

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

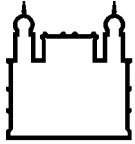
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ATIVAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS EPITELIAIS TÍMICAS  
APÓS CASTRAÇÃO

AILIN LEPLETIER DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro

Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em em Biologia Celular e Molecular**

*AILIN LEPLETIER DE OLIVEIRA*

### **ATIVAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS EPITELIAIS TÍMICAS APÓS CASTRAÇÃO**

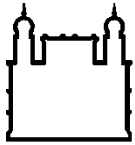
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Wilson Savino

**RIO DE JANEIRO**

Abrl de 2015

ii



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AILIN LEPLETIER DE OLIVEIRA***

### **ATIVACÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS EPITELIAIS TÍMICAS APÓS CASTRAÇÃO**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. WILSON SAVINO (FIOCRUZ / RJ)**

**Aprovada em:   29   /   04   /   2015**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marcello André Barcinski – Presidente (FIOCRUZ - RJ)**

**Prof. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos (USP - SP)**

**Prof. Dra. Adriana Cesar Bonomo (FIOCRUZ - RJ)**

**Prof. Dra. Valeria de Mello Coelho (UFRJ - RJ)**

**Prof. Dr. Hugo C. C. Faria e Neto (FIOCRUZ - RJ)**

Rio de Janeiro, 18 de maio de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais por terem me proporcionado o prazer indescritível de viver todas as delícias e dificuldades dessa vida, por me instruírem no meu processo de aprendizado sempre me ensinando que cada dificuldade deve ser encarada como uma chance de crescimento e me provendo muito amor e carinho em todos os momentos que eu precisei.

Agradeço ao Dr. Wilson Savino, que tem sido meu orientador desde a minha graduação, por cada passo que eu dei na minha carreira, por me fazer enxergar através das suas retinas toda a complexidade e integração do sistema neuro-imuno-endócrino, e por fazer eu me apaixonar por esse tema tão maravilhoso. Por acreditar em mim e no meu sonho e permitir que a Austrália acontecesse na minha vida.

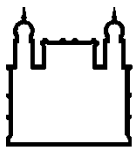
Em especial agradeço a minha co-orientadora Ann Chidgey, que me recebeu de braços abertos e possibilitou que esse projeto acontecesse. Por seu acolhimento e orientação impecáveis, prestando sempre atenção nos mínimos detalhes e promovendo todas as articulações necessárias para esse lindo projeto acontecer. Agradeço também ao Prof Richard Boyd, líder do Laboratório de Imuno Regeneração na Universidade de Monash, onde essa tese foi executada. À Maree Hammet, que iniciou esse projeto junto à Ann e me ensinou todas as técnicas necessárias para a execução dos experimentos. Aos amigos, Abdul, Marco, Michael e Mark pelo ambiente de trabalho sempre maravilhoso.

Agradeço à família do laboratório de Pesquisas sobre o Timo que tem estado comigo desde a minha graduação, me acompanhando e servindo de espelho no meu processo de crescimento.

À Dra Adriana Bonomo pela disponibilidade em revisar essa tese e pela banca examinadora pela aceitação e avaliar o meu trabalho.

“A lei da mente é implacável.  
O que você pensa, você cria;  
O que você sente, você atrai;  
O que você acredita, torna-se realidade.”

Sidarta Gautama



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ATIVÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS EPITELIAIS TÍMICAS APÓS CASTRAÇÃO

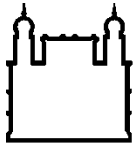
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Ailin Lepletier de Oliveira

