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ Foxp3 ⁺ 7AAD ⁺ Helios ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	42
Figura 13. Análise de transmigração de células Treg frente a S1P.....	43
Figura 14. Análise dos valores relativos da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD122 ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	44

Figura 15. Análise dos valores relativos e MFI da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ pSTAT-5 ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	45
Figura 16. Análise dos valores relativos e MFI da população CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ pSTAT-5 ⁺ no timo de camundongos WT e WKO.....	46
Figura 17. Análise dos valores relativos e absolutos das populações de células Treg no baço de camundongos WT e WKO.....	47
Figura 18. Fotomicrografias representativas dos lóbulos tímicos de animais Balb/c WT e WKO.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1. Moléculas utilizadas como marcadores de células Treg em camundongos e humanos.....	14
---	----

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

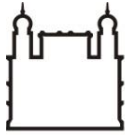
ESTUDO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM WASP

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafaella Ferreira Reis

A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é uma imunodeficiência associada a infecções recorrentes, câncer e autoimunidade. Ela é causada por mutações no gene que codifica a molécula WASP (“Wiskott-Aldrich syndrome protein”), envolvida na reorganização do citoesqueleto de actina em células de origem hematopoiética. Camundongos deficientes em Wasp (WKO) apresentam migração leucocitária e proliferação linfocitária deficientes, e desenvolvem colite. Esse processo inflamatório está associado a eventos de imunodesregulação importantes, como participação exacerbada de células Th2 e diminuição de células T regulatórias (Treg) no timo e baço desses animais. Assim, esse trabalho visa caracterizar as células Treg tímicas e avaliar os mecanismos potencialmente relacionados à diminuição dessas células no timo de camundongos WKO. Nas análises de CD25 e CD122, importantes para a diferenciação de células Treg, observamos uma diminuição na expressão de CD25 na população de células $CD4^+CD8^-Foxp3^+$, além de uma diminuição no número percentual dessa população. As células Treg tímicas de animais WKO apresentaram níveis normais de CD122 e de moléculas de ativação, mas mostraram uma diminuição na expressão da molécula funcional CD39, responsável pela hidrólise tecidual de ATP. Saliente-se ainda que estudos sobre a morte celular *ex-vivo*, a transmigração *in vitro* mediada por S1P e a localização intratímica de células Treg não revelaram diferenças significativas na comparação entre animais WKO e seus controles. De forma interessante, precursores tímicos de células Treg $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ também se apresentaram diminuídos em WKO, assim como as células Treg Helios⁺. Além disso, observamos um aumento importante na expressão basal de pSTAT-5 nas células Treg nos camundongos WKO e também nos precursores dessas células. Nossos resultados indicam uma participação importante da proteína Wasp no desenvolvimento de células Treg tímicas, mas apontam para a necessidade de estudos mais detalhados sobre os mecanismos envolvidos na geração deficiente de células Treg em camundongos WKO.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM WASP

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafaella Ferreira Reis

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an immunodeficiency associated with recurrent infections, malignancies and autoimmunity. It is caused by mutations in the gene encoding WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), a molecule involved in the actin cytoskeleton rearrangements in hematopoietic cells. Wasp deficient mice (WKO) show impaired leukocyte migration and lymphocyte proliferation, and also develop colitis. This inflammatory process is associated with important immunodysregulation events, such as exacerbated participation of Th2 cells and decreased numbers of regulatory T cells (Treg) in the thymus and spleen of these animals. Thus, this study aims to characterize the thymic Treg cells and evaluate the potential mechanisms involved in the decreased number of these cells in the thymus of WKO mice. In the analysis of CD25 and CD122, important molecules for the differentiation of Treg cells, we observed a decreased expression of CD25 in the CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ cells, and a decrease in the percentage number of this population. WKO Treg cells showed normal levels of CD122 and activation molecules, but present a decreased expression of the functional marker CD39, molecule responsible for ATP hydrolysis in the tissues. Also, it is important to point out that studies about *ex vivo* cell death, S1P-mediated *in vitro* transmigration and intrathymic localization of Treg cells revealed no significant differences between WKO animals and their controls. Interestingly, both CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁻ Treg precursors and Helios⁺ Treg cells are reduced in WKO thymus. More over, we also observed an important increase in the basal expression of pSTAT-5 in Treg cells of WKO mice and their precursors. Altogether, our results indicate an important role of Wasp in thymic Treg cell development, and point to the necessity of further studies on the mechanisms involved in the generation of Treg cells in WKO mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Síndrome de Wiskott-Aldrich

A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) foi inicialmente descrita em 1937, quando o Dr. Alfred Wiskott, um pediatra alemão, identificou três irmãos apresentando, logo após o nascimento, número baixo de plaquetas, diarreia sanguinolenta, eczema e otites recorrentes (Wiskott, 1937). Dezesete anos depois, em 1954, o Dr. Robert Anderson Aldrich, um pediatra americano, demonstrou que essa doença era herdada como uma forma recessiva ligada ao cromossomo X (Aldrich *et al.*, 1954). Já em 1994, o gene WAS, implicado 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”), uma proteína reguladora da polimerização do citoesqueleto de actina nas células hematopoiéticas.

WAS é uma rara imunodeficiência, caracterizada por microtrombocitopenia, eczema, imunodeficiência, infecções recorrentes e aumento do risco de desenvolvimento de autoimunidade e de neoplasias malignas (Sullivan *et al.*, 1994). Essa síndrome ocorre com uma incidência de 1 a 10 em um milhão de meninos (Ochs e Trasher, 2006). Pacientes não tratados podem morrer na primeira década de vida (Rosen *et al.*, 1995), e têm como alternativa terapêutica somente o transplante de células-tronco hematopoiéticas.

As hemorragias presentes em pacientes com WAS são consequência da microtrombocitopenia, e das manifestações clínicas mais frequentes nestes pacientes (incidência >80%). Estes sangramentos vão desde um sangramento oral até manifestações mais severas como hemorragia intestinal (Sullivan *et al.*, 1994). Estudos mostram que pacientes com WAS possuem plaquetas com tamanho reduzido, mas a causa disso ainda não está bem determinada. Uma das discussões explana a possibilidade de haver uma remoção anormal de plaquetas devido a uma exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana de plaquetas deficientes em WASP (Shcherbina *et al.*, 2009), o que explicaria a plaquetopenia mas não as alterações morfológicas.

Eczema é uma manifestação típica de pacientes com WAS. As lesões na pele desenvolvem em 80% dos pacientes (Sullivan *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 2004), de forma heterogênea, e em casos mais severos os pacientes se tornam resistentes ao tratamento. Essas lesões cutâneas facilitam a entrada de microrganismos oportunistas, podendo levar os pacientes a infecções recorrentes. Os pacientes ainda desenvolvem alergias e elevados níveis

de IgE, o que pode representar uma possível causa da eczema, mas é uma possibilidade ainda a ser melhor estudada (Imai *et al.*, 2004).

A gravidade da imunodeficiência pode variar dependendo em grande parte dos defeitos que as mutações podem causar na expressão da proteína WASP (Jin *et al.*, 2004). De fato, a perda parcial ou total da expressão de WASP está correlacionada com o fenótipo mais severo da doença (Imai *et al.*, 2004). Assim, é interessante notar que mutações que prejudicam, mas não suprimem a expressão de WASP, podem causar trombocitopenia ligada ao X (XLT; do inglês, “X-linked thrombocytopenia”). Esta doença pode ser crônica (Villa *et al.*, 1995) ou intermitente (Notarangelo 2002), e é considerada uma forma atenuada de WAS, caracterizada por número baixo de plaquetas e em alguns casos imunodeficiência. Além da XLT, a perda parcial de WASP também está presente na neutropenia ligada ao X (XLN; do inglês “X-linked neutropenia”), uma imunodeficiência grave caracterizada por neutropenia e mielodisplasia (Ancliff *et al.*, 2006; Devriendt *et al.* 2001).

Essas mutações são vistas no gene que codifica WASP, expressa em linhagens celulares derivadas de células-tronco hematopoiéticas, e está envolvida na sinalização intracelular e na reorganização do citoesqueleto de actina destas linhagens (Derry *et al.*, 1994; Trasher, 2002). Os estudos em células do sistema imune mostraram disfunção de células T e B, deficiência quimiotática de monócitos e alterações morfológicas em células dendríticas. Particularmente, análises em linfócitos T de pacientes deficientes em WASP revelaram anormalidades na sinalização pelo TCR associados a defeitos na reorganização do citoesqueleto de actina (Molina *et al.*, 1993). Mas, como veremos mais abaixo, as diferentes células de origem hematopoiética, além das plaquetas, têm sido relatadas como sendo afetadas de forma importante pela deficiência genética (Imai *et al.*, 2003).

Manifestações autoimunes são frequentes, podendo atingir aproximadamente 40% dos pacientes (Sullivan *et al.*, 1994), e os primeiros sinais podem ocorrer nos primeiros anos de vida de pacientes com 0 a 5 anos de idade (Dupuis-Girod *et al.*, 2003). Essas manifestações podem ter um valor prognóstico. As manifestações mais comuns são anemia hemolítica, vasculite cutânea, artrite e nefropatia. Outras manifestações incluem neutropenia, púrpura trombocitopênica idiopática e doença inflamatória intestinal (Bosticardo *et al.*, 2008). Particularmente, a inflamação intestinal tem sido encontrada em até 9% dos pacientes com WAS (Ochs e Trasher, 2006).

A administração correta dos tratamentos para pacientes com WAS é um grande desafio, vários estão disponíveis, mas não servem para a cura dos pacientes. O único tratamento que resultou em 73-100% de cura entre os pacientes compatíveis, foi o transplante de medula óssea (Mullen *et al.*, 1993; Moratto *et al.*, 2011). Um tratamento promissor é a terapia gênica, realizada a partir da adição de um transgene funcional. O primeiro ensaio clínico com terapia gênica foi realizado na Alemanha em 2006, utilizando um vetor retroviral, transferindo células CD34⁺ do sangue periférico com o gene corrigido em dez pacientes. Destes pacientes, nove apresentaram aumento significativo na contagem de plaquetas e normalização no número e função de linfócitos T, produção de imunoglobulinas e resposta a vacinas. Os pacientes também melhoraram seu estado clínico, diminuindo os sangramentos e a susceptibilidade a infecções e autoimunidade. No entanto, seis desses pacientes desenvolveram leucemia de células T, devido à inserção do gene retroviral no locus do oncogene LMO-2, causando a proliferação de células T clonais (Boztug *et al.*, 2010; Braun, 2013). Nesse sentido, esse oncogene e outros têm sido relacionados entre os muitos sítios de integração genômica descritos em pacientes submetidos à terapia gênica. Portanto, enquanto a terapia genética mediada por vetor retroviral pode corrigir WAS, ela parece levar um nível de risco inaceitável para a aplicação nesta doença. Outros estudos de terapia gênica *in vivo*, utilizando camundongos WKO, mostraram que pode haver um aumento no número de linfócitos T funcionais nestes animais quando tratados com diferentes sistemas de correção de genes mediados por vetor viral (Uchiyama *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 2003).

1.2. WASP: função, domínios estruturais e mutações

A dinâmica do rearranjo do citoesqueleto de actina é um componente essencial na biologia de células eucariotas, influenciando em diversos processos celulares como migração, adesão, polarização, endocitose e tráfego de vesículas. Uma das principais moléculas responsáveis por esse rearranjo em células de origem hematopoiética é a proteína WASP.

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

A molécula WASP é responsável por responder a sinais que ativam a molécula Cdc42, uma GTPase da família Rho de pequenas GTPases para o início da polimerização do citoesqueleto de actina. Uma importante característica de WASP é a presença de domínios

multifuncionais: i) EVH1 (do inglês, “N-terminal Ena/VASP homology 1), também chamado de WH1 (domínio 1 homólogo a WASP); ii) BR (do inglês ‘basic region’), uma pequena região básica; iii) GBD (do inglês “GTPase-binding domain”), um domínio de ligação interativa com Cdc42 (do inglês “cell division cycle 42”), uma GTPase da família Rho de pequenas GTPases e principal ativadora de WASP; iv) PPP (do inglês “polyproline-rich region”) uma região rica em prolina, que caracteriza sítios de ligação a moléculas contendo domínio SH3; v) 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”) (vide figura 1).

WASP pode estar representado nas células em uma forma autoinibida, um estado inativo, consequência da interação da proteína WASP com a proteína WIP (proteína de interação com WASP, do inglês, “WASP-interacting protein”), que se liga ao domínio EVH1 estabilizando WASP (de la Fuente *et al.*, 2007), e por interações intermoleculares entre BR, GBD e o domínio VCA (Kim *et al.*, 2000).

Após a ativação celular, WASP é recrutada para o sítio de sinalização da membrana para a liberação da sua conformação inativa. Os sinais para a liberação do estado inativo são: através da ligação de Cdc42-GTP (Cdc42 associada a guanosina trifosfato) ao domínio GBD, através 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. Dessa forma, o domínio VCA é liberado, tornando-se exposto, e permitindo a ligação entre o domínio V e actina-G, enquanto o domínio A se liga 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 1). Por fim, como regulação final, WASP fosforilada é então ubiquitinilada e degradada no proteossoma sendo então inativada (Reicher *et al.*, 2012).

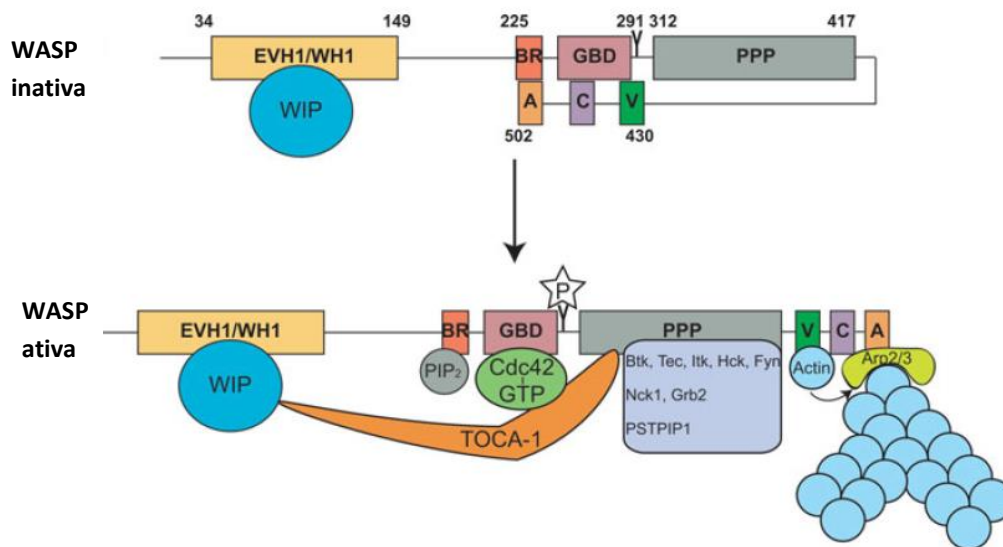


Figura 1. Representação esquemática das conformações inativa e ativa de WASP. A molécula WASP está destacada pela presença de seus domínios funcionais EVH1/WH1, BR, PPP, VCA (segmentos V, C e A), e pela associação com a proteína WIP. WASP pode estar presente na célula em uma forma autoinibida ou em uma forma ativada. Através da ligação de PIP₂ (fosfatidilinositol(4,5)-bifosfato) ao domínio BR, Cdc42-GTP ao domínio GBD, seguido de fosforilação de Y291 (tirosina na posição 291), ligação de Toca-1 e de moléculas adaptadoras à região PPP, o domínio VCA é liberado levando à ramificação e alongamento dos filamentos de actina por Arp2/3 (complexo proteico nucleador de polimerização de actina). Modificado a partir de Massaad *et al.*, 2013.

Aproximadamente 300 mutações diferentes foram descritas no gene *WAS* (Albert *et al.*, 2010), que resultam nas três distintas doenças discutidas anteriormente: a WAS clássica, a XLT, e a XLN. As diferentes condições patológicas relacionadas a uma mesma molécula parecem ter relação direta com as diferentes mutações que podem levar à perda total ou parcial de WASP. Estudo detalhado de duas grandes coortes (da América do Norte e da Europa) de famílias com mutações em WASP mostraram, a partir das centenas de mutações descritas, que o fenótipo clínico grave ou moderado relacionado a WAS ou a XLT tinha influência importante do nível de expressão proteica (Jin *et al.*, 2004). De fato, WAS clássica tende a aparecer quando a mutação conduz a perda total ou quase completa da expressão da proteína.

XLT, a forma mais atenuada de WAS, muitas vezes é resultado de mutações que resultam na reduzida expressão de WASP. Mutações missenses, que resultam em expressão de moléculas WASP mutadas, e mutações no sítio de *splicing*, que resultam em expressão de diferentes moléculas (incluindo pequenas quantidades de WASP normal) produzem fenótipo clínico mais moderado de XLT (Jin *et al.*, 2004). Essas mutações, particularmente na região amino-terminal de WASP (Ariga, 2012), acarretam reduzida expressão de proteínas

parcialmente funcionais que possuem a capacidade de induzir a polimerização de actina. A persistência dos defeitos nas plaquetas em pacientes XLT, na presença dessas proteínas parcialmente funcionais, pode estar relacionada à instabilidade das proteínas mutantes e na incapacidade das plaquetas, uma vez formadas, de reabastecer os estoques de proteínas (Thrasher, 2002).

As mutações vistas em pacientes com XLN são diferentes de WAS e XLT, visto que são definidas como mutações que resultam em ganho de função molecular, sem necessariamente resultar num ganho de função celular. Quatro mutações distintas têm sido descritas para esses casos: L270P, S272P, I294T e I276S (Devriendt *et al.*, 2001; Ancliff *et al.*, 2006, Beel *et al.*, 2009; Thrasher, 2010). O que essas mutações apresentam em comum é a área da molécula atingida, visto que, em todos os casos, as mutações em XLN são vistas na parte interna do domínio GBD. Essas alterações interferem na estabilidade da conformação autoinibida de WASP, gerando uma proteína constitutivamente ativa (Devriendt *et al.*, 2001; Thrasher, 2002).

Analisando-se a regulação funcional de mutação em WASP, alguns estudos sugerem que as mutações mais comuns, que ocorrem no domínio EVH1, resultam em diminuição da afinidade com WIP, uma chaperona para WASP. Perturbação nessa associação pode levar à redução na expressão de WASP devido à maior suscetibilidade a proteólise (Stewart *et al.*, 1999; de la Fuente *et al.*, 2007).

Ainda, é interessante destacar que, na maioria das situações, a ausência de WASP em linfócitos correlacionava-se diretamente com maior frequência e gravidade das infecções, com maior extensão do eczema, e com a presença de doenças autoimunes e tumores malignos (Jin *et al.*, 2004). Nesse contexto, descreveremos a seguir diversos estudos que mostram a influência funcional de WASP nas diferentes células do sistema imune, em particular, nas subpopulações de linfócitos T.

1.3. Efeitos da deficiência de WASP em células do sistema imune

A resposta imune é dependente da perfeita função de todas as células do sistema imune. Células do sistema imune inato e adaptativo necessitam da dinâmica do citoesqueleto de actina para seguir com suas funções. O recrutamento de neutrófilos e monócitos dos vasos sanguíneos para os sítios inflamatórios, por exemplo, depende de alterações morfológicas para a diapedese através do endotélio vascular para o tecido (Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid 2004; Worthylake & Burridge 2001). Nos sítios inflamatórios, a endocitose de

antígenos através da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, requer alterações morfológicas na membrana plasmática (Swanson *et al.*, 2008). A dinâmica do citoesqueleto de actina é essencial para a motilidade de DCs e para a formação de sinapse imunológica durante a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Al-Alwan *et al.*, 2001). Os linfócitos T ativados subsequentemente migram para os locais de inflamação para auxiliar os macrófagos na depuração de antígenos, ou exercer suas funções efetoras, tais como a morte de células infectadas (Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004; Worthylake & Burridge, 2001). Para que todos esses processos sejam realizados pelas células do sistema imune, é necessário o rearranjo do citoesqueleto de actina dessas células. De fato, a ausência da expressão de WASP pode afetar as diversas subpopulações de células do sistema imune (figura 2).

Muitos defeitos em macrófagos e células dendríticas (DCs) deficientes em WASP são descritos, tais como problemas na migração, apresentação antigênica e adesão celular (Bosticardo *et al.*, 2008). A habilidade de migração de DCs para os órgãos linfoides periféricos frente a um estímulo está prejudicada, pois há perda importante de moléculas altamente expressas nas vênulas endoteliais e no endotélio linfático, como CCL21 e CCL19, ligantes de CCR7, essenciais para o tráfego dessas e outras células do sistema imune para sua entrada em linfonodos (de Noronha *et al.*, 2005; Snapper *et al.*, 2005). Quando as DCs recebem um estímulo, elas precisam de WASP para organizar ações como polarização celular, formação de filopódios e podossomos. Na ausência de WASP, a formação de podossomos, estruturas essenciais para adesão celular é prejudicada e a migração e adesão das DCs não são eficientes (Burns *et al.*, 2005; Calle *et al.*, 2004).

Além de remodelagem da actina, a migração celular eficiente geralmente requer interações envolvendo integrinas. Os filamentos de actina e moléculas de integrina estão fisicamente conectados através de proteínas adaptadoras (Puklin-Faucher, & Sheetz, 2009), logo, embora isso não esteja claro, problemas na remodelagem de actina, provavelmente prejudica a função das integrinas. Por exemplo, a família de integrinas $\beta 2$, encontradas em células mieloides, apresentam falhas no seu agrupamento na ausência de WASP (Burns *et al.*, 2004). Um estudo mostrou que neutrófilos deficientes em WASP apresentam problemas no agrupamento de integrinas $\beta 2$ após a adesão, em função do rearranjo prejudicado do citoesqueleto de actina dessas células. Diferentemente das DCs, os neutrófilos não formam podossomos para sua adesão e fixação. Como as células mononucleares, os neutrófilos dependem da sua capacidade em formar agregados de integrinas de alta afinidade para a

função de fixação, e, quando esta função é interrompida, resulta em defeitos na ativação mediada por integrinas (Zhang *et al.*, 2006).

Pacientes com WAS apresentam susceptibilidade a malignidades hematológicas e herpesvíroses, o que sugere deficiência na função de células NK (“natural killer”). De fato, essas células dependem do acúmulo e da reorganização do citoesqueleto de actina para iniciar efetivamente uma sinapse imunológica e sua subsequente função citolítica. Em pacientes com WAS, as células NK apresentam pouca habilidade para a produção de F-actina e, conseqüentemente, não formam uma sinapse imunológica eficiente e apresentam citotoxicidade celular prejudicada (Orange *et al.*, 2003; Gismondi *et al.*, 2004).

Distúrbios na imunidade humoral, com disgamaglobulinemia (níveis elevados de IgA e IgE) e resposta deficiente a antígenos T-independentes (polissacarídeos) em pacientes WASP há muito são conhecidas (Sullivan *et al.*, 1994), mas apenas recentemente os mecanismos envolvidos nesses defeitos têm sido definidos. Estudos *in vitro* mostraram que células B deficientes em WASP apresentam defeitos na polimerização de actina na ativação dependente do BCR (receptor de célula B), e também apresentam problemas na migração em resposta a CXCL13, uma quimiocina importante para o tráfego de linfócitos B (Westerberg *et al.*, 2005). Além disso, a deficiência em WASP prejudica a homeostasia das células B com efeitos mais graves em algumas subpopulações, o que resulta na diminuição seletiva de células B maduras circulantes, e células B presentes na zona marginal do baço (Westerberg *et al.*, 2005; Meyer-Bahlburg *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm apontado para um importante papel regulador intrínseco de WASP em células B. Foi demonstrado, em um modelo de quimeras de medula óssea, que a ausência de Wasp em células B resultava em desregulação da ativação de células B, com conseqüente autoimunidade e mortalidade precoce (Becker-Herman *et al.*, 2011). Em outro estudo subsequente, utilizando camundongos deficientes em WASP de forma seletiva em células B, demonstrou-se que esses animais apresentavam importante redução de células B da zona marginal, menor capacidade de produção de anticorpos para antígenos T-independentes, mas com aumento dos níveis séricos de IgM e de autoanticorpos (Recher *et al.*, 2012).

As células B deficientes em WASP falham em gerar uma resposta imune humoral eficiente *in vivo* como conseqüência de defeitos intrínsecos nessas células, possivelmente por sinalização defeituosa de integrinas e TLR (“toll-like receptors”), e/ou falha na formação de sinapse imunológica (Westerberg *et al.*, 2005; Meyer-Bahlburg A, *et al.*, 2008; Becker-Herman *et al.*, 2011, Recher *et al.*, 2012).

Outra célula alvo fundamental para o quadro de imunodesregulação vista na deficiência em WASP é a célula T. De fato, a reorganização regulada do citoesqueleto de actina é fundamental para a perfeita função das células T, incluindo sinalização e diferenciação ao longo do desenvolvimento, migração através dos tecidos linfoides e órgãos alvo, e execução de funções efetoras. Esta reorganização da actina está intimamente envolvida no estabelecimento de sinapse imunológica entre linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ e células apresentadoras de antígenos (APCs).

Estudos mostram que os linfócitos T dos pacientes e camundongos deficientes em WASP são morfológicamente anormais, a superfície dessas células dispõe de projeções incomuns, e há escassez no número e na estrutura de microvilosidades em sua superfície (Kenney *et al.*, 1986; Gallego *et al.*, 1997). Os linfócitos T deficientes em WASP também podem apresentar 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). Essas alterações encontradas nos linfócitos T caracterizam a maior causa das imunodeficiências observadas em WAS (Massaad *et al.*, 2013).

Pacientes com WAS apresentam uma diminuição no número de células T, possivelmente devido ao seu desenvolvimento anormal no timo. Uma redução no número de células T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes podem ocorrer nesses pacientes, principalmente os mais jovens, contribuindo para a imunodeficiência (Park *et al.*, 2004). É relatado que isso ocorre devido a defeitos na saída do timo para órgãos linfoides periféricos, e também pelo aumento do número dessas células em apoptose (Kawabata *et al.*, 1996; Rengan *et al.* 2000).

Os efeitos de WASP na diferenciação de células Th (do inglês, “T helper”), tendem a ser de alta relevância clínica. Camundongos WKO, apresentam defeitos nas respostas *in vivo* contra o vírus Influenza A, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium bovis*. Estes resultados são consequência da frequência reduzida de células T CD8⁺ e da diminuição da capacidade desta população de proliferar após exposição ao antígeno, devido a pouca secreção de citocinas por células Th1 (Strom *et al.*, 2003; Andreansky *et al.*, 2005). Assim, a produção reduzida de IL-2, IFN- γ (interferon- γ) e TNF (fator de necrose tumoral) secretadas pelas células Th1 em pacientes com WAS podem agravar os defeitos de ativação (Morales-Tirado *et al.*, 2004; Trifari *et al.*, 2006), tornando esses pacientes susceptíveis a infecções virais e outras infecções, podendo acarretar também o aumento do risco de malignidades nesses pacientes (Bosticardo *et al.*, 2009). Por outro lado, nas análises de células T de pacientes com

WAS, tais como aumento de imunoglobulina E (IgE), infecções recorrentes, eczema e também ao desenvolvimento de colite encontrada em camundongos WKO, associada à maior secreção de citocinas por células Th2 no tecido alvo (Ozcan *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2007).

Assim como discutido acima para as células B, eventos de imunodesregulação e autoimunidade podem estar associados diretamente a um efeito direto da ausência de WASP em células Treg. De fato, essas células foram diretamente implicadas em distúrbios de regulação da resposta imune em pacientes e camundongos deficientes em WASP (Humblet-Baron *et al.*, 2007, Maillard *et al.*, 2007, Marangoni *et al.*, 2007; comentado em “WASP helps TReg cells sting their prey”, Research Highlights, Nature Reviews in Immunology, 2007).

Entretanto, como tópico central na discussão deste trabalho, antes de discutirmos em detalhe o impacto da deficiência de WASP em células Treg, na seção a seguir, discorreremos sobre a definição das células Treg e suas principais características.

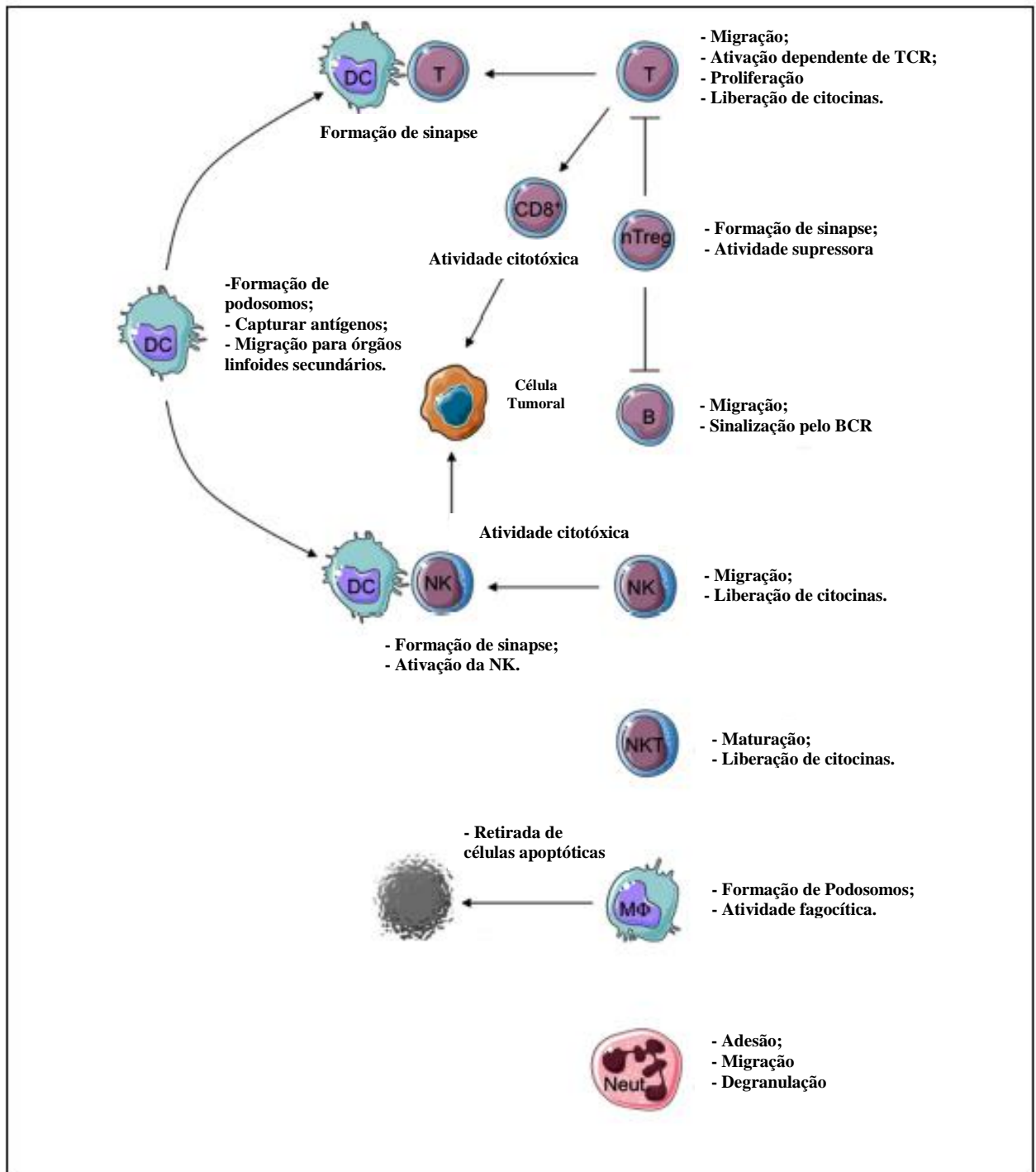


Figura 2. Desenho esquemático de defeitos descritos em células deficientes em WASP. MO, Macrófagos; Neut., Neutrófilo (adaptado de Catucci M, 2012)

1.4. Células Treg

O sistema imune é capaz de, concomitantemente, elaborar estratégias de controle a antígenos estranhos e montar mecanismos de controle da autorreatividade de clones que

escaparam da tolerância central. Para a manutenção da tolerância imune periférica e a homeostasia, as células Treg são centrais.

Na década de 70, foi descrito que a depleção de um subconjunto de células T específicas em animais normais, poderia causar doenças autoimunes, e que a reconstituição dessas células poderia prevenir essas doenças (Nishizuka & Sakakura, 1969). Já na década de 90 foi descrita a ação de uma pequena população de linfócitos T CD4⁺ supressores, que conseguia, de alguma forma, inibir as respostas das células T CD4 e CD8 em enxertos (Hall *et al.*, 1990). Em 1995, essa população foi melhor caracterizada, e estudos demonstraram que essas células expressavam em sua superfície a cadeia α (CD25) do receptor para IL-2 (IL-2R) (Sakaguchi *et al.*, 1995). Essas células, nos órgãos linfoides periféricos de camundongos normais (não imunizados), constituem cerca de 10% das células CD4⁺ e 1% das células CD8⁺ (Holm *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2008; Ohkura & Sakaguchi, 2010).

A participação das células CD4⁺CD25⁺ na regulação das respostas imunes foi demonstrada experimentalmente em ensaios de transferência celular. Foi visto que a depleção de células T CD4⁺CD25⁺ com anticorpo específico, levava a uma alta incidência de reações autoimunes com amplo espectro, enquanto a co-transferência de células CD4⁺CD25⁺ em animais atímicos prevenia completamente a autoimunidade (Sakaguchi *et al.*, 1995). A depleção dessa população resultava em importante falha na supressão de células efetoras, não somente induzindo o aparecimento de doenças autoimunes, como também exacerbando a resposta imune a antígenos não próprios.

O fator de transcrição Foxp3 (do inglês “Forkhead box P3”) foi identificado em 2001 (Bennet *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001). Foxp3 é um marcador preferencialmente expresso em células Treg CD4⁺CD25⁺, distinguindo-as das células T CD4⁺ efetoras e, além disso, é essencial para o desenvolvimento intratímico e função das células Treg (Khattry 2003, Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Uma síndrome autoimune letal em murinos foi observada como resultado de mutação ou inativação gênica de *Foxp3* em células Treg.

De fato, os primeiros estudos sobre o papel de Foxp3 foram realizados em camundongos *scurfy*, que possuem uma mutação espontânea no gene do fator de transcrição Foxp3, presente no cromossomo X, e isso causa uma proliferação exacerbada de linfócitos T CD4⁺, infiltrado inflamatório em múltiplos órgãos, níveis elevados de citocinas inflamatórias e resulta em letalidade em machos homozigotos em aproximadamente quatro semanas após o nascimento (Lyon *et al.*, 1990; Blair *et al.*, 1994; Kanangat *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1999). Os estudos subsequentes foram realizados em pacientes com uma síndrome fatal chamada IPEX

(*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked*), uma rara doença autoimune ligada ao cromossomo X, que também é causada por mutações em *FOXP3*, e é caracterizada por enterite, endocrinopatia autoimune, diabetes do tipo 1, tireoidite e alergias (Chatila *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001).

A expressão ectópica de *Foxp3* em células T $CD4^+$ murinas confere atividade supressora e induz a expressão de moléculas associadas a células Treg, tais como CD25, CTLA-4 (do inglês, “cytotoxic T lymphocyte antigen 4”) e GITR (do inglês, “glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein”) (Khattari *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Essa indução de atividade supressora por expressão de *Foxp3* juntamente com o desenvolvimento de doença autoimune em camundongos mutantes em *Foxp3*, indica que esta molécula é um regulador crítico para a diferenciação e função de células Treg.

1.4.1. Marcadores de células Treg

Além de *Foxp3*, outros marcadores são de grande importância para identificação das células Treg. Essas células expressam em sua superfície CD25, como já descrito, e são fenotipicamente descritas como $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

Além da cadeia α (CD25), é expresso nas células Treg, cadeia β (CD122) e a cadeia γ (CD132) do IL-2R, formando então um complexo de alta afinidade para IL-2, que é importante para o desenvolvimento das células Treg (Thornton *et al.*, 2004).

Alguns grupos sugeriram que a falta do marcador de superfície a cadeia α (CD127) do receptor para IL-7 pode ser uma indicação alternativa para a identificação das Treg, pois, a expressão de *Foxp3* e a habilidade supressora de células T $CD4^+$ são vistas em células que expressam poucos níveis de CD127. No entanto, células T $CD4^+$ efectoras também tendem a expressar poucos níveis de CD127, concluindo que a pouca expressão desta molécula sozinha, não pode ser utilizada para discriminar Treg de células T efectoras (Mazzucchelli & Durum, 2007). Assim como CD127, outras duas moléculas têm sido bastante utilizadas para descrever Treg, mas não podem ser utilizadas como marcadores exclusivos: CTLA-4 e GITR.

Alternativamente, a expressão de CD62L também chamada de L-selectina, pode ser usada para diferenciar Treg, porém não é restrita a esse grupo de células. As células Treg apresentam-se fenotipicamente como $CD25^{hi}CD127^{low}CD62L^+$ e, por outro lado, as células recém-ativadas são $CD62L^{low}$ (Hamann *et al.*, 2000).

Diversas outras moléculas estão sendo adicionadas como marcadores de células Treg (vide Tabela 1).

Tabela 1. Moléculas utilizadas como marcadores de células Treg em camundongos e humanos.

Molécula	Expressão	Camundongo	Humano	Comentário
CD25	Alta/Supefície	Sim	Sim	Também expresso em células Tefetoras ativadas
Foxp3	Alta/Intracelular	Sim	Sim	Também expresso em células Tefetoras ativadas
CTLA-4	Alta/Supefície	Sim	Sim	Também expresso em células Tefetoras ativadas
GITR	Alta/Supefície	Sim	Sim	Também expresso em células Tefetoras ativadas
CD127	Baixa/Supefície	Sim	Sim	Pouco regulada em células Tefetoras ativadas
CD62L	Alta/Supefície	Sim	ND	Expressa em células T efetoras naive, denota um subconjunto de células Treg com capacidade supressora superior
PD-1/CD279	Alta/Intracelular, superfície?	Sim	Sim	Quando expressa na superfície, distingue células T efetoras ativadas de células Treg
CD39	Alta/Supefície	Sim	Sim	
CD44	Alta/Supefície	Sim	ND	Subconjunto produtoras de IL-10
MHCII/HLA-DR	Alta/Supefície	ND	Sim	Subconjunto com capacidade supressora superior
LAP	Alta/Supefície	Sim	Sim	Subconjunto com capacidade supressora superior
CD103	Alta/Supefície	Sim	ND	Expresso em 30% de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg efetoras/memória com alta produção de IL-10
CCR6	Alta/Supefície	Sim	Sim	
LAG-3	Alta/Supefície	Sim	ND	Expresso em células Treg ativadas
GARP	Alta/Supefície	ND	Sim	Expresso em células Treg ativadas
Galectina-1	Alta/Supefície	Sim	Sim	
Galectina-10	Alta/Intracelular	ND	Sim	
Helios	Alta/Intracelular	Sim	Sim	Expresso em tTregs
TNFRSF25	Alta/Supefície	Sim	ND	

ND – Não determinado. Tabela adaptada a partir de (Schmetterer *et al.*, 2012).

1.4.2. Subpopulações de Treg

As células Treg são representadas por duas subpopulações: 1) tTreg, Treg derivada do timo, também descrita como nTreg, para Treg natural; 2) pTreg, Treg periférica, também definida como iTreg, para Treg induzida, ou aTreg, para Treg adaptativa (Abbas *et al.*, 2013).

As células tTreg são geradas no timo, através do reconhecimento a antígenos próprios. A alta afinidade da interação entre o complexo MHC-peptídeo e o TCR são necessários para esse processo. Elas também precisam de sinal co-estimulatório de CD28, visto que em camundongos deficientes em CD28 essas células não se desenvolvem (Salomon *et al.*, 2000).

Essa subpopulação tem a expressão de Foxp3 como principal regulador no seu desenvolvimento e na sua função supressora. Embora IL-2 e TGF- β tenham uma papel importante na manutenção dessas células, ambas citocinas têm papel redundante no desenvolvimento das tTreg, visto que em camundongos *knockout* para IL-2 e camundongos *knockout* para TGF- β as células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aparecem no timo (Piccirilo *et al.*, 2002).

Já as células pTreg, são células Foxp3⁻ induzidas a expressar Foxp3 na periferia (Lin *et al.*, 2007; Curotto-de-Lafaille & Lafaille, 2009; Thornton *et al.*, 2010) e necessitam de TGF- β e de seus receptores. A ausência dessas moléculas impedem a indução de Foxp3 e a subsequente capacidade supressora (Lu *et al.*, 2010). Similarmente, IL-2 tem papel fundamental na diferenciação das pTreg, pois TGF- β falha em induzir pTreg Foxp3⁺ em camundongos deficientes em IL-2 (Zheng *et al.*, 2007). Para a conversão dos precursores CD4⁺CD25⁻ periféricos a CD4⁺CD25⁺, é necessário que ocorra ótima sinalização pelo TCR para desencadear o desenvolvimento das pTreg (Zheng *et al.*, 2006).

Embora as células Treg representem uma linhagem celular estável para manter a homeostasia imune, essas células possuem muita plasticidade. Estudos mostram que as tTreg não são estáveis em condições inflamatórias, e que podem se converter de tTreg em Th17 na presença de IL-6 (Zheng *et al.*, 2008). Ao contrário, as pTreg, não exibem esta plasticidade, e mantêm sua estabilidade sob condições inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que essas subpopulações podem ter funções e papéis diferentes na resposta imune adaptativa (Horwitz *et al.*, 2008).