A involução do timo associada ao envelhecimento é acompanhada por redução do desenvolvimento e exportação de células T para a periferia do sistema imune, o que afeta a competência imunológica. A relação causal entre hormônios sexuais e atrofia tímica senil já está bem estabelecida. Embora a depleção de hormônios sexuais tenha sido demonstrada em regenerar o timo, restabelecendo o compartimento linfóide e promovendo a recuperação de células T, pouco é conhecido sobre os fatores desencadeadores desse processo e as alterações promovidas no microambiente tímico. O presente estudo demonstra que embora a castração afete globalmente as diferentes subpopulações de células epiteliais tímicas (TEC) e linfóides, o processo regenerativo do timo em camundongos envelhecidos é iniciado especificamente a partir da diferenciação de TEC corticais expressando baixos níveis de MHCII (cTEC lo). Observamos que a depleção de hormônios sexuais em camundongos envelhecidos (9 - 11 meses) resulta em redução de células cTEC lo seguida do aumento de cTEC hi e TEC medulares, tanto com baixa quanto alta expressão de MHCII (mTEC lo e mTEC hi, respectivamente). Ainda, observamos a recuperação do compartimento epitelial ocorre simultaneamente ao aumento da expressão dos fatores de diferenciação e ativação de TEC, FoxN1, Wnt4 e DLL4, além de aumento dos receptores de activina acvr1a, acvr2a e acvr2b em cTEC lo no dia 4 pós castração, ao mesmo tempo em que a biodisponibilidade de activina no está aumentada no timo desses animais. A adição de activina em sistema de cultura celular primária 3D gerou aumento da diferenciação de mTEC a partir de cTEC lo obtidas do timo senil, enquanto ensaios in vitro e in vivo demonstraram que, por outro lado, a inibição da sinalização de activina no timo jovem gera um perfil de TEC semelhante ao de animais envelhecidos. Através do transplante de cultura de timo fetal (FTOC) na capsula renal de camundongos atímicos demonstramos que a produção de activina pelo microambiente tímico é necessária pra o desenvolvimento de células T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Por ultimo, através do tratamento de animais envelhecidos castrados com folistatina, antagonista fisiológico de activina, demonstramos que o aumento da sinalização de activina pós castração é essencial para recuperação das diferentes subpopulações de TEC e de tímócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>, além de restabelecer a expressão de DLL4 no compartimento cortical de TEC. Juntos, esses dados apontam activina

como um hormônio essencial para o restabelecimento da atrofia tímica senil tanto diretamente por induzir o restabelecimento do compartimento epitelial, como indiretamente por restabelecer a sinalização de DLL4-Notch, necessária para o desenvolvimento das diferentes populações de timócitos a partir de progenitorshematopoiéticos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### THYMIC EPITHELIAL PROGENITOR CELL ACTIVATION FOLLOWING CASTRATION

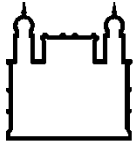
#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN MOLECULAR AND CELLULAR CELL BIOLOGY

Ailin Lepletier de Oliveira

The involution associated with aging is accompanied by reduction in thymus development and export of T cells towards the periphery of the immune system, which affects the immune competence. The causal relationship between sex hormones and senile thymic atrophy is already well established. Although the depletion of sex hormones have been shown to regenerate the thymus restoring lymphoid compartment and promoting the recovery of T cells, little is known about the factors that trigger this process and the changes induced in the thymic microenvironment. The present study demonstrates that although castration generally affects the different subpopulations of thymic epithelial cells (TEC) and lymphoid cells the regenerative process of the thymus in aged mice is initiated specifically from cortical TEC expressing low levels of differentiation MHCII (cTEC lo) . We note that the depletion of sex hormones in aged mice (9 - 11 months) results in reduction in cTEC lo cells followed by the increase of cTEC hi and medullary TEC, both with low and high expression of MHCII (mTEC lo and mTEC hi, respectively) . Also, we observe the recovery of the epithelial compartment occurs simultaneously with the increase in the expression of TEC differentiation and activation factors, Foxn1, Wnt4 and DLL4, and increased activin receptors acvr1a, acvr2a and acvr2b in cTEC lo at day 4 post castration, at the same time the activin bioavailability is increased in the thymus of the animals. The addition of activin in primary 3D cell culture system generated increased differentiation mTEC from cTEC lo obtained from senile thymus, while *in vitro* and *in vivo* assays showed that, on the other hand, inhibition of activin signaling in the young thymus generates a TEC profile similar to that of aged animals. Through fetal thymus transplantation culture (FTOC) in renal capsule of athymic mice we demonstrate that the production of activin in thymic microenvironment is required for the development of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>. Finally, by treatment of aged castrated animals with follistatin, physiological antagonist of activin, we demonstrate that the increase in activin signaling post castration is essential for the recovery of different subpopulations of TEC and thymocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>, and reestablish the expression of DLL4 in cTEC. Together, these data indicate activin as a hormone essential for the restoration of the senile thymic atrophy either directly inducing the restoration of TEC and indirectly by restoring DLL4-Notch signaling necessary for the growth of different populations of thymocytes from hematopoietic progenitors.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	O TIMO.....	1
1.1.1	ASPECTOS GERAIS .....	1
1.1.2	COMPOSIÇÃO DO MICROAMBIENTE TIMICO .....	2
1.1.3	PAPEL DE FOXN1 NO ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DO MICROAMBIENTE TIMICO .....	4
1.1.4	CÉLULAS TRONCO EPITELIAIS TIMICAS: TEORIA DO PROGENITOR COMUM.....	6
1.1.5	TIMOPOIESE: GERAÇÃO DE CÉLULAS TAB.....	8
1.1.5.1	PAPEL DA SINALIZAÇÃO DE DLL1 E DLL4 NA TIMOPOIESE .....	10
1.1.6	EVENTOS DE SELEÇÃO INTRATÍMICA.....	11
1.2	ATROFIA TIMICA E IMUNOSCENECÊNCIA.....	13
1.2.1	ALTERAÇÕES DO TIMO DURANTE O ENVELHECIMENTO .....	13
1.2.1.1	RUPTURA DA REDE EPITELIAL TIMICA.....	14
1.2.1.2	PROCESSO DE FIBRO-ADIPOGENESE.....	15
1.2.1.3	REDUÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE TIMÓCITOS.....	16
1.2.2	HORMONIOS SEXUAIS E TIMO .....	18

1.2.3	REGENERAÇÃO DA ATROFIA TIMICA SENIL ATRAVES DE CASTRAÇÃO .....	20
1.3	ACTIVINA E IMUNORREGULAÇÃO.....	21
1.3.1	MECANISMOS DE AÇÃO DE ACTIVINA.....	21
1.3.2	EFEITO DE ACTIVINA NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T .....	22
1.4	JUSTIFICATIVA.....	23
2	OBJETIVOS .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1	ANIMAIS E DROGAS UTILIZADAS .....	26
3.2	TÉCNICAS UTILIZADAS IN VIVO.....	26
3.2.1	DEPLEÇÃO CIRÚRGICA DE HORMÔNIOS SEXUAIS.....	26
3.2.2	TRANSPLANTE DE CULTURA FTOC TRATADA COM DGUO NA CÁPSULA RENAL.....	27
3.3	HISTOLOGIA .....	27
3.4	ANTICORPOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO OU ISOLAMENTO CELULAR.....	27
3.5	DIGESTÃO DO TECIDO TÍMICO PARA ANÁLISE FENOTÍPICA E ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESTROMAIS.....	28

3.5.1	DIGESTÃO DE TIMOS INDIVIDUAIS PARA ANÁLISE FENOTÍPICA DE CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS .....	28
3.5.2	DIGESTÃO DE TIMOS AGRUPADOS PARA ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS .....	29
3.6	ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS .....	29
3.6.1	ISOLAMENTO MAGNÉTICO DE CÉLULAS ESTROMAIS CD45 .....	29
3.6.2	ISOLAMENTO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	30
3.7	ANÁLISE FENOTÍPICA DE CÉLULAS T E CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS .....	31
3.8	ANÁLISE MOLECULAR DE SUBPOPULAÇÕES DE ESTROMA TÍMICO ISOLADAS.....	32
3.8.1	ISOLAMENTO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E ANÁLISE POR QPCR.....	32
3.8.2	ANÁLISE POR MICROARRANJO GÊNICO.....	33
3.9	CULTURA CELULAR EM SISTEMA 3D .....	33
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
4	RESULTADOS .....	35
4.1	A ATROFIA TÍMICA SENIL É CARACTERIZADA POR ACENTUADA REDUÇÃO NO NÚMERO DE MTEC E TIMÓCITOS E SIMULTÂNEO ACÚMULO DE CTEC LO.....	35