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”), Nr1p1 (neuropilina 1), Helios e CD73 comparados com as pTreg (Yadav *et al.*, 2012). É importante destacar que o fator de transcrição Helios, pertencente à família Ikaros, e regulado positivamente em células tTreg, foi recentemente apontado como um potencial marcador que permite a distinção entre tTreg e pTreg (Thornton *et al.*, 2010; Getnet D *et al.*, 2010). Este fator de transcrição é expresso em células tTreg humanas e pode se ligar ao promotor de *FOXP3*, o que sugere que Helios pode ter um papel crítico na expressão de *FOXP3* (Getnet *et al.*, 2010). Helios aparece primeiramente no estágio duplo-negativo 2 (Lin^{low}CD44⁺CD117^{high}CD25⁺) do desenvolvimento tímico, e é expresso em quase 100% das células tTreg. A sua expressão também foi vista em aproximadamente 70% de células Foxp3⁺ nos tecidos linfoides periféricos em camundongos e humanos. O total de células Treg na periferia é constituído de células derivadas do timo (tTreg) e de células induzidas na periferia

(pTreg); como 70% dessas células expressam Helios, os primeiros estudos sobre a expressão desse marcador sugeriram que 70% das Treg da periferia são tTreg (Thornton *et al.*, 2010). Esse postulado também se fundamentou nas demonstrações de que a totalidade das células Foxp3⁺ na periferia de camundongos recém-nascidos são Helios⁺, e que células pTreg induzidas com TGF- β *in vitro* e células pTreg antígeno-específicas induzidas *in vivo* não expressaram Helios (Thornton *et al.*, 2010). Recentemente, entretanto, algumas pesquisas têm argumentado contra esse postulado. Foi descrito que Helios pode ser induzido durante a ativação e proliferação de células T, mas regride sob condições de repouso, não somente em Treg humanas e murinas, mas também em células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Akimova *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que Helios pode ser expresso em pTreg Foxp3⁺ *in vitro* e *in vivo* em células T CD4 carreando TCR transgênico sob estímulos com seu antígeno específico e na presença de IL-2 e TGF- β (Verhagen & Wraith, 2010). Estes dados sugerem que, dependendo do método de ativação e condições específicas, pode se verificar a expressão de Helios em células pTreg. Saliente-se, entretanto, que esses achados não estão bem explorados em populações de células T CD4 com TCR não-transgênico (Zabransky *et al.*, 2012).

1.4.3. Geração de células Treg no timo

O timo é um órgão linfoide primário, essencial para o desenvolvimento das células T, sendo responsável pela formação de um repertório capaz de combater possíveis patógenos estranhos ao organismo sem comprometer a tolerância ao próprio. Esta tolerância é majoritariamente garantida pelo timo, quer pela eliminação de linfócitos potencialmente autorreativos, quer pela produção de uma população de células T (Treg), responsáveis pelo controle da resposta imune, particularmente no contexto de processos autoimunes e inflamatórios.

Na medula óssea, são gerados os progenitores linfoides, que migram para o timo através das vênulas pós-capilares localizadas na região córtico-medular e continuam os passos subsequentes de sua diferenciação. Em camundongos, os progenitores mais imaturos encontrados no timo possuem o fenótipo duplo-negativo (CD4⁻CD8⁻)CD3⁺CD44⁺CD25⁻CD117^{high} e são classificados em células DN1(duplo-negativo 1), que são os primeiros progenitores tímicos (Wu *et al.*, 2006). Esses progenitores vão se diferenciar em células DN2, que possuem o fenótipo CD4⁻CD8⁻Lin^{low}CD44⁺CD117^{high}CD25⁺ e migram para o córtex médio que é a zona de entrada do timo (Porritt *et al.*, 2004). No estágio DN3 ocorre a diminuição da expressão de CD44 e de CD117, e nessa fase, começa a ocorrer rearranjos dos

genes que codificam as cadeias do TCR. Deste estágio então em diante, as recombinações dos genes para as cadeias γ e δ vão dar origem às células T $\gamma\delta$, e as recombinações dos genes para a cadeia β associada à cadeia pré-T α , vão formar um pré-TCR juntamente com componentes do complexo CD3. Rearranjos mal sucedidos induzem a morte celular por apoptose (Takahama, 2006).

A partir dessa fase de formação do pré-TCR, as células se diferenciam para o estágio DN4, $CD4^+CD8^+CD44^+CD25^-$ e essa fase ocorre na zona tímica subcapsular. A expansão destas células ocorre em consequência de resposta a fatores de crescimento e do rearranjo do gene da cadeia β do TCR (Xing & Hogquist, 2012). Nesta fase da diferenciação intratímica, as células migram através do córtex em direção à medula tímica passando para o estágio DP (duplo-positivo), expressando então simultaneamente CD4 e CD8. A recombinação somática do gene da cadeia α do TCR nessas células resulta em um repertório extremamente vasto de receptores $\alpha\beta$. A partir deste ponto, a avidéz e a afinidade entre o TCR presente nos timócitos e os complexos MHC-peptídeo próprio nas células epiteliais tímicas e APCs determinam o destino dos timócitos. Quando as células DP que expressam TCRs não se ligam aos complexos MHC-peptídeo próprio, morrem por negligência. Quando as células DP possuem baixa ou moderada afinidade para os complexos MHC-peptídeo próprio, elas são selecionadas positivamente e se diferenciam em células SP (simples-positivas) que expressam $CD4^+$ ou $CD8^+$. O processo de seleção positiva é altamente estrigente e permite que as células SP tornem-se células funcionalmente competentes e aptas a sair do timo e povoar órgãos linfoides periféricos. Quando as células DP possuem alta afinidade para os complexos MHC-peptídeo próprio, ficam sob ação de mecanismos de indução de autotolerância, que compreendem principalmente os processos de deleção clonal, edição de receptor, anergia e desvio clonal (Xing & Hogquist, 2012).

É importante destacar que o processo de desvio clonal define a seleção intratímica de células Treg (Xing & Hogquist, 2012). O desenvolvimento das células Treg (Figura 3) ocorre após o reconhecimento de antígenos próprios apresentados por mTEC (células epiteliais da medula tímica) e DCs com avidéz/afinidade relativamente altas, próximo ao limiar que as levaria à seleção negativa (Liston & Rudensky, 2007).

Além da afinidade da interação entre o TCR e o complexo MHC-peptídeo próprio, a intensidade da interação entre moléculas acessórias e seus ligantes nas células estromais tímicas – como por exemplo, CD40, ICAM-1, CD80 e CD86 – contribuem para a geração das

células Treg. A falta dessas moléculas resulta na substancial redução das Treg no timo e na periferia (Sakaguchi, 2005).

É importante ressaltar que os sinais derivados da interação dos receptores CD80 and CD86 são de grande importância para a seleção negativa das células T no timo e, também, possuem um papel importante na ontogenia das células Treg (Buhlmann *et al.*, 2003). De fato, camundongos deficientes em CD28 apresentam uma diminuição de células Treg no timo e nos tecidos periféricos (Saloman *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2005). Estudos sugerem que CD28 fornece um sinal intrínseco para o desenvolvimento das Treg. Além disto, possibilita uma maior produção de IL-2 (Lio *et al.*, 2010), que é necessária para a sobrevivência das células Treg (Burchill *et al.*, 2008; Lio & Hsieh, 2008; Vang *et al.*, 2008).

A molécula TGF- β também tem sido implicada no desenvolvimento das células Treg, mas seu papel ainda precisa ser melhor entendido. Dados recentes sugerem que TGF- β participa de sinais durante o início do desenvolvimento das Treg, e, portanto, pode ser outro sinal chave na discriminação entre deleção clonal e desvio clonal (Ouyang *et al.* 2010). A ausência combinada de ambas as vias de sinalização por IL-2 e TGF- β , levam à total ausência de Treg no timo (Liu *et al.*, 2008).

O papel de IL-2 na diferenciação e homeostasia das células tTreg tem sido muito estudado. Estudos demonstraram que camundongos deficientes em IL-2 ou CD25, foram totalmente privados de células Treg na periferia, mas não no timo (D’Cruz & Klein, 2005; Fontenot *et al.*, 2005), sugerindo que IL-2 é de suma importância na homeostasia das Treg na periferia, mas não para a geração intratímica dessas células. O que torna esse assunto intrigante, é que camundongos duplamente deficientes em IL-2 e IL-15, ou CD122 que é um receptor para a cadeia β de IL-2 e IL-15, apresentaram quase completa depleção de células tTreg (Burchill *et al.*, 2007; Soper *et al.*, 2007), demonstrando que a sinalização por CD122 é essencial para a diferenciação das tTreg. Em níveis moleculares, a sinalização por CD122 é necessária para a translocação de STAT-5 para o núcleo, para ajudar na indução da expressão de Foxp3. As moléculas STAT participam da transdução de sinais após o estímulo celular por citocinas, fatores de crescimento e hormônios. São descritas sete moléculas como membros da família STAT. Nas células Treg as proteínas STAT-5 têm sido reconhecidas como essenciais para a sinalização devido ao seu papel na via de sinalização IL-2/IL-2R (Burchill *et al.*, 2007). Estudos mostram que camundongos duplo-nocautes para STAT-5a e STAT-5b exibem autoimunidade similar aos camundongos nocautes para IL-2 ou IL-2R, o que demonstra a

importante contribuição das moléculas STAT-5 no desenvolvimento das células Treg (Snow *et al.*, 2003).

Outra molécula que pode estar envolvida no desenvolvimento das células Treg é o CD70. Esta molécula é constituinte da família TNF e está expressa em células da medula tímica: células mTECs (células epiteliais tímicas medulares) e DCs. O receptor para CD70, o CD27, é expresso em timócitos no estágio pré-T em diante (Gravestain *et al.*, 1996; Igarashi *et al.*, 2002), e, em humanos, está expresso em timócitos DP CD4⁺CD8⁺ (Martorell *et al.*, 1990). Foi recentemente descrito que a interação de CD70-CD27, contribui para o desenvolvimento de células Treg (Coquet *et al.*, 2013). Camundongos deficientes em CD70 foram utilizados para demonstrar que CD70 em mTECs e DCs contribuem para o desenvolvimento de Treg, visto que esses camundongos apresentaram uma redução na frequência e no número absoluto de células CD4⁺Foxp3⁺. Foi observado também que as interações de CD70-CD27 no timo, melhoram a seleção positiva de células Treg, e que, a partir dessas interações, células Treg são resgatadas da apoptose, sem afetar quantitativamente o desenvolvimento de células T convencionais. Estes estudos sugerem que mTECs e DCs podem criar nichos celulares na medula tímica e os sinais promovidos por CD70-CD27 ajudam no desenvolvimento das células Treg (Coquet *et al.*, 2013).

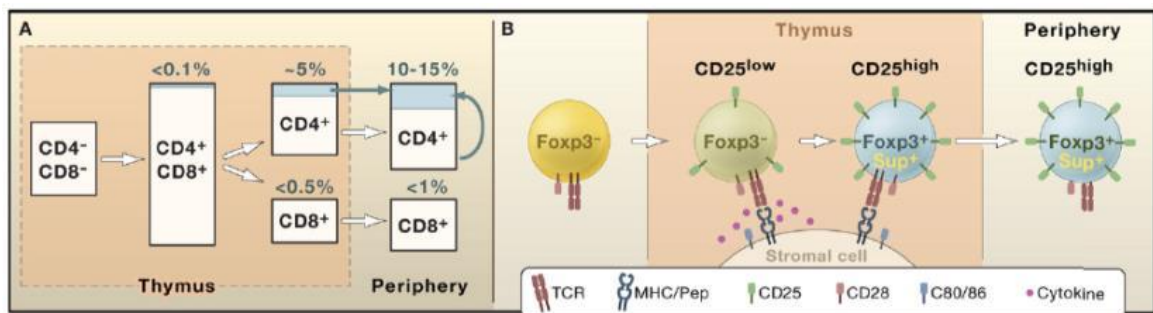


Figura 3. Desenho esquemático do desenvolvimento das células Treg Foxp3⁺. A) A porcentagem de células Foxp3⁻ em cada população de timócitos. Na periferia, células CD4⁺Foxp3⁻ podem se diferenciar em células Foxp3⁺ sob certas condições. B) Desenvolvimento de células Treg Foxp3⁺ dependente de interações com as células estromais tímicas. Timócitos CD4⁺CD8⁻Foxp3⁻ se diferenciam em CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺, quando recebem sinais produzidos pelas interações entre TCR e complexo MHC-peptídeo próprio e moléculas co-estimulatórias, como CD28 e seus ligantes CD80 e CD86, e/ou via citocinas. Logo, a expressão de Foxp3 determina a atividade supressora e estabiliza a função das Treg e seu fenótipo (expressão de CD25). A cor azul indica os timócitos que possuem função supressora (Sup⁺) (Sakaguchi *et al.*, 2008).

1.4.4. Mecanismos de ação das células Treg.

O fator de transcrição Foxp3 tem sido apresentado como responsável por orquestrar os programas moleculares envolvidos na função das células Treg. Ele tem papel ativo na maturação e atividade funcional das células Treg. Um estudo mostrou que Foxp3 interage

com NFAT e após sua cooperativa ligação ao DNA ocorre regulação da transcrição de vários outros genes (Wu *et al*, 2006). Como este fator de transcrição controla o programa de expressão dos genes para a função de Treg ainda não é bem compreendido. Mas, sabe-se que os genes alvos de Foxp3 regulam positivamente os genes essenciais para a função supressora ou a repressão transcricional de citocinas presentes nas respostas inflamatórias (Yagi *et al*, 2004). Entre os alvos de Foxp3 estão os 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).

Na evolução dos estudos feitos com as células Treg, uma necessidade que precisava ser abordada, era o mecanismo de ação dessas células *in vivo*. Então foi desenvolvido um modelo de estudo para análise da função das Treg *in vitro* (Thornton & Shevach, 1998; Takahashi *et al*, 1998), que mimetiza a função dessas células *in vivo*. Muitas moléculas foram identificadas, processos que contribuíam para as atividades supressoras de Treg também foram estudados, mas, ainda não está claro se estes mecanismos esclarecem como estas células atuam *in vivo* (Shevach, 2009).

A maioria dos estudos sobre ação das Treg tem demonstrado que essas células medeiam a supressão inibindo a indução de mRNA de IL-2 (e mRNA para outras citocinas efetoras) pelas células T Foxp3⁻ (Thornton and Shevach, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Oberle *et al.*, 2007). Outra possibilidade levantada foi de que as células Treg podiam competir com as células T Foxp3⁻ por IL-2, consumi-la, e inibir a proliferação das células T efetoras, resultando em uma forma de apoptose dependente do fator pró-apoptótico Bim (Pandiyani *et al.*, 2007). As células Treg podem se apresentar como eficientes competidoras por possuírem não só CD25 em alta densidade na membrana, mas também CD122 e CD132, visto que as três cadeias em conjunto formam o receptor de alta afinidade para IL-2.

Em modelos experimentais *in vivo*, o papel das citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β na resposta imunológica já é bastante descrito. Além dessas, outra citocina produzida por células Treg identificada como portadora de potente função imunossupressora é a IL-35, um membro da família da IL-12 (Collison *et al*, 2007), que depende do contato célula-célula para sua produção máxima.

Uma molécula secretada que pode potencialmente iniciar um papel a partir da interação das células Treg com as DCs ou com outra célula T, é a galectina-1, um membro conservado da família das proteínas de ligação a β -galactosídeos (Garin *et al*, 2007). Galectina-1, secretada como um homodímero e que se liga em glicoproteínas como CD45,

CD43 e CD7, é preferencialmente expressa em células Treg, e é regulada positivamente mediante a ativação de TCR. A participação dessa glectina na interação entre as células Treg e células T efetoras, pode levar ao bloqueio do ciclo celular e apoptose, e também à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Shevach, 2010).

Outro mecanismo utilizado pelas células Treg para supressão é a citólise de células-alvo. Células Treg ativadas a partir de uma combinação de anticorpos anti-CD3 e anti-CD46 expressam granzima A e matam células T CD4⁺ e CD8⁺ em um mecanismo dependente de perforina e independente de Fas-FasL (Grossman *et al.*, 2004). A ativação de células Treg de camundongos também resulta na regulação de expressão de granzima B, e então as células Treg matam as células efetoras por um mecanismo dependente da granzima B, mas independente de perforina (Gondek *et al.*, 2005). É importante destacar que células Treg deficientes de granzima B tem atividade supressora reduzida *in vitro* (Shevach, 2010).

Um mecanismo importante usado pelas Treg é fazer com que haja inibição da iniciação e diferenciação de células T efetoras. Logo, alguns de seus recursos para isso, é afetar a função das APCs. As células Treg expressam CTLA-4, uma molécula que participa do bloqueio funcional dos sinais de co-estimulação de células T efetoras, 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 (Onishi *et al.*, 2008).

Outra molécula de superfície celular que pode desempenhar um papel na supressão da função de DCs é a LAG-3 (CD223), que é um homólogo de CD4 que se liga à moléculas de MHC de classe II, presente nas DCs, com alta afinidade. Essa ligação pode resultar em um sinal inibidor mediado por ITAM que suprime a maturação e a capacidade imunoestimulante das DCs (Liang *et al.*, 2008).

A Nrp1 é uma outra molécula expressa nas Treg murinas que tem sido proposta como participante na interação inicial das células Treg com as DCs. Nrp1 é um receptor para as semaforinas de classe III e um co-receptor para VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Este receptor é expresso em células Treg e pode ser induzida pela expressão ectópica de Foxp3 em células T Foxp3⁻ (Sarris *et al.*, 2008). Esta molécula promove longas interações entre Treg e DCs imaturas, impossibilitando a ligação de células T *naive* às DCs e dando uma vantagem para as células Treg sobre células de T *naive*, sob condições em que o antígeno é um limitador.

No sistema imune, o ATP (adenosina trifosfato) extracelular é um indicador de destruição tecidual e pode exercer papel inflamatório. A concentração de ATP intracelular é elevada, e quando há dano celular, quantidades substanciais são liberadas, e podem ser detectadas por receptores purinérgicos. A molécula CD39 atua fazendo a hidrólise de ATP ou ADP para AMP, e é expresso em células B, células dendríticas, em todas as células Treg de murinos e, em cerca de 50% das células Treg humanas (Borsellino *et al.*, 2007). Logo, a inativação catalítica de ATP extracelular por CD39, é considerado um mecanismo anti-inflamatório usado pelas células Treg.

1.4.5. Moléculas envolvidas na migração das células Treg.

O tráfego das células Treg para várias partes do corpo em diferentes estágios de desenvolvimento, maturação e ativação, é mediado por uma gama de citocinas, integrinas, quimiocinas e seus receptores correspondentes. Nos últimos anos, estudos genéticos têm mostrado a importância de muitos receptores necessários para o *homing* de células Treg, tanto para a distribuição dessas células nos tecidos quanto para a sua função.

A integrina CD62L é uma molécula crucial para o *homing* de células Treg. Recentes estudos sugerem que células $CD4^+CD25^+CD62L^+$ são capazes de suprimir a ativação de células T *in vitro* e são eficientes em proteger de GVHD (doença enxerto versus hospedeiro) (Ermann *et al.*, 2005), retardam o diabetes em camundongos NOD (do inglês “Non-obese diabetic”) (Szanya *et al.*, 2002). As células $CD4^+CD25^+CD62L^+$ podem migrar para os linfonodos de forma mais eficiente do que a população de células $CD4^+CD25^+CD62L^-$. Quando CD62L é bloqueado por anticorpos específicos, a expansão das células Treg nos linfonodos é reduzida e resulta na rejeição de enxertos alogênicos (Ochando JC *et al.*, 2002), indicando que CD62L pode ser essencial para o tráfego de células Treg murinas de forma eficiente para os linfonodos.

O receptor de quimiocina CCR7 é outra molécula importante para o *homing* de células imunes. De fato, a perda de CCR7 bloqueia a migração de células Treg para os linfonodos, e inibe sua função em modelos experimentais de colite (Schneider *et al.*, 2007).

A molécula de adesão CD44 é o principal receptor de ácido hialurônico. Múltiplas funções e respostas celulares têm sido atribuídas à ativação de CD44, incluindo a indução de motilidade celular, ativação de respostas de sobrevivência celular e promoção de adesão celular (Nandi A *et al.*, 2000). Embora CD44 tenha uma grande distribuição tecidual, a sua

expressão durante estágios iniciais de diferenciação de linfócitos em progenitores sugere um envolvimento funcional dessa molécula no *homing* e colonização tímica de precursores linfocitários (Khaldoyanidi *et al.*, 1996). Além disso, o fenótipo da população de células Treg CD44^{hi}, indica que essas células estão em estado de ativação. Essa molécula pode promover a proliferação de células Treg após a sua ligação a quantidades de ácido hialurônico na matriz extracelular (Bollyky *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm mostrado que a sinalização por S1P (esfingosina-1-fosfato) um lipídeo bioativo, inicia um papel importante em múltiplos fenômenos fisiológicos, incluindo angiogênese, permeabilidade vascular, inflamação, e é indispensável para a saída de linfócitos no timo, baço e linfonodos (Daniel *et al.*, 2012). Camundongos deficientes em SPHK1 e SPHK2 (esfingosina quinases 1/2), moléculas responsáveis pela produção celular de S1P, apresentam diminuição de S1P no plasma e nos vasos linfáticos e, assim, o egresso de linfócitos é muito diminuído (Pappu *et al.*, 2007) e há um acúmulo de timócitos maduros no timo (Zachariah *et al.*, 2010). As células Treg expressam em maiores quantidades o receptor 1 de S1P na periferia (S1P1), o que pode sugerir que S1P também dirige os processos de migração de Treg, obedecendo aos mesmos princípios de migração dos outros grupos de linfócitos T.

1.5. As células T regulatórias na Síndrome de Wiskott-Aldrich

A autoimunidade é uma complicação importante e muito comum em pacientes com WAS, e geralmente está presente já nos primeiros anos de vida destes pacientes podendo ocorrer em casos graves e mais atenuados da doença (Imai *et al.*, 2003). Entre as subpopulações de células T que moldam as respostas imunes, são as células Treg que possuem a função de manutenção da tolerância periférica, sendo necessárias para a supressão de respostas autoimunes. Assim, a aparente incongruência entre a presença de importante imunodeficiência concomitante a eventos de autoimunidade levaram à hipótese de que a deficiência em WASP poderia afetar diretamente as células Treg (Adriani *et al.*, 2007). Nesse contexto, diversos estudos apontam para defeitos funcionais em células Treg de pacientes com WAS e em camundongos deficientes em Wasp (Adriani *et al.*, 2007; Humblet-Baron *et al.*, 2007; Maillard *et al.*, 2007; Marangoni *et al.*, 2007).