4.2	A EXPANSÃO DO COMPARTIMENTO LINFÓIDE APÓS CASTRAÇÃO ESTÁ ASSOCIADA AO AUMENTO DE MTEC E EXPRESSÃO DE MHCII EM CTEC E MTEC .....	36
4.3	A DEPLEÇÃO DE HORMÔNIOS SEXUAIS INDUZ AUMENTO DA EXPRESSÃO DE FOXN1, WNT4 E DLL4 CONCOMITANTE À SINALIZAÇÃO DE ACTIVINA EM CTEC LO DE ANIMAIS SENIS.....	42
4.4	CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA A EXPRESSÃO DE ACTIVINA APRESENTAM REDUÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MTEC .....	49
4.5	A SINALIZAÇÃO DE ACTIVINA EM TEC É NECESSÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS T.....	54
4.6	A CASTRAÇÃO INDUZ RESTABELECIMENTO DA ATROFIA TÍMICA ATRAVÉS DO AUMENTO DA SINALIZAÇÃO DE ACTIVINA .....	58
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÃO	78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Modelo de diferenciação de TEC a partir de um progenitor comum em timos adultos .....	<b>8</b>
<b>Figura 1.2</b> Representação esquemática da timopoiese .....	<b>13</b>
<b>Figura 1.3</b> Mecanismos subjacentes à atrofia do timo durante o envelhecimento .....	<b>17</b>
<b>Figura 1.4</b> Representação do eixo hipotálamo – hipófise – gonadal .....	<b>20</b>
<b>Figura 1.5</b> Inibinas e activinas regulam a diferenciação de células T .....	<b>23</b>
<b>Figura 3.1</b> Perfil fenotípico de TEC isoladas por citometria de fluxo .....	<b>31</b>
<b>Figura 3.2</b> Método para cultura in vitro de TEC em sistema 3D.....	<b>34</b>
<b>Figura 4.1</b> Totais celulares obtidos a partir timos de camundongos jovens, envelhecidos não tratados, envelhecidos castrados e sham castrados analisados em diferentes dias após castração .....	<b>37</b>
<b>Figura 4.2</b> Perfis citofluorimétricos de TEC obtidas de animais jovens e envelhecidos.....	<b>38</b>
<b>Figura 4.3</b> Valores relativos e absolutos de TEC em timos de camundongos jovens, envelhecidos não tratados, envelhecidos castrados e sham castrados analisados em diferentes dias após castração .....	<b>39</b>
<b>Figura 4.4</b> Valores relativos e absolutos de TEC proliferativas ki67+ obtidas de camundongos jovens, envelhecidos não tratados, envelhecidos castrados e sham castrados analisados em diferentes dias após castração	<b>41</b>
<b>Figura 4.5</b> Valores relativos e absolutos de mTECs AIRE+ obtidas de timos de camundongos jovens, envelhecidos não tratados, envelhecidos	

castrados e sham castrados analisados em diferentes dias após castração **42**

**Figura 4.6** Expressão gênica de FoxN1, Wnt4 e DLL4 em cTEC e mTEC de animais envelhecidos não tratados ou castrados em diferentes dias ..... **45**

**Figura 4.7** Expressão gênica nas diferentes subpopulações de TEC obtidas de animais jovens ou envelhecidos não tratados e animais envelhecidos castrados analisados no dia 4 após castração..... **46**

**Figura 4.8** Perfil de expressão gênica em TECs totais obtidas de animais envelhecidos não tratados, envelhecidos castrados após 4 e 7 dias e jovens através da técnica de microarranjo de DNA..... **47**

**Figura 4.9** Modulação intratímica do circuito de activina-folistatina..... **48**

**Figura 4.10** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67+, TEC AIRE+ e tímócitos obtidas de camundongos jovens com expressão total ou parcial de activina  $\beta$ A ..... **51**

**Figura 4.11** Valores e representação esquemática de células cTEC lo classificadas como TEPC, potencial intermediário e baixo potencial de TEPC obtidas de camundongos jovens com expressão total ou parcial de activina  $\beta$ A **52**