Em células Treg deficientes em WASP, os níveis de expressão de marcadores de ativação como CD25, por exemplo, estão mais baixos que em células Treg normais, e a sua capacidade supressora pode ser resgatada parcialmente *in vitro* pela administração de IL-2

exógena (Humblet-Baron *et al.*, 2007). Este fato é importante, pois, células T efetoras deficientes em WASP secretam pouco IL-2, podendo aumentar a disfunção intrínseca das células Treg (Humblet-Baron *et al.*, 2007), que são indexadas a células T convencionais por meio dessa citocina (Freitas *et al.*, 2006). Além disso, a ausência de WASP pode implicar em distúrbios na localização tecidual e capacidade funcional dessas células (Humblet-Baron *et al.*, 2007; Maillard *et al.* 2007). As células Treg WASP^{-/-} exibem pouca capacidade para expansão periférica, reduzida atividade supressora sobre células T efetoras *in vitro*, defeitos na secreção de IL-10 e incapacidade para mediar tolerância *in vivo*. Estudos mostram que o desenvolvimento das células Treg no timo é normal, e que a expressão de Foxp3 não é afetada pela deficiência em WASP nas células Treg (Humblet-Baron *et al.*, 2007; Maillard *et al.*, 2007; Marangoni *et al.*, 2007).

As células do sistema imune de camundongos WKO apresentam muitas características semelhantes à doença humana, incluindo defeitos na migração, na formação de podossomos, na sinalização pelas células T e B, na geração de respostas imunes eficientes e desenvolvem autoimunidade (Snapper *et al.*, 1998; Westerberg *et al.*, 2005). A maioria dos camundongos WKO desenvolve doença inflamatória intestinal limitada ao cólon (Snapper *et al.*, 1998; Klein C *et al.*, 2003) sugerindo que um defeito numérico ou funcional de células Treg possam estar implicados nessa patologia.

De fato, estudos de indução de colite por transferência de células CD45RB⁺ em camundongos SCID demonstrou que as células Treg de camundongos WKO são incapazes de impedir o desenvolvimento desse processo inflamatório (Maillard *et al.*, 2007). Além dos efeitos da deficiência de WASP nas células Treg, outras alterações na função imune provavelmente podem contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, e pode variar dependendo do tipo de processo autoimune e do tecido afetado. Um exemplo é a possibilidade de defeitos na fagocitose de células apoptóticas, e a produção de autoanticorpos devido a intrínseca disfunção de células B.

As células Treg WASP^{-/-} 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).

Assim, o aparecimento de autoimunidade no contexto da deficiência em WASP parece refletir, pelo menos em parte, em defeitos na homeostasia das células Treg e na sua função. Isso revela um papel importante de WASP na regulação das principais atividades celulares para o controle das células T e B autorreativas e na manutenção da auto-tolerância.

2. Justificativa / Racional

A deficiência em WASP pode acarretar vários distúrbios imunológicos devido a defeitos nas células do sistema imune, como por exemplo, desenvolvimento de autoimunidade. De fato, doenças de natureza autoimune são encontradas em pacientes com WAS, como, anemia hemolítica, neutropenia, artrite e doença inflamatória intestinal, vista também em camundongos WKO. Alguns estudos têm mostrado que as células Treg, definidas pelo fenótipo $CD4^+Foxp3^+$, e que possuem função imunossupressora em processos inflamatórios e autoimunes, estão diminuídas em camundongos WKO (Maillard *et al.*, 2007). Esses achados sugerem que anormalidades ocorridas nas células Treg, devido a ausência de Wasp, podem contribuir para processos de imunodesregulação, que resultam no desenvolvimento de colite nesses camundongos (Maillard *et al.*, 2007).

Estudos vêm mostrando um potencial papel de WASP no desenvolvimento das células Treg, e o comprometimento das respostas imunes consequentes à disfunção dessas células. Entretanto, os mecanismos que levam à diminuição de células Treg em camundongos WKO ainda não foram completamente esclarecidos. Dessa forma, decidimos estudar as células Treg tímicas de camundongos geneticamente deficientes em Wasp, abordando os potenciais mecanismos envolvidos na deficiência numérica dessas células. Julgamos que esses estudos podem contribuir para um melhor entendimento da imunodesregulação associada à deficiência em WASP.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a população de células Treg no timo de animais WKO e abordar possíveis mecanismos que podem levar à diminuição de células Treg no timo de camundongos deficientes em Wasp (WKO), modelo experimental para a síndrome de Wiskott-Aldrich.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente a população de células Treg no timo de animais WKO, avaliando a expressão dos fatores de transcrição Foxp3 e Helios, dos marcadores de diferenciação CD25 e CD122, dos marcadores de ativação CD44 e CD69, e dos marcadores funcionais CD39 e FR4.) e
- Analisar a resposta de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no timo de animais WKO e seus precursores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) através de sinalização pelo receptor de IL-2 (mIL-2), através de análise dos níveis de pSTAT-5.
- Analisar a morte, *ex vivo*, de células Treg no timo de animais WKO, avaliando-se os níveis de apoptose por 7-AAD (7-amino-actinomicina D).
- Avaliar a capacidade emigratória de células Treg tímicas de animais WKO a partir de ensaios *in vitro* de transmigração mediada por esfingosina-1-fosfato (S1P).
- Analisar a localização intratímica de células Treg de animais WKO através da imunomarcação *in situ* de Foxp3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados 129S6/SvEvTac-WAS<tm1Sbs> (denominados WKO) e seus respectivos controles isogênicos da linhagem 129S6/SvEvTac, denominados WT (do inglês “wild type”). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

A utilização desses animais está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso De Animais (CEUA - FIOCRUZ), licenciado pelo nº L-002/09.

Em cada experimento foram utilizados 2 a 3 animais controles e WKO, machos e fêmeas, com idades de 2 a 6 meses.

4.2. Obtenção de células

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e, em seguida, foram retirados o timo e o baço 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 + 5% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich). As células foram passadas para um tubo, completando o volume com mais 5 mL de RPMI + 5% SFB. Os tubos foram centrifugados a 370xg por 5 minutos a 4°C (Eppendorf AG - Hamburg, Germany) e os sobrenadantes desprezados. As células do timo foram ressuspensas em 1 mL de RPMI + 5% SFB e mantidos no gelo. As células do baço foram ressuspensas em 500 µL de tampão ACK (0,15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, 0,1 mM de Na₂EDTA) utilizado para a lise de hemácias. A suspensão foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 12 mL de RPMI + 5% SFB gelado. As células foram lavadas mais duas vezes, seguindo o método de centrifugação e desprezando o sobrenadante. Após as lavagens, as células do timo e do baço foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI + 5% SFB e a celularidade foi analisada em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro (Leica DME, Leica Microsystems Inc - New York, USA). Essas suspensões de células foram posteriormente utilizadas para todos os ensaios mencionados abaixo.

4.3. Anticorpos e compostos fluorescentes

Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais contra moléculas de superfície e moléculas intracelulares dos timócitos e esplenócitos:

- Anticorpo anti-CD4, conjugado aos fluorocromos PerCP - complexo proteína clorofila piridina ativado e Pe-Cy7 - ficoeritrina conjugado ao Cy7 (clone RM4-5, BD Bioscience);
- Anticorpo anti-CD8, conjugado aos fluorocromos APC - alofocianina, APC-Cy7 - alofocianina conjugado ao Cy7, e APC-eFluor® 780 (clone 53-6.7, eBioscience);
- Anticorpo anti-CD25, conjugado aos fluorocromos PE – ficoeritrina, APC – alofocianina (clone PC61.5, eBioscience);
- Anticorpo anti-CD122, conjugado aos fluorocromos PE – ficoeritrina, e FITC - isotiocianato de fluoresceína (clone TM-b1, eBioscience);
- Anticorpo anti-CD44, conjugado ao fluorocromo PE – ficoeritrina (clone IM7, eBioscience);
- Anticorpo anti-CD69, conjugado ao fluorocromo APC – alofocianina (clone H1.2F3, eBioscience);
- Anticorpo anti-FR4, conjugado ao fluorocromo APC – alofocianina (clone TH6, BD Bioscience);
- Anticorpo anti-CD39, conjugado ao fluorocromo PE – ficoeritrina (clone EbioA1, eBioscience);
- Anticorpo anti-Foxp3, conjugado ao fluorocromo PE – ficoeritrina, e Pe-Cy7 - ficoeritrina conjugado ao Cy7 e anti-Foxp3 purificado (clone FJK-15s, eBioscience);
- Anticorpo anti-Helios, conjugado ao fluorocromo FITC - Isotiocianato de fluoresceína (clone 22F6, eBioscience)
- Anticorpo anti-pSTAT-5, conjugado ao fluorocromo PE – ficoeritrina (clone 47/Stat-5(pY694), BD Bioscience);

4.4. Citometria de fluxo

Suspensões simples de células do timo e do baço foram marcadas com os anticorpos monoclonais acima descritos para posterior análise citofluorométrica. Os anticorpos de superfície foram diluídos em PBS, e os anticorpos para marcações intracelulares foram

diluídos em solvente específico de acordo com a recomendação do fabricante dos kits utilizados (solução Perm, eBioscience).

A quantidade de células distribuídas na placa foi de 1×10^6 células por poço, e foram utilizadas placas de PVC, 96 poços, flexíveis, de fundo em “U” (BD Falcon - USA) para a posterior marcação. As células do baço foram incubadas com anticorpos anti-CD16/32 (clone 2.4G.2), ou soro de carneiro a 10%, no volume de 20 μ L por poço, por 20 minutos, a 4-8°C para bloqueio de receptor para porção Fc γ , a fim de que não ocorresse reação cruzada com os anticorpos utilizados, descartando a possibilidade de falso positivo. Após esta incubação, as células foram centrifugadas e incubadas com os anticorpos. Foram colocados, em cada poço, 15 μ L de solução contendo anticorpos contra marcadores de superfície já diluídos em meio de cultura, homogeneizado manualmente, e as células mantidas por 30 minutos a 4-8°C. Depois da incubação, as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura, sendo preparadas para a marcação intracelular. Para esta marcação, foi utilizada 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 por 2 vezes em solução permeabilizante contendo saponina (solução Perm, eBioscience), seguida de imunomarcação com solução contendo anticorpos diluídos na mesma solução permeabilizante por 30 minutos. Após lavagens com a solução permeabilizante, para a aquisição das amostras, as células foram ressuspensas em PBS. Os citômetros de fluxo utilizados foram Cyan (Dako) e FacsCanto (Becton Dickenson), de acordo com a disponibilidade. Para controle e compensação, foram utilizadas células sem marcação e também marcações simples, de cada fluorocromo. Foram adquiridos 50.000 eventos dentro do *gate* de linfócitos para aquisição das células do timo e 30.000 eventos para as células do baço. As análises foram realizadas no programa Summit 4.3 (Dako). Para as análises percentuais das subpopulações do timo (figura 4A) e do baço (figura 4B), 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. Sendo assim, todas as análises seguintes compreendem a região de células CD4⁺ SP selecionadas a partir da região de linfócitos totais. Para a análise dos valores absolutos, primeiramente encontramos os valores percentuais de células para cada subpopulação, e em seguida o valor total dos grupos analisados (timócitos e esplenócitos).

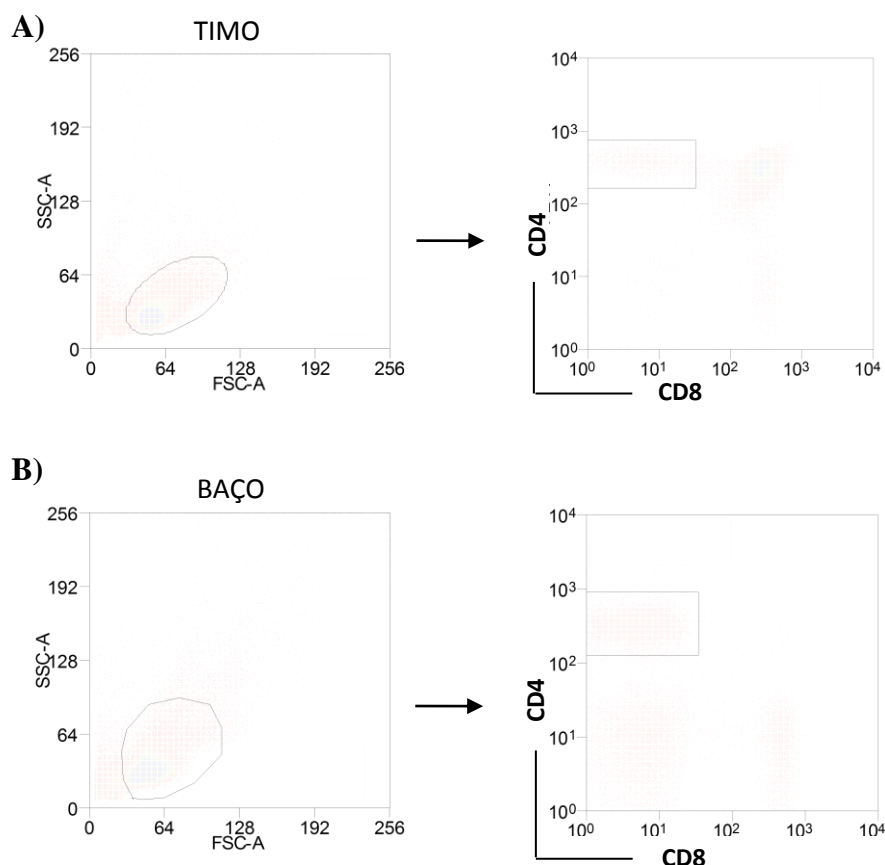


Figura 4. Sequência lógica para a análise das subpopulações. Após a aquisição em citômetro de fluxo, foi feito um gráfico de pontos FSC *versus* SSC delimitando a região de linfócitos totais, e em seguida, a partir desta população, um gráfico de pontos CD4 *versus* CD8 delimitando a região CD4⁺ SP para o timo (A) e para o baço (B).

4.5. Atividade de pStat5

Para a detecção de pStat5 em células do timo, primeiramente, estas células foram incubadas para estímulo com mrIL-2 (recombinante murino, R&D Systems) em uma concentração de 4 ng/mL em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 30 minutos. Após estímulo com rIL-2, as células foram fixadas com solução PBS contendo 1,5% de formaldeído, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Logo após a fixação, as células foram incubadas com 100 µL de metanol, por 10 minutos, em gelo. Após três lavagens com PBS + 0,2% BSA, as células foram marcadas com os anticorpos de superfície e intracelulares de interesse, ou isotipo controle, por 30 minutos, a 4°C. Pelo menos 150.000 eventos foram adquiridos dentro da região de linfócitos para análise por citometria de fluxo.

4.6. Ensaios de sobrevivência/morte celular

Para avaliar a suscetibilidade à morte celular, células do timo foram marcadas com 7-aminoactinomicina D (7AAD), um intercalante de DNA fluorescente, que possibilita a

exclusão de células não viáveis, e ainda permite, através das análises de citometria de fluxo, avaliar os níveis de apoptose (7AAD^{int}) e de necrose (7AAD^{hi}) (Sigma; Lecoecur H *et al.*, 2002). Para esta marcação, 7AAD foi acrescentado juntamente com os anticorpos de superfície seguindo o protocolo de marcação de antígenos de superfície, como descrito acima.

4.7. Ensaios de transmigração *in vitro*

Para os ensaios de transmigração, utilizamos o sistema Transwell® (Corning), com insertos constituídos por membranas com poros de 5 µm, dispostos em placas de 24 poços. Inicialmente, foi realizada a incubação da membrana do inserto com PBS-BSA 0,1% (70 µL colocados tanto na face inferior, quanto na superior), a 37°C, durante 45 minutos, de forma a bloquear sítios inespecíficos de ligação à membrana. Após o bloqueio, foram adicionados 600 µl de RPMI-BSA 0,1% juntamente com o quimioatrativo esfingosina-1-fosfato (S1P) na concentração de 10 nM. Para a migração celular, foi então adicionada a quantidade de 2,5 x 10⁶ células em um volume de 100 µL de RPMI-BSA 0,1%. A placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Como controle foi utilizado RPMI-BSA 0,1% sem S1P. Após a migração, foi retirado o inserto, a parte inferior foi lavada com 300 µl e as células foram recolhidas, centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm, retirado o sobrenadante, e as células foram ressuspensas em 100 µl de RPMI-BSA 0,1%. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram marcadas com os anticorpos de interesse.

4.8. Imunohistoquímica

Os timos dos animais normais e WKO foram retirados e incluídos em Tissue-Tek® (Sakura, Torrance - EUA). Em seguida, o material foi cortado em criostato (Leica 1350, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), sendo os cortes submetidos aos ensaios de imunofluorescência indireta. Foram realizados criocortes de 5 µm de espessura que, em seguida, foram fixados com acetona gelada por 10 minutos. Após incubação 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-BSA 1%, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a 3 lavagens consecutivas de 5 minutos com PBS-BSA 1% e, então, incubados com o anticorpo secundário Alexa 488 por 30 minutos. Para uma dupla imunomarcação, 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-BSA 1%. Após mais 3 lavagens de 5 minutos, foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos. Após as lavagens finais, as lâminas foram cobertas com meio de montagem e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager A2).

4.9. Análises estatísticas

As análises foram realizadas entre os grupos de camundongos WT e WKO. O software utilizado para essas análises foi o GraphPad prism versão 4.0 e a diferença estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney e o método ANOVA. Os resultados apresentados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,01 (**), inferiores a 0.001(***). As barras representam a média de cada grupo \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Camundongos WKO apresentam pequeno aumento no número de timócitos

Primeiramente, decidimos analisar a celularidade tímica para comparação entre os camundongos WT e WKO (figura 5A). Esses resultados foram obtidos a partir da contagem de suspensões de células do timo em câmara de Neubauer. Em seguida, analisamos os valores relativos e absolutos das subpopulações principais de timócitos destes camundongos. Para essas análises, realizadas através de citometria de fluxo, primeiramente delimitamos a população de timócitos totais, e posteriormente fizemos um gráfico de pontos CD4 *versus* CD8 para análise das populações DN, DP, CD4 SP e CD8 SP e obtenção dos valores relativos. A partir da análise dos números relativos foi possível obter os valores absolutos dessas populações (figura 5B).

Apesar dos valores obtidos não serem estatisticamente significativos, observamos que os animais WKO apresentam uma maior celularidade, em termos de número de timócitos totais, quando comparados com os animais WT. Além disso, esse aumento é também observado nos valores absolutos das subpopulações DN, DP, CD4 SP e CD8 SP.

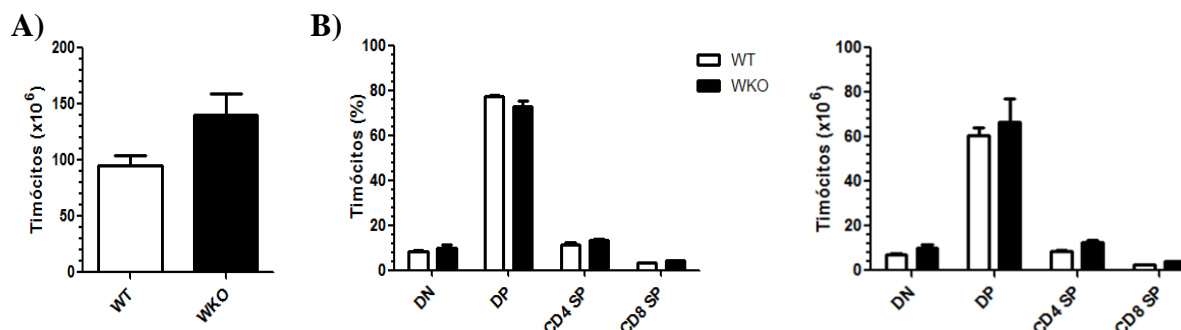


Figura 5. Análise da celularidade do timo e dos valores relativos e absolutos de timócitos DN, DP, CD4 SP e CD8 SP. A) Celularidade do timo obtida de animais com 2 - 6 meses de idade, a partir da contagem em câmara de Neubauer. B) Valores relativos e absolutos das populações tímicas obtidas por citometria de fluxo. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão.

5.2. Camundongos WKO têm menor frequência de células Treg CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ no timo, quando comparado aos controles

Foi demonstrado anteriormente que camundongos WKO apresentam menor número de células Treg (Snapper *et al.*, 1998; Maillard *et al.*, 2007). Decidimos então investigar quais mecanismos podem levar a essa diminuição de células Treg em animais WKO, e levantamos a

hipótese de que algum distúrbio poderia estar ocorrendo na diferenciação ou na ativação dessas células no timo desses animais.

Como forma de analisar a população de Treg no timo de animais WT e WKO, partindo da subpopulação $CD4^+$ SP, delimitamos a população $CD4^+Foxp3^+$ (figura 6A) e avaliamos o número relativo e valores absolutos de células Treg $CD4^+CD8^-Foxp3^+$ (figura 6B). Com essas análises, observamos uma diminuição significativa do percentual de células Treg $CD4^+CD8^-Foxp3^+$ no timo de camundongos WKO quando comparados com os camundongos WT, entretanto, não observamos diferença significativa nos valores absolutos dessa população.

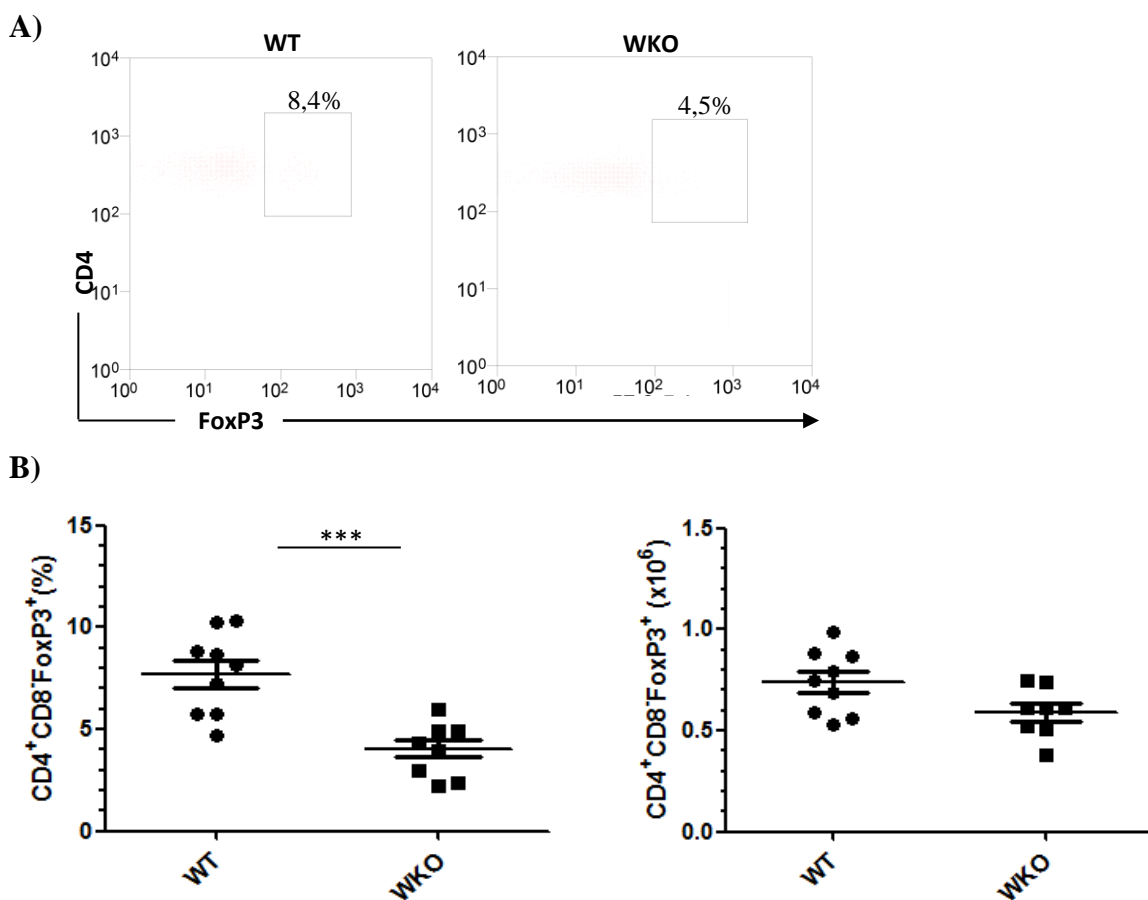


Figura 6. Análise dos valores relativos e absolutos da população $CD4^+CD8^-Foxp3^+$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 - 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. A) Primeiramente a região de linfócitos foi delimitada, em seguida, a população $CD4^+$ simples-positiva foi traçada, e a partir dessa região, foi analisada a população que expressa $Foxp3$. B) Valores percentuais e absolutos de células $CD4^+CD8^-Foxp3^+$. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. *** $p < 0.001$.

5.3. Os valores relativos e absolutos da subpopulação CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ estão diminuídos no timo de camundongos WKO

Uma combinação usual de marcadores para identificar a população de células Treg, foco do nosso estudo, envolve CD4, CD25, Foxp3 (Sakaguchi *et al*, 1995; Fontenot *et al*, 2003). Essa combinação, associada à utilização do marcador CD8, permite a definição de células Treg no grupo de timócitos como aquelas que apresentam o fenótipo CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺. Para avaliação dessa população, fizemos um gráfico de pontos para análise bidimensional de Foxp3 *versus* CD25 (figura 7A), a partir da região delimitada de timócitos CD4⁺ SP. Os valores relativos, absolutos (figura 7B) e a média da intensidade de fluorescência (MFI) dessa população foram comparados no timo dos animais WT e WKO (figura 7C).

A partir desses dados, observamos uma diminuição significativa nos valores relativos e absolutos da subpopulação CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ no timo de camundongos WKO, assim como uma diminuição na expressão de CD25 na população CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺.

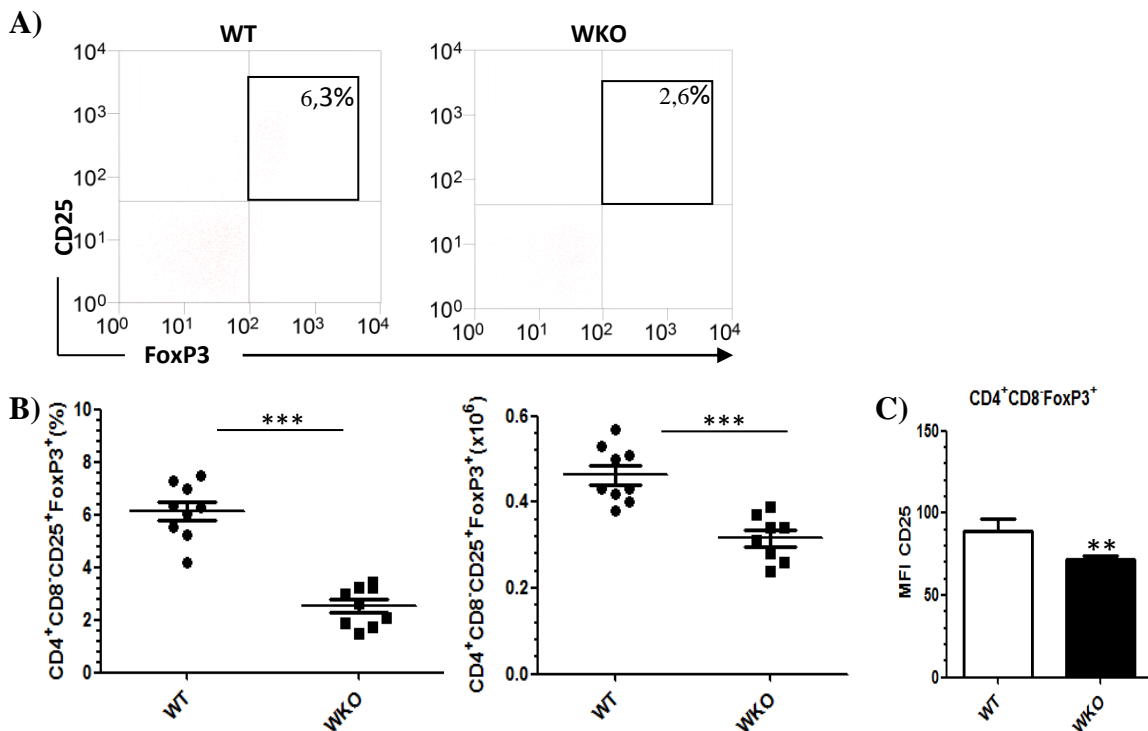


Figura 7. Análise dos valores relativos, absolutos e MFI da população CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo e a sequência lógica das análises está representada em A. Os valores percentuais e absolutos estão representados em B. A MFI de CD25 na população CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ está representado em C. Os resultados representam os valores percentuais e absolutos individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo ± desvio padrão. ** p < 0.01, ***p < 0.001.

5.4. Células Treg de camundongos WKO não apresentam alteração de expressão de moléculas de ativação, mas menor expressão da molécula CD39 quando comparadas a animais normais

As 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). Assim, através de análise citofluorométrica desses marcadores, decidimos investigar se o nível de ativação das células Treg no timo de camundongos WKO estaria alterado. Para essa análise, primeiramente delimitamos a região de células $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$, e fizemos um histograma para obtenção da porcentagem de células que expressam os marcadores de ativação CD44 (figura 8A) e CD69 (figura 8B). Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas nos valores relativos da expressão desses marcadores nos grupos avaliados.

Analizamos também a expressão da molécula FR4, um subtipo de receptor para o ácido fólico, molécula expressa em altos níveis em células Treg e fator essencial para a manutenção e atividade de células Treg (Yamaguchi *et al.*, 2007). Com o objetivo de analisar a expressão de FR4 nas células Treg de camundongos WT e WKO, delimitamos a população $CD4^+CD8^-Foxp3^+$ e fizemos um histograma para obtenção dos valores relativos de células que expressam FR4, bem como da MFI correspondente. Nossas análises mostraram que, conforme esperado, a maioria das células Treg expressam altos níveis de FR4, níveis esses que se mostraram similares, tanto na frequência e na MFI, na comparação entre o grupo WT e o grupo WKO (Figura 8C).

Uma molécula presente em células Treg ativadas, e que traduz uma das atividades funcionais de imunossupressão, é o CD39, uma ecto-ATPase de membrana com capacidade de degradação de ATP, considerada uma molécula pró-inflamatória. Com o objetivo de analisar a expressão de CD39 em células Treg, delimitamos a região de células $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ e fizemos um histograma para definição da porcentagem de células que expressam CD39 e avaliamos a sua MFI (Figura 8D). A partir dessas análises, observamos uma diminuição significativa dos valores percentuais desta molécula e também em sua MFI, revelando em conjunto, uma menor expressão de CD39 em células Treg do timo de animais WKO.

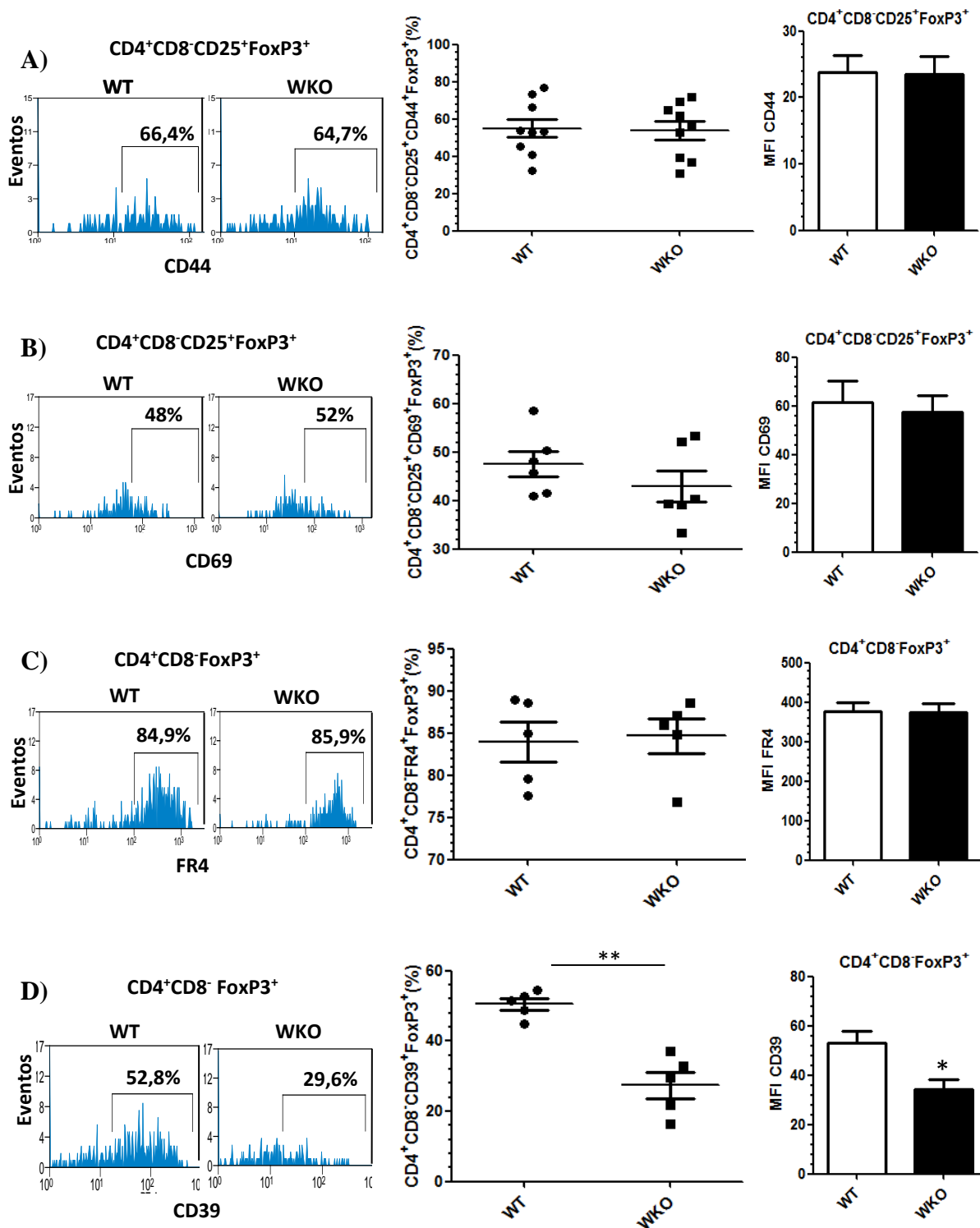


Figura 8. Análise da expressão de marcadores de ativação de células Treg no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. (A) Valores relativos e MFI de células que expressam CD44. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). (B) Valores relativos e MFI de células que expressam CD69. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 6 WT e 6 WKO, em 2 experimentos independentes (3 animais por grupo) (C) Valores relativos e MFI de células que expressam FR4. (D) Valores relativos e MFI de células que expressam CD39. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 5 WT e 5 WKO, em 2 experimentos independentes (2-3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.5. Precusores de células Treg estão diminuídos no timo de camundongos WKO

Alguns estudos têm mostrado que a população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ são precursores diretos de células Treg, as quais necessitam da sinalização via IL-2R/STAT-5 para a posterior expressão de Foxp3 (Burchill *et al.*, 2008). Assim, nosso próximo passo foi avaliar se a deficiência em Wasp já implicaria em uma diminuição no número de precursores tímicos de Treg. Para essa análise, fizemos um gráfico de pontos para análise bidimensional de CD4 *versus* Foxp3, e delimitamos a região $CD4^+Foxp3^-$. Em seguida, a análise bidimensional CD4 *versus* CD25 permitiu a delimitação da população $CD4^+CD25^+$ (figura 9A) e análise dos valores relativos e absolutos da população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ e a MFI da expressão de CD25 nessa população precursora. De forma interessante, observamos uma diminuição na frequência, mas não no número absoluto, de células $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ e, também, uma diminuição significativa da MFI de CD25 nesta subpopulação presente no timo de camundongos WKO, quando comparamos aos valores obtidos em animais WT (Figura 9B).

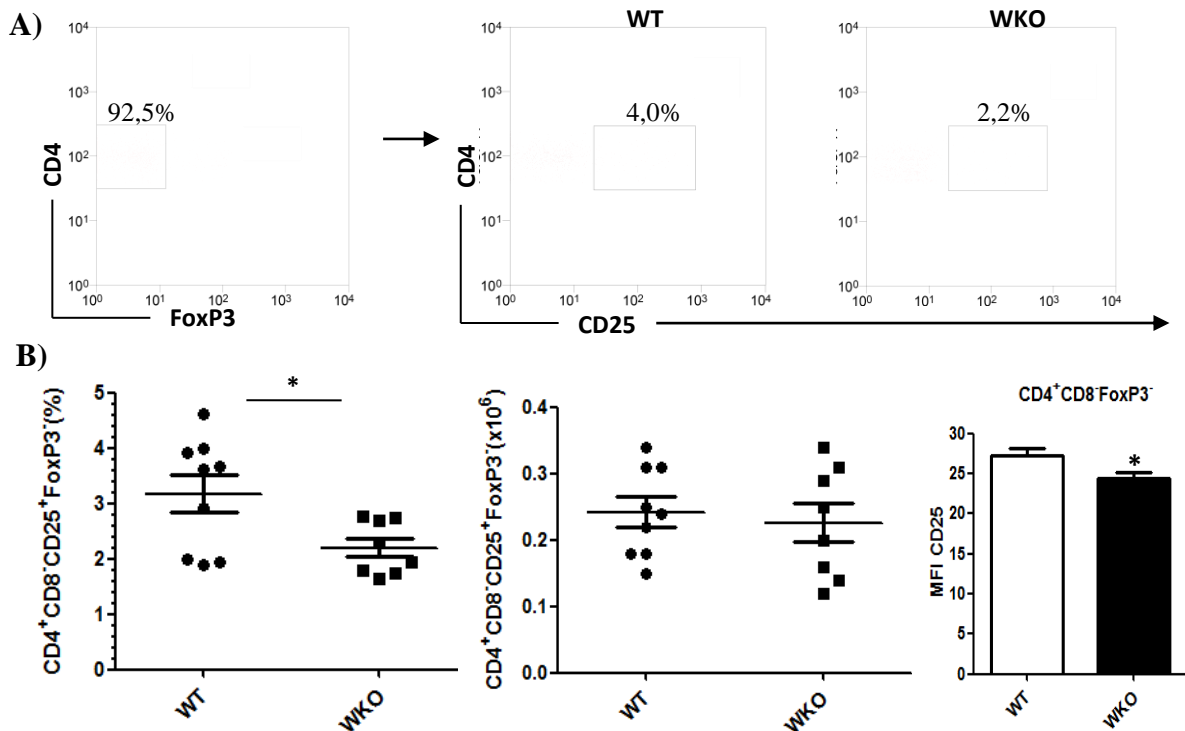


Figura 9. Análise dos valores relativos, absolutos e MFI da população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo e a sequência lógica das análises está representada em A. Os valores percentuais, absolutos e a MFI da população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ no timo estão representados em B. Os resultados representam os valores percentuais e absolutos individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$.

5.6. Células CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺Helios⁺ estão diminuídas no timo de animais WKO

O fator de transcrição Helios foi descrito como uma molécula capaz de diferenciar as células Treg tímicas (tTreg; CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺) das células Treg induzidas na periferia (pTreg; CD4⁺Foxp3⁺Helios⁻) (Thornton *et al.*, 2010). Assim, decidimos analisar a expressão de Helios nas células Treg presentes no timo, a partir de análise bidimensional de Foxp3 *versus* Helios no grupo de células CD4⁺ SP (figura 10A). De forma bastante interessante, nossos resultados revelam que a subpopulação diminuída no timo de camundongos WKO é justamente o subgrupo fenotipicamente definido como CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺. Observamos uma diminuição significativa em ambos os valores relativos (Figura 10B) e absolutos (Figura 10C) dessas células. Por outro lado, análise comparativa demonstrou que não houve alteração na frequência de células CD4⁺Foxp3⁺Helios⁻ (Figura 10B), mas mostrou um aumento significativo no número absoluto dessas células no timo de WKO (Figura 10C). Analisamos também a expressão de Helios nas subpopulações fenotipicamente definidas como CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺ e resultados similares foram demonstrados (Figura 11).

5.7. A morte *ex vivo* de células Treg tímicas de camundongos WKO não está alterada

Um maior número de células Treg em apoptose seria uma das sugestões para a diminuição do número de células Treg no timo de camundongos WKO. Com o objetivo de verificar a contribuição da morte celular nesse processo, avaliamos a incorporação de 7AAD nas subpopulações CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ e CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ Helios⁺ (figura 12A). Conforme os dados apresentados na figura 12B, a análise dos valores percentuais das populações de células Treg 7AAD⁺ não revelou diferença significativa no percentual de morte celular entre os grupos analisados.