**Figura 4.12** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC e tímócitos de embriões de camundongos com expressão total, parcial ou nula de activina  $\beta$ A..... **53**

**Figura 4.13** Cultura celular 3D de células epiteliais tímicas + fibroblastos de embriões de camundongos durante 7 dias ..... **54**

<b>Figura 4.14</b> Perfis de células T no timo, sangue e baço de camundongos atímicos “nudes” transplantados com cultura de timo embrionário com expressão normal, parcial ou nula de activina $\beta$ A .....	<b>56</b>
<b>Figura 4.15</b> Análise da expressão de UEA-1 em enxertos renais realizados a partir do transplante de cultura de timo embrionário com expressão normal, intermediária ou nula de activina $\beta$ A .....	<b>57</b>
<b>Figura 4.16</b> Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67+, TEC AIRE+ e timócitos obtidas de camundongos jovens tratados durante 7 dias com folistatina i.p. ou PBS como controle.....	<b>62</b>
<b>Figura 4.17</b> Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67+, TEC AIRE+ e timócitos obtidas de camundongos jovens tratados durante 14 dias com folistatina i.p. ou PBS como controle.....	<b>63</b>
<b>Figura 4.18</b> Valores totais de TEC, TEC ki67+ e mTEC AIRE+ em camundongos envelhecidos castrados e sham castrados analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise com folistatina i.p. ou PBS como controle.....	<b>64</b>
<b>Figura 4.19</b> Valores de células cTEC lo classificadas como TEPC, potencial intermediário e baixo potencial de TEPC em camundongos envelhecidos castrados e sham castrados analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise com folistatina i.p. ou PBS como controle .....	<b>65</b>
<b>Figura 4.20</b> Valores totais de timócitos e timócitos ki67+ em camundongos envelhecidos castrados e sham castrados analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise com folistatina i.p. ou PBS como controle.....	<b>66</b>

<b>Figura 4.21</b> Valores totais de TEC DLL4+ em animais jovens e envelhecidos sem tratamento, bem como envelhecidos castrados e sham castrados analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise com folistatina i.p. ou PBS como controle.....	<b>67</b>
<b>Figura 5.1</b> Esquema sugestivo representando o mecanismo pelo qual a castração recupera a atrofia tímica senil .....	<b>76</b>



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIRE: fator de regulação autoimune