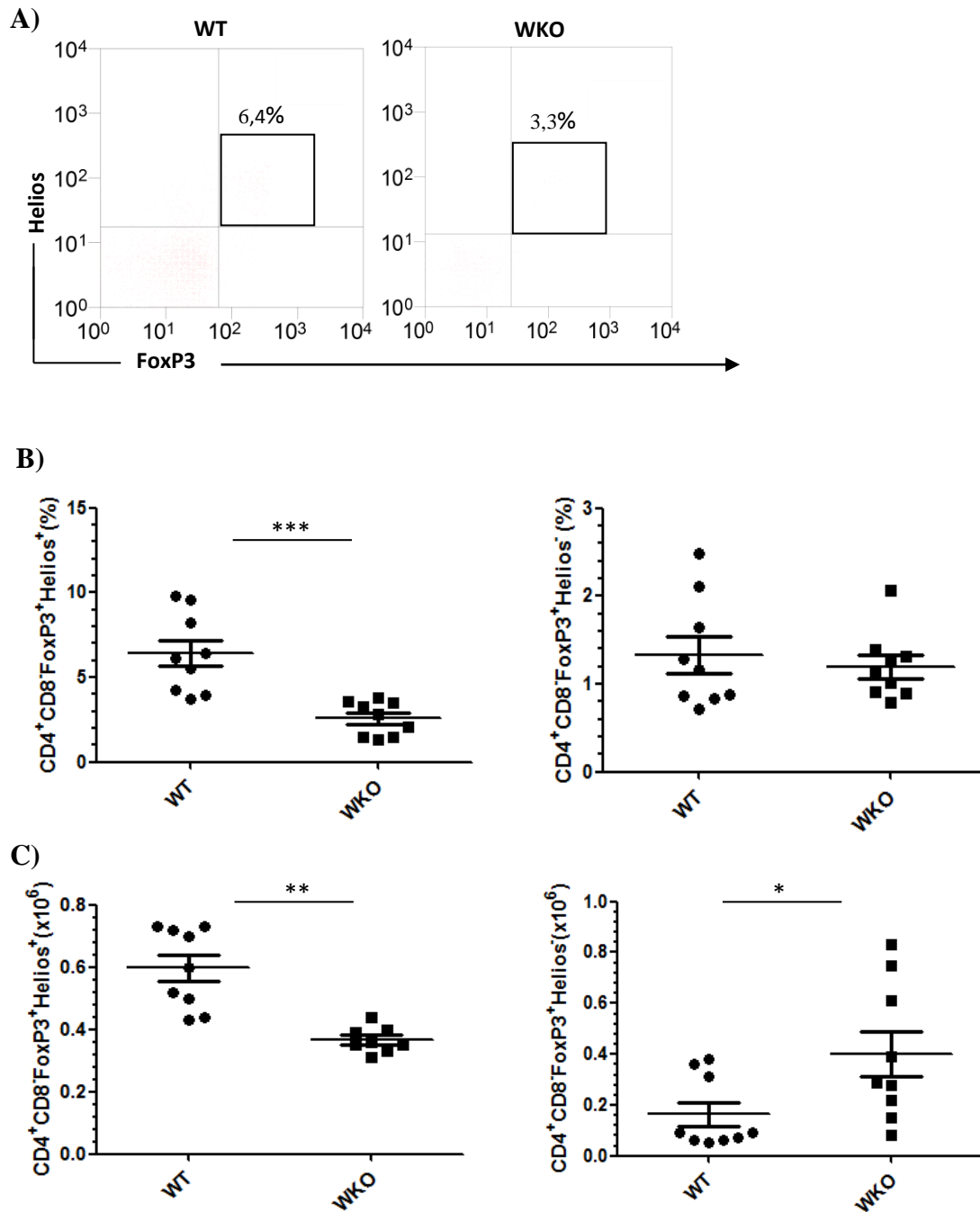


Figura 10. Análise dos valores relativos e absolutos das populações $CD4^+CD8^+Foxp3^+Helios^+$ e $CD4^+CD8^+Foxp3^+Helios^-$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Primeiramente a região da população $CD4^+$ simples-positiva foi traçada, e a partir dessa região, foram analisadas as populações $CD4^+CD8^+Foxp3^+Helios^+$ e $CD4^+CD8^+Foxp3^+Helios^-$ (A). Os valores percentuais das duas populações estão representados em B. Os valores absolutos das duas populações estão representados em C. Os resultados representam os valores percentuais e absolutos individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

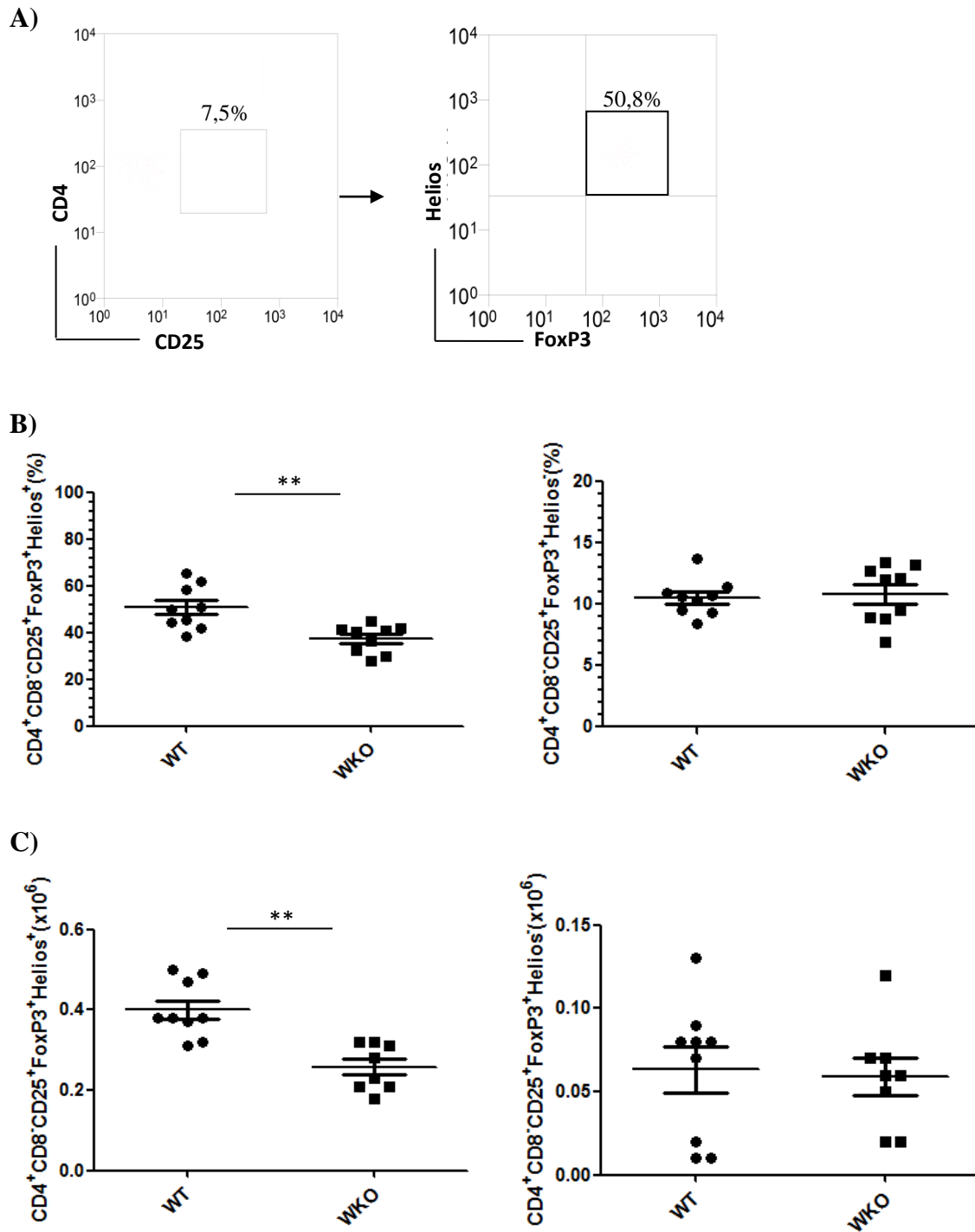


Figura 11. Análise dos valores relativos e absolutos das populações CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁺ e CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Primeiramente a região da população CD4⁺ simples-positiva foi traçada, a partir dessa região, delimitamos a população CD4⁺CD25⁺, e então analisamos as populações CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁺ e CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻(A). Os valores percentuais das duas populações estão representados em B, e os valores absolutos das duas populações estão representados em C. Os resultados representam os valores percentuais e absolutos individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. ** $p < 0.01$.

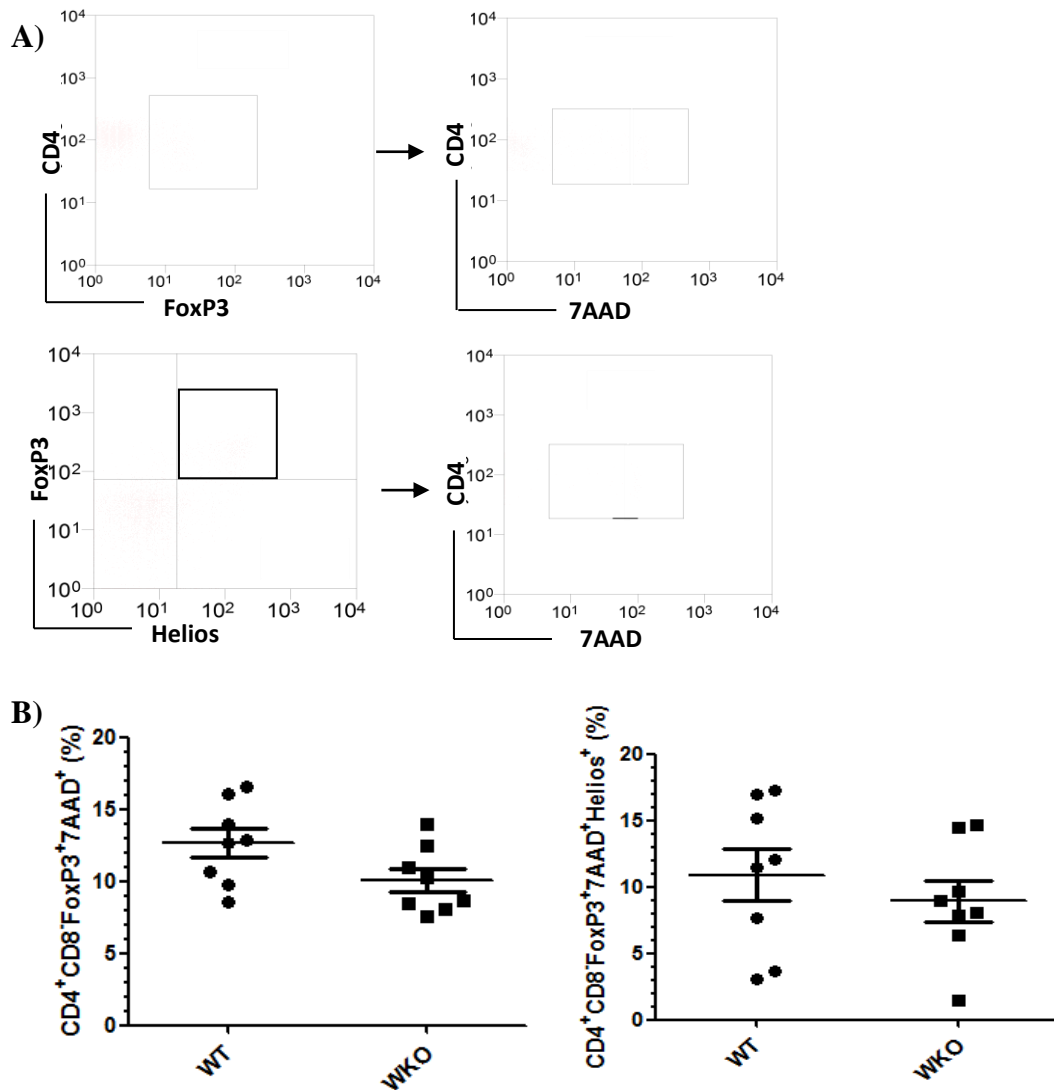


Figura 12. Análise dos valores relativos e absolutos da população $CD4^+CD8^-Foxp3^+7AAD^+$ e da população $CD4^+CD8^-Foxp3^+7AAD^+Helios^+$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo e a sequência lógica das análises está representada em A. Os valores percentuais estão representados em B. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 8 WT e 8 WKO, em 3 experimentos independentes (2 - 3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão.

5.8. Avaliação da capacidade migratória de células Treg não revelou alteração na migração dirigida por S1P

A diminuição de células Treg em timo de camundongos WKO poderia estar relacionada com distúrbios na capacidade migratória dessas células. Dessa forma, decidimos investigar a atividade migratória in vitro de células Treg frente ao fator quimiotático S1P. Para essa análise, realizamos ensaios de transmigração em sistema *Transwell*, onde as células que transmigraram foram recolhidas da câmara inferior e marcadas com os anticorpos específicos para identificação de células Treg. Analisamos as subpopulações $CD4^+CD8^-Foxp3^+$, $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ e a $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+Helios^+$, considerando os

valores relativos de cada população pós-migração (figura 13A), os valores absolutos das células que migraram (figura 13B) e a porcentagem de *input* (figura 13C). Embora represente um experimento preliminar, não observamos diferença significativa na migração de células Treg e nem na porcentagem de células que migraram frente a S1P entre os dois grupos analisados.

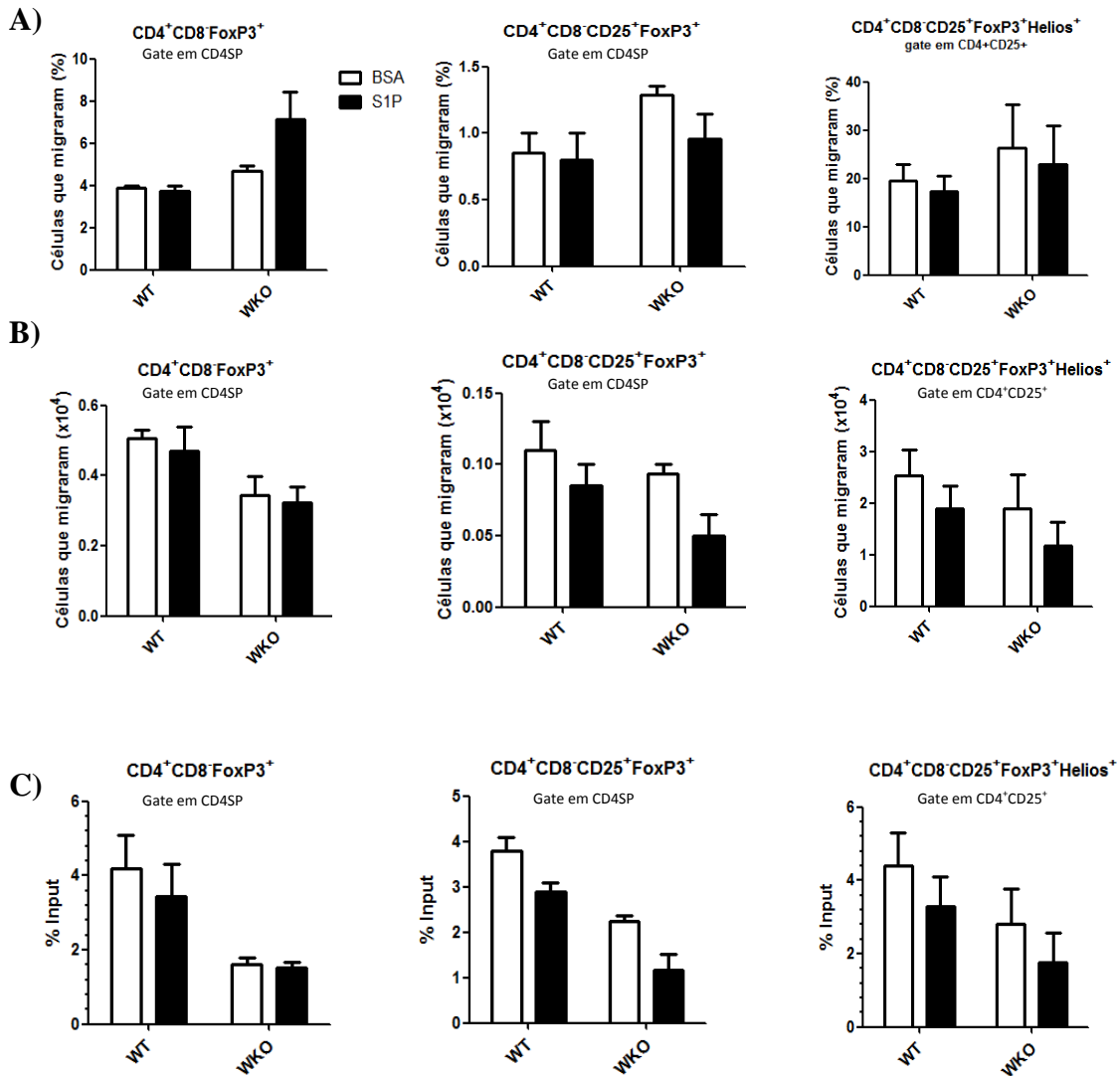


Figura 13. Análise de transmigração de células Treg frente a S1P. $2,5 \times 10^6$ células foram incubadas nos poços superiores de câmaras de *Transwell* por 4 horas em estufa de CO_2 a 37°C . Nos poços inferiores foram colocados S1P ou BSA como controle. As células foram recolhidas do poço inferior e marcadas com os anticorpos de interesse. A) Número relativo de células Treg que migraram. B) Número absoluto de células Treg que migraram. C) Percentual de input (número de células antes da migração dividido pelo número de células que migraram, e então se divide 100 pelo resultado obtido da divisão anterior) de células Treg que migraram. Os dados apresentados nas figuras são representativos de um experimento.

5.9. A expressão da molécula CD122 apresenta-se inalterada nas células Treg de camundongos WKO

A partir dos resultados que demonstraram uma diminuição nos valores relativos de precursores de células Treg, bem como diminuição na expressão de CD25, decidimos avaliar a expressão de CD122. Esse marcador representa a cadeia β do receptor de IL-2, importante para a sinalização via STAT-5 e essencial para a diferenciação de células Treg. Análise da região de células $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ de camundongos WKO mostrou que o percentual de células $CD122^+$ e o nível de expressão dessa molécula, baseado em análise de MFI, estavam em níveis semelhantes àqueles observados em camundongos controle (Figura 14). É importante ressaltar que a análise da expressão de CD122 realizada na população de precursores de células Treg, não mostrou diferença significativa entre os animais WT e WKO (dados não mostrados).

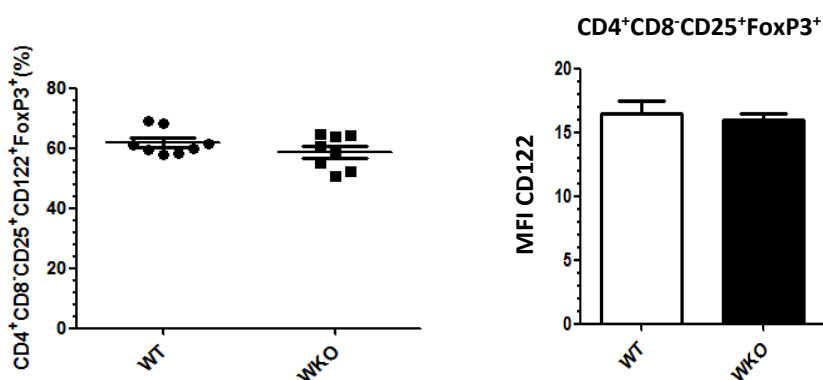


Figura 14. Análise dos valores relativos da população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+CD122^+$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Os resultados representam os valores relativos individuais de 8 WT e 8 WKO, em 3 experimentos independentes (2-3 animais por grupo).

5.10. Precursoras de células Treg tímicas de camundongos WKO apresentam expressão basal de pSTAT5 mais alta em repouso, e que se mantém após estímulo com IL-2, quando comparadas com células controle

A sinalização de IL-2/STAT-5, mediada pelo complexo CD25/CD122/CD132 (IL-2R) contribui para a diferenciação e para muitas propriedades essenciais das células Treg (Goldstein *et al.*, 2011). Tendo em vista nossos resultados de menor expressão de CD25 e expressão inalterada de CD122 em células Treg de camundongos WKO, decidimos investigar se a ausência de Wasp interfere na sinalização mediada por essa via. Para esse objetivo,

analisamos a expressão de pSTAT-5 nos precursores de células Treg, antes e após estimular tímócitos com rIL-2. Para essa análise, delimitamos a população CD25⁺ dentro do grupo de células CD4⁺ SP, com subsequente construção de gráfico de pontos CD4 *versus* Foxp3 para delimitar a população CD4⁺Foxp3⁻ (Figura 15A). Nossos dados demonstraram um aumento significativo dos valores relativos de precursores de células Treg pSTAT-5⁺ no grupo de células que recebeu estímulo com IL-2, em ambos os grupos analisados. Contudo, análise de MFI de pSTAT-5 revelou que essa molécula está expressa em níveis significativamente aumentados nos precursores de células Treg tímicas de camundongos WKO, com ou sem estímulo com rIL-2, quando comparados aos valores observados em camundongos WT (Figura 15B).

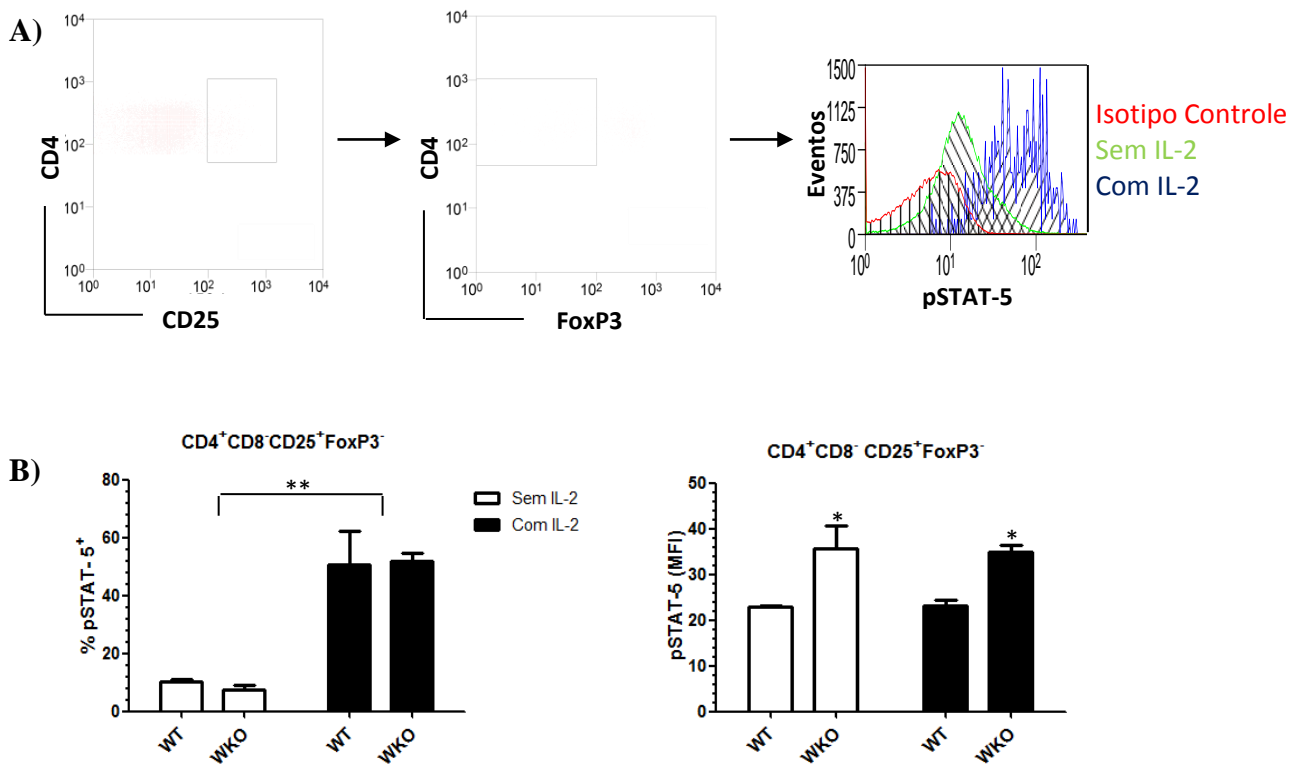


Figura 15. Análise dos valores relativos e MFI da população CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁻pSTAT-5⁺ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo e a sequência lógica das análises está representada em A. Em vermelho está representado o isotipo controle, em verde as células não estimuladas com IL-2 e em azul as células estimuladas com IL-2. Os valores percentuais e a MFI estão representados em B. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 8 WT e 8 WKO, em 3 experimentos independentes (2 - 3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo ± desvio padrão. *p < 0.05, ** p < 0.01.