cTEC hi: célula epitelial tímica cortical com alta expressão de MHCII

cTEC lo: célula epitelial tímica cortical com baixa expressão de MHCII

cTEC: célula epitelial tímica cortical

CTH: células tronco hematopoiéticas

DLL1: ligante delta tipo 1

DLL4: ligante delta tipo 4

DN: timócito duplo negativo

DP: timócito duplo negativo

ECM: matriz extracelular

EMT: transição epitélio-mesenquimal

ETP: progenitores tímicos iniciais

FSH: hormônio folículo estimulante

FST: folistatina

FTOC: cultura de timo fetal

HSC: células tronco hematopoiéticas

LH: hormônio luteinizante

LHRH: hormônio liberador de hormônio luteinizante

LPC: células progenitoras linfóides

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

mTEC hi: célula epitelial tímica medular com alta expressão de MHCII

mTEC lo: célula epitelial tímica medular com baixa expressão de MHCII

mTEC: célula epitelial tímica medular

PPMP: progenitores multipotentes da medula óssea

SCID: síndrome da imunodeficiência combinada grave

SP: timócito simples positivo

TCR: receptor de célula T

TDC: célula dendrítica tímica

TEC: célula epitelial tímica

TEPC: célula progenitora epitelial tímica

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$

TRA: antígeno de restrição tecidual

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O TIMO

### 1.1.1 Aspectos Gerais

O timo é o órgão linfóide primário que promove o desenvolvimento e a formação do repertório de linfócitos T. Situa-se no mediastino anterior, próximo do coração e grandes vasos da base, sendo dividido em dois lobos envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo que penetra no órgão através de prolongamentos ou septos que ao se unirem dividem o órgão em lóbulos. Os septos, formados por fibroblastos e matriz extracelular enriquecida em colágeno tipo I, partem da cápsula e penetram no parênquima do timo chegando às regiões de interseção entre córtex e medula, delimitando os lóbulos tímicos e carreando vasos sanguíneos(1). Cada lóbulo tímico possui quatro regiões que podem ser demarcadas por parâmetros histológicos e de diferenciação de timócitos: região subcapsular, cortical, córtico-medular e medular. A parte periférica de cada lóbulo, denominada córtex, é formada por tecido linfóide denso e contém a maioria dos timócitos relativamente imaturos e em proliferação, enquanto a porção central ou medula é constituída por tecido linfóide frouxo e contém as células maduras(2). O microambiente de cada lóbulo tímico é essencialmente formado por uma rede de células epiteliais, macrófagos e células dendríticas e ainda uma rede de moléculas de matriz extracelular (ECM), por entre as quais migram e interagem os timócitos - designação geral das células em diferentes estágios de diferenciação que vão dar origem aos linfócitos T maduros.

O timo se mantém em crescimento até a décima semana de idade pós-natal, com intensa atividade mitótica de timócitos, passando então a sofrer perda da massa linfocitária, principalmente em seu córtex, fenômeno denominado involução tímica natural(3). A região cortical pode desaparecer completamente, enquanto os remanescentes medulares persistem, e é possível que a diferenciação de células T no timo continue durante toda a vida do indivíduo adulto, ainda que em taxas muito reduzidas. Além disso, observa-se com o passar da idade a presença de quantidades crescentes de tecido adiposo no parênquima do órgão, o qual parece surgir de precursores de tecido conjuntivo intralobular(4).

Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo são derivados de células-tronco hematopoiéticas que migram ativamente para o órgão, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-ECM ou ainda através de fatores solúveis. Estas interações celulares determinam a migração e diferenciação dos precursores (5-7), que é comumente caracterizada pela expressão temporal e coordenada de proteínas de superfície celular, que incluem dentre outras, as moléculas CD25, CD44, CD4, CD8 e o receptor de célula T (TCR), acoplado ao complexo CD3. Consequentemente, a interação dos timócitos com o microambiente tímico e sua gradual diferenciação gera um repertório intratímico de células T diverso e funcional, restrito ao complexo histocompatibilidade principal (MHC) e tolerante aos antígenos próprios do organismo(7-9). Os linfócitos T maduros, assim selecionados no timo, são liberados para a circulação sanguínea e colonizam regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos, as chamadas áreas timo-dependentes. Nestes sítios, os linfócitos T ativados poderão proliferar em resposta a um determinado estímulo antigênico, e em seguida migrar para sítios específicos, onde irão exercer sua atividade efetora. Portanto, a formação do repertório de células T consiste em etapas determinantes durante o desenvolvimento dos timócitos. A dinâmica de migração dos timócitos em desenvolvimento através dos distintos compartimentos tímicos é crucial para a seleção e formação deste repertório de células T, e será discutida detalhadamente nas seções posteriores.

### **1.1.2 Composição do microambiente tímico**

As células epiteliais tímicas (TEC) compõem a maior parte do microambiente tímico, podendo ser classificadas em corticais ou medulares de acordo com a localização e expressão diferencial de citoqueratina. Ao contrário das TEC corticais (cTEC) que expressam K5 em condições fisiológicas, as TEC medulares (mTEC) expressam K8(2, 7, 10).

As cTEC são caracterizadas fenotipicamente com base na expressão dual de EpCAM1 e Ly51 (11). São fundamentais no processo de recrutamento de precursores hematopoiéticos e comprometimento com linhagem T, o que está relacionado à expressão de ligantes de Notch e de diferentes integrinas em cTEC, além da produção de proteínas da ECM e de citocinas por essas células (7, 10). Tais características também estão relacionadas à migração de timócitos durante o

processo de diferenciação intratímica, rearranjo de TCR e seleção positiva, etapa essa mediada pela expressão funcional de moléculas MHC de classe I e II na superfície das cTECs.