5.11. Células Treg tímicas de camundongos WKO mantêm níveis altos de pSTAT5 em repouso e após o estímulo com IL-2

Após análise dos precursores, decidimos analisar a expressão de pSTAT-5 também em células Treg $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$. A partir da análise de células $Foxp3^+$ dentro da população $CD4^+CD25^+$, avaliamos a expressão de pSTAT-5 e, igualmente ao observado com as células precursoras, notamos um aumento significativo nos valores relativos de células Treg que expressam pSTAT-5 após estímulo com IL-2, em ambos os grupos (Figura 16); ainda, análise de MFI de pSTAT-5 demonstrou que células Treg de animais WKO apresentam altos níveis de expressão de pSTAT5 antes e após estímulo com IL-2, quando comparadas às células controle (Figura 16).

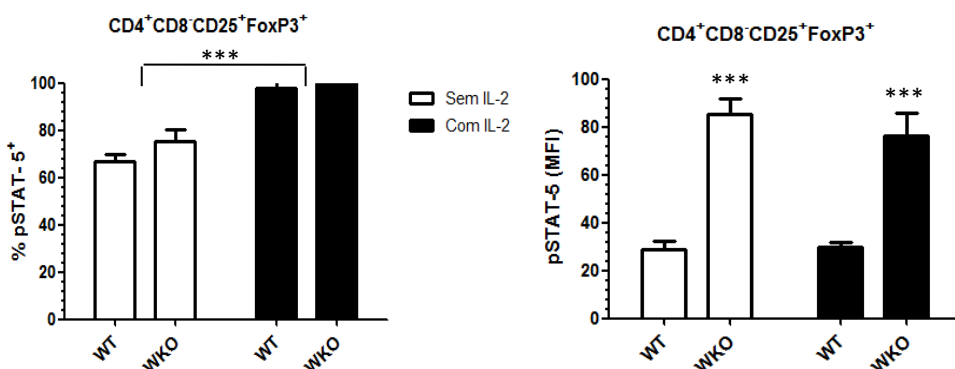


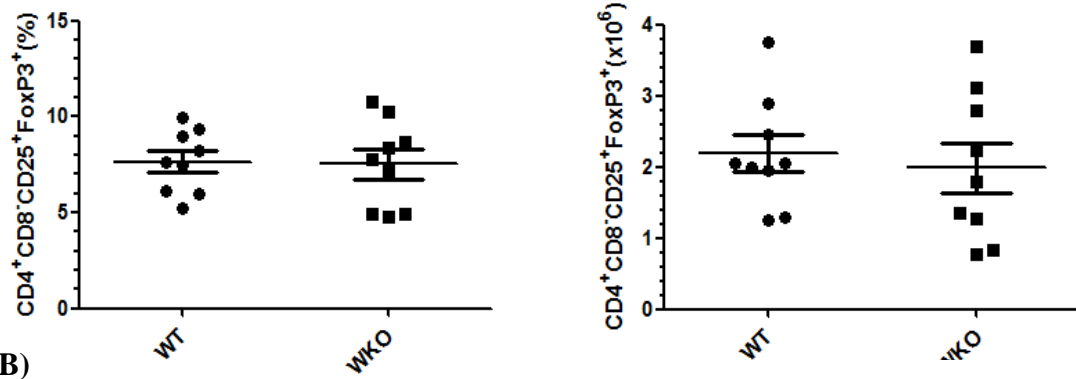
Figura 16. Análise dos valores relativos e MFI da população $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+pSTAT-5^+$ no timo de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 8 WT e 8 WKO, em 3 experimentos independentes (2 - 3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. *** $p < 0.001$.

5.12. Células Treg não se encontram diminuídas no baço de camundongos WKO

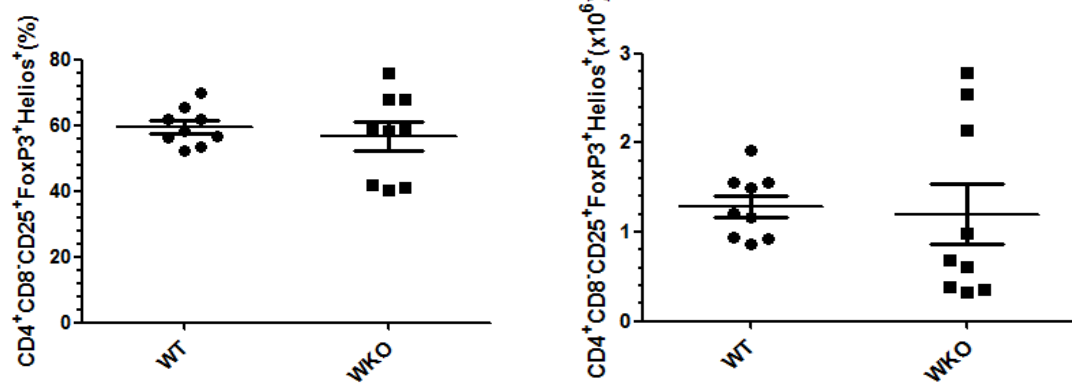
Tendo visto uma diminuição significativa de células Treg no timo de camundongos WKO, decidimos analisar os valores relativos e absolutos dessas células também no baço desses animais. Os resultados foram obtidos através de citometria de fluxo, e a estratégia de análise no baço foi realizada de forma similar àquela utilizada para o timo. Diferente dos resultados previamente publicados com essa linhagem de camundongos WKO (Maillard *et al.*, 2007), não observamos diferenças significativas nos valores relativos e absolutos de células $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ no baço dos grupos estudados (Figura 17A). Além disso,

decidimos analisar também a expressão de Helios nesses grupos e, de forma interessante, embora não tenhamos verificado uma diminuição no número de células Treg Helios⁺, observamos uma diminuição significativa nos valores percentuais de células CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻ no baço de camundongos WKO (Figura 17B e Figura 17C).

A)



B)



C)

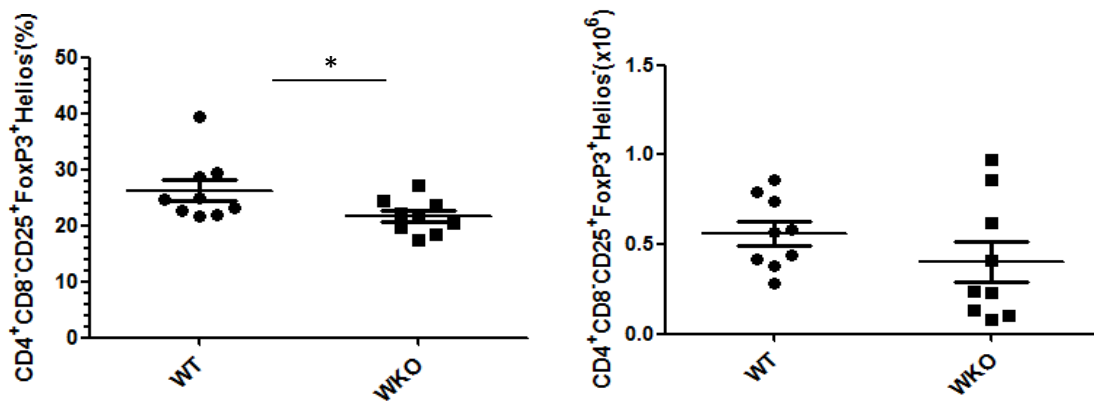


Figura 17. Análise dos valores relativos e absolutos das populações de células Treg no baço de camundongos WT e WKO com 2 – 6 meses de idade. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. A) Valores percentuais e absolutos de células Treg CD4⁺CD25⁺CD8⁻Foxp3⁺. B) Valores percentuais e absolutos de células Treg CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁺. C) Valores percentuais e absolutos de células Treg CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻ no baço de camundongos WT e WKO. Os resultados representam os valores percentuais individuais de 9 WT e 9 WKO, em 3 experimentos independentes (3 animais por grupo). As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. *p < 0.05

6. DISCUSSÃO

A síndrome de Wiskott-Aldrich é marcada por várias desordens autoimunes, entre elas a anemia hemolítica autoimune e doença inflamatória intestinal (Ochs & Thrasher, 2006). Aparentemente paradoxais, a presença dessas manifestações clínicas em pacientes imunodeficientes sugeriram a possibilidade de um efeito direto da deficiência de WASP sobre células Treg (Adriani *et al.*, 2007). De fato, 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.*, 2007; Maillard *et al.*, 2007; Marangoni *et al.*, 2007). Por exemplo, em camundongos WKO, o desenvolvimento de colite parece estar diretamente relacionado à desregulação na homeostasia e função de células Treg (Snapper *et al.*, 1998; Maillard *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2007). Saliente-se que esses estudos indicaram que WASP parece ser essencial para a homeostasia de células Treg no timo, bem como para a sua capacidade supressora na periferia. As células Treg de animais WKO apresentam defeitos na sua capacidade de supressão *in vivo* e *in vitro* e, além disso, essas células estão diminuídas no timo de camundongos WKO (Maillard *et al.*, 2007). Assim, em nosso presente trabalho, objetivamos avaliar quais os mecanismos que poderiam estar associados à diminuição de células Treg no timo desses animais.

Em camundongos, as células Treg são geradas no timo durante as primeiras semanas de vida e são caracterizadas pela expressão de Foxp3, sendo dependentes dessa molécula para sua função supressora (Fontenot *et al.*, 2005). Observamos, a partir dos nossos resultados, uma diminuição significativa nos números relativos, mas não nos valores absolutos, de células Treg CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ no timo de camundongos WKO.

Diversas moléculas são utilizadas para identificar as células Treg, no entanto a combinação mais usual de moléculas utilizada na caracterização dessas células é a combinação CD4⁺CD25⁺Foxp3. Ao utilizar essa combinação de moléculas, observamos uma diminuição significativa nos números relativos e absolutos de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Nossos resultados diferem daqueles observados por Humblet-Baron e colaboradores (2007), que não viram diferenças numéricas de células Treg tímicas e periféricas. Estudos mais aprofundados são necessários para entender essas diferenças, que podem estar relacionadas ao modelo utilizado para estudo, com influência da idade, montagem da colônia, etc.

Buscando compreender melhor a redução na frequência de células Treg tímicas em WKO, aprofundamos a caracterização dessas células. Assim, observamos também uma diminuição significativa da expressão de CD25 na população de células CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺.

Levando-se em consideração que a presença de CD25 em células Treg indica um grupo de células ativadas e potencialmente funcionais (Sakaguchi *et al.*, 2008), nossos dados sugerem que a deficiência em Wasp pode estar diretamente relacionada ao menor número de células Treg encontradas no timo de WKO.

A partir desses resultados, levantamos a hipótese de que outras moléculas de superfície, que normalmente têm sua expressão aumentada em células Treg ativadas, poderiam estar sendo expressas em menores quantidades, não sendo suficientes para a perfeita ativação e função dessas células. Entretanto, não observamos diferenças significativas na expressão de CD44 e CD69 nas células Treg dos grupos estudados. É interessante salientar que a expressão de CD44 está associada à transmissão de sinais anti-inflamatórios e para a função supressora das células Treg por alta concentração de ácido hialurônico, visto que este é um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular, e principal ligante da molécula CD44 (Bollyky *et al.*, 2007). Logo, esses resultados indicam que células Treg deficientes em Wasp não apresentam um fenótipo explicitamente característico relacionado a células com defeito em processo de ativação. Nesse mesmo sentido, nossas análises de expressão de FR4 não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados. Essa molécula, um receptor de ácido fólico, está presente em maiores quantidades nas células Treg provenientes do timo, em comparação com outras células *naive* ou células já ativadas, e é essencial para a função e manutenção das células Treg na periferia (Yamaguchi *et al.*, 2007). Embora seu efeito no timo não seja entendido, nossos dados sugerem que a deficiência em Wasp não acarreta em prejuízo da manutenção das Treg tímicas dependentes de FR4.

A capacidade supressora das células Treg se deve à liberação de citocinas inibitórias tais como IL-10 (Asseman *et al.*, 1999), TGF- β (Nakamura *et al.*, 2001), e IL-35 (Collison *et al.*, 2007), à citólise mediada principalmente por granzima B (Vignali *et al.*, 2008), à modulação da maturação e da capacidade de apresentação antigênica pelas células dendríticas (Cederbom *et al.*, 2000), à privação de IL-2 para as células T efectoras (Thornton *et al.*, 1998), ou pela hidrólise de ATP, molécula que em altas concentrações apresenta atividade lesiva em tecidos, com atividade pró-inflamatória (Gandhi *et al.*, 2010). Presentes em células Treg, há duas moléculas responsáveis pela conversão de ATP: a molécula CD39 converte ATP em ADP e AMP, e a molécula CD73 converte AMP em adenosina, uma molécula anti-inflamatória (Deaglio *et al.*, 2007; Gandhi *et al.*, 2010). De fato, a adenosina tem papel fundamental na inibição das funções de células T efectoras (Deaglio *et al.*, 2007). Além disso, estudos demonstraram que células Treg de camundongos que não expressam CD39, têm

capacidade supressora prejudicada e falham para bloquear a rejeição de aloenxertos *in vivo* (Deaglio *et al.*, 2007). É interessante notar que defeitos nos números de células Treg CD39⁺ têm sido descritos em pacientes com esclerose múltipla, hepatite autoimune (Grant *et al.*, 2013) e na doença de Crohn (Friedman *et al.*, 2009). Em nosso modelo de estudo, observamos também uma diminuição significativa na frequência de células Treg CD39⁺ no timo de animais WKO, sugerindo que as células Treg em camundongos WKO desde a sua diferenciação já apresentam problemas na expressão de CD39. Assim, investigação futura sobre a atividade supressora de células Treg tímicas é necessária. Embora seja necessária uma análise mais detalhada sobre a expressão e participação funcional dessa molécula também na periferia no nosso modelo experimental, esses resultados sugerem que a diminuição da expressão dessa molécula pode contribuir para a disfunção de Treg e o desenvolvimento do processo colitogênico em camundongos WKO.

Em nosso trabalho, analisamos a expressão de Helios na população de células Treg. Estudos demonstraram que essa molécula é expressa no estágio DN2 do desenvolvimento tímico nos camundongos, anteriormente à expressão de Foxp3, e que está presente em quase todas as células Foxp3⁺ no timo e em 70% das células Foxp3⁺ da periferia destes animais (Thornton AM *et al.*, 2010). Estudos sugerem que, pela expressão de Helios nas células Foxp3⁺ ser claramente dividida na periferia, as duas populações Helios⁺ e Helios⁻ podem ser derivadas de precursores distintos. Análise de camundongos com 3-7 dias de idade revelou que todas as células Foxp3⁺ presentes na periferia expressam Helios; como as células Foxp3⁺ Helios⁻ só podem ser encontradas após 7 dias de nascimento, esses dados sugerem que essas células são induzidas na periferia.

Interessantemente, em nossos estudos, observamos uma diminuição significativa dos valores relativos e absolutos da população Foxp3⁺Helios⁺ no timo de animais WKO, enquanto a população Foxp3⁺Helios⁻ possui números comparáveis ao controle. Esses resultados sugerem que a presença de Wasp pode ser importante para o desenvolvimento intratímico das células Treg desde os estágios iniciais do desenvolvimento. Dessa forma, nossos dados sugerem que Helios possa definir um grupo de células Treg geradas no timo e dependente da sinalização envolvendo a proteína Wasp. Ainda, a despeito da controvérsia sobre o papel de Helios na distinção entre células tTreg e pTreg, consideramos como central a necessidade de estudos futuros sobre o papel desse fator de transcrição na geração intratímica de células Treg.

Outra observação relativa à população de células Foxp3⁺ Helios⁻ encontradas no timo nos remete à hipótese de que a presença delas se deva à recirculação de células Treg ativadas

que foram induzidas na periferia (Thornton *et al.*, 2010). A recirculação de células T convencionais ativadas parece atingir como um dos órgãos preferenciais o timo (Hale *et al.*, 2009), um fato que leva à hipótese de que o mesmo pode ocorrer com a população de células Treg induzidas na periferia. Nesse sentido, nossos achados significariam que a deficiência em Wasp não interfere nesse processo de recirculação de células Treg periféricas.

Conforme discutido anteriormente, alguns estudos têm demonstrado que a expressão de Helios em células pTreg varia de acordo com o método de ativação (Akimova T, *et al.*, 2011; Verhagen J, *et al.*, 2010). Alguns resultados sugerem que Helios possa ser induzido em células T CD4 carregando TCR transgênico sob estímulo antígeno-específico e na presença de IL-2 e TGF- β (Verhagen e Wraith, 2010). Em outro trabalho foi visto que as células Treg podem expressar Helios quando ativadas com peptídeo específico ou anticorpo anti-CD3, desde que APCs estejam presentes nas culturas. Esses resultados sugerem que, para a expressão de Helios em células pTreg, são necessários estímulos derivados de APCs, e que a contínua expressão dessa molécula é dependente de frequentes estímulos pelo TCR (Gottschalk *et al.*, 2011). No entanto, algumas células Treg na periferia não expressam Helios, podendo sugerir uma distinção do subconjunto de células, que podem ter se diferenciado de maneira distinta. Assim, julgamos importante também investigar fenótipo e função das células Treg Helios⁻ para uma melhor compreensão da regulação de Helios na periferia.

Embora a molécula WASP não pareça ser essencial para o desenvolvimento de células T CD4⁺ (Snapper, 1998; Zhang, 1999), a geração de células Treg pode estar prejudicada na ausência dessa proteína. Muitos estudos já demonstraram que WASP tem um papel essencial na sinalização iniciada pelo TCR (Molina *et al.*, 1993; Snapper *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). O desenvolvimento de células Treg no timo pode ocorrer a partir de duas vias já descritas. Um sinal inicial dirigido por TCR e CD28 que leva à expressão de CD25 e CD122 (as subunidades α e β do receptor para IL-2, respectivamente), e à expressão de Foxp3 (Zheng *et al.*, 2010), e um segundo sinal independente do TCR, mas dependente de citocinas, onde os precursores CD25⁺Foxp3⁻ recebem o sinal de IL-2 para induzir a expressão de Foxp3 via STAT-5, completando o processo de diferenciação (Burchill *et al.*, 2008). A sinalização via IL-2 é necessária para a eficiente diferenciação de Treg tímicas, embora estudos tenham demonstrado que essa molécula é fundamental na diferenciação de células Treg na periferia (Fontenot *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2005). Em camundongos WKO, a produção e a secreção de IL-2 é prejudicada (Cannon *et al.*, 2004), o que pode estar contribuindo, juntamente com a diminuição da expressão de CD25, para a diminuição de células Treg em animais WKO.

Nossos resultados demonstraram que o número de precursores de células Treg está diminuído nos animais WKO, o que nos leva a pensar que em algum momento da diferenciação dessas células no timo, a ausência de WASP poderia contribuir para a inibição ou falhas na sinalização tanto via TCR quanto na via dependente de IL-2.

Estudos mostraram que a deleção da molécula CD122 pode resultar na completa ausência de células Foxp3⁺ no timo (Burchill *et al.*, 2007; Fontenot *et al.* 2005). Analisamos a expressão de CD122, uma molécula essencial na sinalização via STAT-5, e não vimos diferença significativa da sua expressão nos grupos estudados. Em seguida, analisamos também a expressão de pSTAT-5, após estímulo com IL-2 e, interessante, observamos que os animais WKO apresentam um aumento da expressão basal dessa molécula, tanto nos precursores CD25⁺Foxp3⁻, quanto nas células Treg CD25⁺Foxp3⁺. Esses resultados sugerem que em algum momento da diferenciação essas células possam estar aumentando a expressão de pSTAT-5 em resposta a outros estímulos disponíveis que afetam essa via de sinalização, como as citocinas IL-7 e IL-15, e hormônios como prolactina e fator de crescimento. Estudos futuros são necessários para melhor compreensão do efeito desses fatores sobre as Tregs tímicas em presença e ausência de Wasp. Nesse mesmo contexto, torna-se necessária a análise de outras vias de sinalização envolvidas na geração de Tregs, em particular a da sinalização via TCR, visto que a falta de Wasp já foi relatada como deficitária na ativação de células T e de timócitos (Snapper *et al.*, 1998; Cotta-de-Almeida *et al.*, 2007).

Visto a diminuição de células Treg no timo de animais WKO, uma sugestão seria o número de células Treg em apoptose, devido à capacidade prejudicada de sinalização celular pela ausência de Wasp. A análise preliminar de morte celular em nosso estudo demonstrou que não há diferença significativa no número de células em apoptose nos grupos estudados, sugerindo que a diminuição de células Treg não é causada devido à morte celular em camundongos WKO.

A migração de células T em camundongos é prejudicada devido aos defeitos no rearranjo do citoesqueleto de actina nessas células (Snapper *et al.*, 2005). Por essa razão, a abordagem sobre a migração das células Treg tímicas é de grande importância para nosso trabalho. Alguns estudos demonstraram a importância da molécula S1P para a migração de células T do timo para órgãos linfoides periféricos (Matloubian *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2007). Os eritrócitos e as plaquetas são os principais produtores de S1P, que está presente em maiores quantidades no plasma sanguíneo. Já o timo e tecidos linfoides secundários apresentam níveis baixos de S1P. Sendo assim se forma um gradiente crescente

de concentração de S1P do timo para a corrente sanguínea, sugerindo que S1P induz a emigração de linfócitos, atuando como um quimioatraente para células que expressam o seu principal receptor, S1P1 (Chang, 2009). De fato, células deficientes em S1P1 não são capazes de sair de órgãos linfoides como o timo e linfonodos, se acumulando nesses órgãos (Matloubian *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2004). Utilizamos em nosso experimento a S1P para análise da capacidade migratória *in vitro* das células Treg deficiente em WASP. Observamos, a partir dos nossos resultados, que não houve diferença significativa na capacidade migratória das células Treg de animais WKO comparados aos camundongos WT.

Uma importante característica da tolerância periférica é a conversão de células T CD4⁺ em células Treg Foxp3⁺ (pTreg) nos órgãos linfoides periféricos. As células pTreg protegem os tecidos contra condições inflamatórias crônicas e regulam as respostas imunes a microrganismos comensais (Haribhai *et al.*, 2011; Lathrop *et al.*, 2011). A diferenciação das células pTreg na periferia, assim como as células tTreg, necessitam de sinais dependentes de TCR e IL-2. Entretanto, essas células também requerem a participação de TGF- β para a sua diferenciação (Huber *et al.*, 2004). Muitas questões vêm sendo discutidas sobre as células pTreg, como por exemplo a estabilidade da expressão de Foxp3, pois é provável que muitas células em algum momento percam a expressão de Foxp3 e se tornem células T efetoras novamente (Yang *et al.*, 2008). Neste caso, se tornam importantes os estudos utilizando o fator de transcrição Helios. Se as células T Foxp3⁺Helios⁻ são geradas primeiramente por células T convencionais na periferia, pode-se prever que estas células sejam intrinsecamente mais propensas a apresentar certa plasticidade (Thornton *et al.*, 2010). Em nossos resultados, não observamos diferenças significativas entre o valor relativo e absoluto de células Treg entre os camundongos WT e WKO na periferia. Entretanto, observamos uma diminuição significativa nos valores relativos de células CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻ no baço de animais WKO. Esses resultados sugerem que as células T convencionais não estão se diferenciando em células Treg por problemas devidos à ausência de Wasp, ou ainda que células Treg não estejam sendo ativadas apropriadamente na periferia de forma a expressar Helios.

Assim como no sangue periférico, linfócitos T em desenvolvimento apresentam estágios alternativos de alta mobilidade e de adesão durante os estágios de maturação e interação com células do estroma tímico, formando verdadeiros nichos de diferenciação intratímicos (Zuniga-Flucker *et al.*, 2007). A presença desses nichos de sinalização – envolvendo fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão, interação TRC/Ag-MHC,

etc – estão diretamente relacionados ao sucesso dos estágios de diferenciação dos timócitos (Zuniga-Flucker *et al.*, 2007). Em particular, integrinas são moléculas fundamentais na regulação desses processos intratímicos de migração/adesão, participando diretamente na interação célula/matriz extracelular (Savino *et al.*, 2002) e célula/célula em parceria com a molécula VCAM-1 (Prockop *et al.*, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel de integrinas relacionadas à geração e função de células Treg. Embora não tenhamos abordado diretamente esse tema em nosso trabalho, um de nossos objetivos foi abordar se distúrbios na localização intratímica poderiam estar relacionados ao número diminuído de células Treg no timo de camundongos WKO. Podemos imaginar que a presença equivocada em sítios intratímicos poderia dificultar a resposta de precursores a sinais moleculares fundamentais à geração de células tTreg, como por exemplo CD28, IL-2 e TNF (Mahmud *et al.*, 2014).

Trabalho em andamento em nosso laboratório tem abordado o papel de integrinas da subfamília VLA (“very late antigen”) sobre o desenvolvimento intratímico de células tTreg (Vasconcellos-Fontes 2013). Análises tridimensionais por microscopia confocal (utilizando a composição de múltiplas imagens no eixo Z em criocortes tímicos de 50 µm) revelaram que, embora haja um decréscimo importante no número de células Treg no timo de camundongos WKO, a localização está restrita à região medular (vide Apêndice A). Assim, esses estudos preliminares revelam que camundongos WKO apresentam uma distribuição intratímica de células Treg similar àquela observada, e esperada, em camundongos controle. Contudo, é importante ressaltar que esses resultados não eliminam a possibilidade de existência de distúrbios de localização em nichos medulares específicos que resultariam em desregulação da sinalização e diferenciação de células Tregs.

Em conjunto, nossos resultados apresentam uma abordagem ampla sobre os mecanismos potencialmente envolvidos na diminuição de células Treg no timo de camundongos deficientes em WASP, apontando para defeitos precoces no desenvolvimento dessas células. Além disso, esses estudos podem contribuir para um melhor entendimento da imunodesregulação associada à deficiência em WASP.

7. CONCLUSÕES

- Os valores relativos das células Treg no timo de camundongos WKO estão significativamente diminuídos.
- A expressão de CD25 apresenta-se diminuída na população de células Treg tímicas de camundongos WKO.
- As células Treg de camundongos WKO não apresentam diferença significativa na expressão dos marcadores de ativação CD44, CD69 e FR4, mas apresentam menor expressão da molécula CD39, que apresenta potencial função direta na atividade supressora.
- Em timo de camundongos WKO, há uma diminuição nos valores relativos e absolutos da população de células Treg Helios⁺, mas não da população Helios⁻.
- Os precursores de células Treg estão diminuídos no timo de camundongos WKO.
- A expressão de CD122 nas células Treg tímicas de camundongos WKO encontra-se em níveis comparáveis aos animais WT.
- Os precursores de células Treg e as células Treg tímicas apresentam expressão normal de pSTAT-5 quando estimuladas com IL-2, porém os níveis basais estão drasticamente aumentados
- A avaliação de morte celular por 7AAD *ex vivo* não apresenta alteração de células Treg no timo de camundongos WKO.
- Não há alteração na capacidade migratória das células Treg no timo de camundongos WKO frente a S1P.
- As populações de células Treg não apresentam diferenças significativas no baço de animais WKO quando comparados com os camundongos WT.
- A população de células Treg Helios⁻ encontra-se diminuída no baço de animais WKO.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14(4):307-8.

Adriani M, Jones KA, 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):e24226.

Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, et al. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 2010;115(16):3231-8.

ALDRICH RA, STEINBERG AG, CAMPBELL DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics.* 1954;13(2):133-9.

Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15396-401.

Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood.* 2006;108(7):2182-9.

Ariga T. Wiskott-Aldrich syndrome; an x-linked primary immunodeficiency disease with unique and characteristic features. *Allergol Int.* 2012;61(2):183-9.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999;190(7):995-1004.

Beel K, Cotter MM, Blatny J, Bond J, Lucas G, Green F, et al. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Br J Haematol.* 2009;144(1):120-6.

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.

Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol.* 1994;153(8):3764-74.

Bollyky PL, Falk BA, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol.* 2009;183(4):2232-41.

Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, et al. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;179(2):744-7.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225-32.

Bosticardo M, Marangoni F, Aiuti A, Villa A, Grazia Roncarolo M. Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood.* 2009;113(25):6288-95.

Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):623-30.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer 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(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 MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity.* 2008;28(1):112-21.

Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;178(1):280-90.

Calle Y, Chou HC, Thrasher AJ, Jones GE. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol.* 2004;204(4):460-9.

Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):119-30.

Cannon JL, Burkhardt JK. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol.* 2004;173(3):1658-62.

Catucci M, Castiello MC, Pala F, Bosticardo M, Villa A. Autoimmunity in wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. *Front Immunol.* 2012;3:209.

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 TA, 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):R75-81.

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.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450(7169):566-9.

Coquet JM, Ribot JC, Bąbała N, Middendorp S, van der Horst G, Xiao Y, et al. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J Exp Med.* 2013;210(4):715-28.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626-35.

D'Ambrosio D, Cantrell DA, Frati L, Santoni A, Testi R. Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol.* 1994;24(3):616-20.

D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1152-9.

de la Fuente MA, 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.

de Noronha S, Hardy S, Sinclair J, Blundell MP, Strid J, Schulz O, et al. Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood.* 2005;105(4):1590-7.

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;79(5):following 922.

Devriendt K, Kim AS, 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.

Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, Quartier P, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics.* 2003;111(5 Pt 1):e622-7.

Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood.* 2005;105(5):2220-6.

Esplugues E, Sancho D, Vega-Ramos J, Martínez C, Syrbe U, Hamann A, et al. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med.* 2003;197(9):1093-106.

Feng C, Woodside KJ, Vance BA, El-Khoury D, Canelles M, Lee J, et al. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol.* 2002;14(6):535-44.

Fisson S, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med.* 2003;198(5):737-46.

Fontenot JD, Gavin MA, 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, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1142-51.

Fontes LV. Protocolo de cortes e criopreservados de 50 micrômetros para análise em microscopia confocal com reconstituição 3D: interação entre matriz extracelular e timócito. Rio de Janeiro. Monografia [graduação em biomedicina] – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro; 2013.

Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, et al. From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(39):16788-93.

Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, et al. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1416-26.

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.

Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2010;11(9):846-53.

Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007;109(5):2058-65.

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(7129):771-5.

Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol.* 2010;47(7-8):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.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):1783-6.
- Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2012;188(3):976-80.
- Grant CR, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2014;59(3):1007-15.
- Gravestien LA, van Ewijk W, Ossendorp F, Borst J. CD27 cooperates with the pre-T cell receptor in the regulation of murine T cell development. *J Exp Med*. 1996;184(2):675-85.
- 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.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004;104(9):2840-8.
- Hale JS, Fink PJ. Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(1):58-64.
- Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, Dorsch 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. *J Exp Med*. 1990;171(1):141-57.
- Hamann A, Klugewitz K, Austrup F, Jablonski-Westrich D. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(11):3207-18.

- Hamann J, Fiebig H, Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol.* 1993;150(11):4920-7.
- Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity.* 2011;35(1):109-22.
- Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ 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 DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 2008;29(9):429-35.
- Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2004;173(11):6526-31.
- 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.
- Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity.* 2002;17(2):117-30.
- Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood.* 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.
- Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood.* 2004;104(13):4010-9.

- Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, et al. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol.* 1996;26(1):161-5.
- Kawabata K, Nagasawa M, Morio T, Okawa H, Yata J. Decreased alpha/beta heterodimer among CD8 molecules of peripheral blood T cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81(2):129-35.
- Kenney D, Cairns L, Remold-O'Donnell E, Peterson J, Rosen FS, Parkman R. Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood.* 1986;68(6):1329-32.
- Khaldoyanidi S, Schnabel D, Föhr N, Zöller M. Functional activity of CD44 isoforms in haemopoiesis of the rat. *Br J Haematol.* 1997;96(1):31-45.
- Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):337-42.
- Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature.* 2000;404(6774):151-8.
- Kim CH. Reining in FoxP3(+) regulatory T cells by the sphingosine 1-phosphate-S1P1 axis. *Immunol Cell Biol.* 2009;87(7):502-4.
- 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.
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature.* 2011;478(7368):250-4.
- 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.
- 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.

- Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):116-23.
- Lio CW, Dodson LF, Deppong CM, Hsieh CS, Green JM. CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J Immunol*. 2010;184(11):6007-13.
- Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*. 2008;28(1):100-11.
- Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(2):176-85.
- Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz DA. Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF- β and retinoic acid. *PLoS One*. 2010;5(12):e15150.
- Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2433-7.
- 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*. 2007;204(2):381-91.
- Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):369-80.
- Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2008;10(7):825-33.
- Martorell J, Rojo I, Vilella R, Martinez-Caceres E, Vives J. CD27 induction on thymocytes. *J Immunol*. 1990;145(5):1356-63.
- Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285:26-43.

- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355-60.
- Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):144-54.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;16(2):311-23.
- 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.
- 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.
- Moratto D, Giliani S, Bonfim C, Mazzolari E, Fischer A, Ochs HD, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood*. 2011;118(6):1675-84.
- Mullen CA, Anderson KD, Blaese RM. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood*. 1993;82(10):2961-6.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194(5):629-44.

Nakayama T, Kasprowicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, et al. The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J Immunol.* 2002;168(1):87-94.

Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 2000;275(20):14939-48.

Nijnik A, Clare S, Hale C, Chen J, Raisen C, Mottram L, et al. The role of sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 in immune system function. *J Immunol.* 2012;189(1):102-11.

Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, D'Aria C, Gandellini F, Ravelli C, et al. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood.* 2002;99(6):2268-9.

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.

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 HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):725-38; quiz 39.

Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010;32(2):95-106.

Olivier A, Jeanson-Leh L, Bouma G, Compagno D, Blondeau J, Seye K, et al. A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells. *Mol Ther.* 2006;13(4):729-37.

Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3⁺ 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*. 2010;32(5):642-53.

Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007;316(5822):295-8.

Park JY, Kob M, Prodeus AP, 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.

Piccirillo CA, 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.

Porritt HE, Rumpf LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. 2004;20(6):735-45.

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 NA, et al. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood*. 2000;95(4):1283-92.

Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med.* 1995;333(7):431-40.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.

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.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.

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.* 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.

Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012;26(6):2253-76.

Schneider MA, 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.

Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1295-301.

Shcherbina A, Cooley J, Lutskiy MI, Benarafa C, Gilbert GE, Remold-O'Donnell E. WASP plays a novel role in regulating platelet responses dependent on alphaIIb beta3 integrin outside-in signalling. *Br J Haematol.* 2010;148(3):416-27.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30(5):636-45.

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. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):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. A family of WASPs. *N Engl J Med.* 2003;348(4):350-1.

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(1):81-91.

Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith MA. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171(10):5042-50.

Soper DM, Kasprovicz DJ, Ziegler SF. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1817-26.

Stewart DM, Tian L, Nelson DL. Mutations that cause the Wiskott-Aldrich syndrome impair the interaction of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) with WASP interacting protein. *J Immunol.* 1999;162(8):5019-24.

Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125(6 Pt 1):876-85.

Suzuki H, Kündig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* 1995;268(5216):1472-6.

Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol.* 2002;169(5):2461-5.

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.

Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):127-35.

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.

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, 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. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):635-46.

Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):182-92.

Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol.* 2008;181(5):3285-90.

Verhagen J, Wraith DC. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol*. 2010;185(12):7129; author reply 30.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32.

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.

Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernández C, Thrasher AJ, Severinson E. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood*. 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.

Wiskott A. Familial congenital Werlhof's disease? : *Montsschr Kinderheilkd* 1937. p. 212–16.

Wu L. T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(2):121-6.

Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6).

Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(10):1713-22, S1-19.

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):1643-56.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*. 2007;27(1):145-59.

- Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29(1):44-56.
- Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e34547.
- Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science*. 2010;328(5982):1129-35.
- Zhang J, Shehabeldin A, da Cruz LA, Butler J, Somani AK, 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.
- Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. 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.
- Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol*. 2008;180(11):7112-6.
- Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. 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 Y, Yu K, Du J, Jiang L, Zhang S, Han Y, et al. Potential therapeutic strategy for non-Hodgkin lymphoma by anti-CD20scFvFc/CD28/CD3zeta gene transfected T cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:121.
- Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells*. 1994;12(5):456-65.
- Zúñiga-Pflücker JC. The original intrathymic progenitor from which T cells originate. *J Immunol*. 2009;183(1):3-4.

APÊNDICE A – Distribuição de células F_{oxp3}⁺ no timo de camundongos WT e WKO.

Após termos demonstrado que no timo de camundongos WKO, observa-se uma diminuição de células Treg, nosso grupo decidiu avaliar a localização de células F_{oxp3}⁺ nesse órgão. Dados já publicados demonstram que as células Treg localizam-se na região medular tímica e junção córtico-medular, não tendo sido observadas no córtex tímico (Sakaguchi, 2004; Fontenot *et al.*, 2005). Igualmente, estudos do nosso grupo (Larissa Vasconcelos Fontes, 2013) mostraram, através de análise por microscopia confocal, que camundongos WKO apresentam as células F_{oxp3}⁺ em localização circunscrita à região medular e, ainda, em menor número quando comparadas às células do camundongo controle, conforme esperado. Importante ressaltar que essas análises foram feitas em camundongos WKO que se apresentam em fundo genético BALB/c.

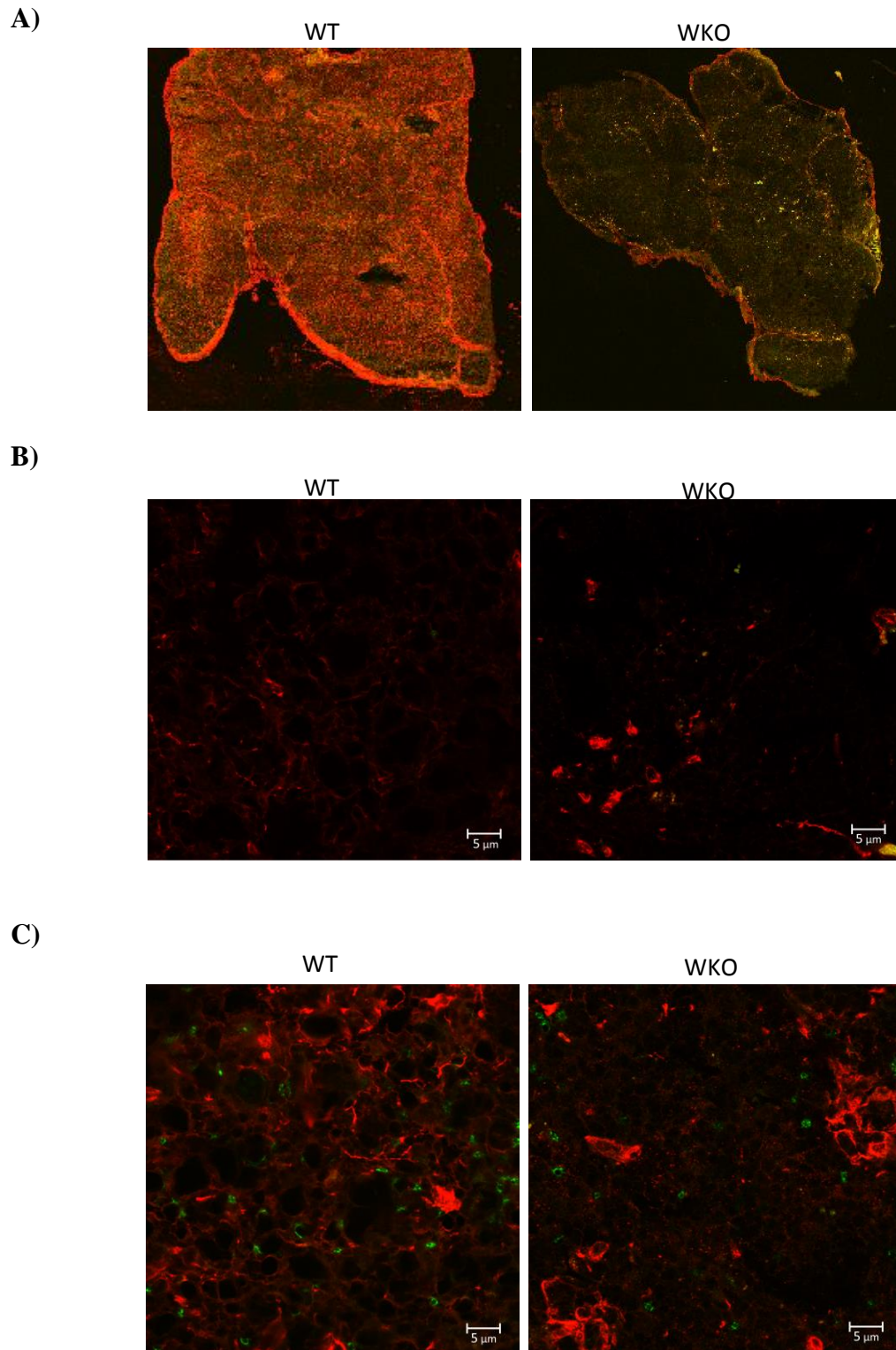


Figura 18. Fotomicrografias representativas dos lóbulos tímicos de animais Balb/c WT e WKO (A), do padrão de distribuição de células Foxp3⁺ (verde) e matriz extracelular marcada com anti-fibronectina (vermelho) no córtex tímico de animais WT e WKO (B) e distribuição de células Foxp3⁺ na medula tímica de animais WT e WKO (C).