Na região cortical do timo também encontramos complexos linfoepiteliais, as células nurse tímicas, que estão arranjadas de forma a criar um microambiente especial para a diferenciação e proliferação de timócitos através de interações que ocorrem entre TEC e timócitos, mediadas por fatores solúveis, ECM e interações MHC-TCR. Tais complexos, juntamente a macrófagos tímicos, participariam da eliminação dos timócitos que sofrem apoptose, devido ao rearranjo gênico não-funcional do TCR, ou por não terem sido positivamente selecionados (12).

As TEC medulares (mTEC) apresentam fenótipo  $\text{EpCAM}^+\text{UEA-1}^+\text{Ly51}^-$  e expressam ambas as moléculas do MHC classe I e classe II. O desenvolvimento e organização anormal de mTEC esta associado à autoimunidade (13). O estabelecimento de tolerância a células T no timo depende de diversos mecanismos que envolvem seleção clonal com deleção e indução de anergia de timócitos que expressam TCR potencialmente autorreativos, com alta especificidade por complexos MHC-peptídeo expressos por células dendríticas e mTEC, além da seleção positiva de células T reguladoras de fenótipo  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  (14, 15). A identificação da subpopulação de mTEC expressando o gene codificador da proteína de regulação auto-imune (AIRE) indica a importância dessas células para o processo de tolerância central. O gene AIRE codifica uma proteína de 545 aminoácidos localizada no núcleo, consistente com a sua função de regulador transcricional de genes-alvo (14). A deficiência de AIRE resulta na redução da expressão intratímica de antígenos de restrição tecidual (TRA) em mTEC, e gera um defeito de indução de tolerância e autoimunidade tecido-específica. Tais dados sugerem que a expressão de AIRE em mTEC permite a expressão intratímica de antígenos próprios gerando a tolerância central de linfócitos T (7, 16). Este arranjo intratímico de proteínas próprias da periferia é apresentado aos timócitos diretamente pelas mTEC ou de forma cruzada por células dendríticas do microambiente tímico (TDC) durante os eventos de seleção negativa.

As células TDC apresentam-se fenotípica e funcionalmente distintas. Estão localizadas principalmente na medula, ao longo dos vasos sanguíneos e especialmente na junção córtico-medular. As TDC convencionais são heterogêneas e formam duas subpopulações, uma principal, que se desenvolve a partir de

precursores intratímicos, e uma menor, provavelmente de origem extratímica. Evidências crescentes sugerem que as TDC possam realizar apresentação cruzada de peptídeos próprios para timócitos em desenvolvimento, exercendo um importante papel na seleção negativa e indução de tolerância central por deleção clonal (17, 18), ao contrário das mTEC, cujo efeito tolerogênico está relacionado principalmente à indução de anergia de células T. Além disso, uma segunda população intratímica de TDC plasmacitóides produzem interferons tipo I em situações de ativação, o que pode estar relacionado à participação na diferenciação intratímica.

Como componentes do microambiente tímico presentes em firme contato com timócitos também estão os macrófagos, os quais parecem interferir na diferenciação de timócitos através da apresentação de antígenos e da liberação de citocinas. De forma mais importante, como células fagocitárias, parecem ter importância fundamental na reabsorção de timócitos que sofreram apoptose(19), fenômeno esse relacionado à seleção negativa e ainda à involução do órgão, e que será discutido mais adiante.

### **1.1.3 Papel de FoxN1 no estabelecimento e manutenção do microambiente tímico**

O gene FoxN1 pertence à família de genes “*forkhead box*” que compreende um grupo diverso de fatores de transcrição que têm sido implicados numa variedade de processos bioquímicos e celulares, tais como desenvolvimento, metabolismo, envelhecimento e câncer (20, 21). Estes fatores de transcrição partilham da propriedade comum de serem regulados durante o desenvolvimento e de dirigir a transcrição tecido-específica, além de decisões quanto ao destino de células em diferenciação. FoxN1 é expresso seletivamente no timo em TECs, onde atua por meio de seus alvos moleculares para regular o equilíbrio entre o crescimento e diferenciação (22). Em particular, a expressão de FoxN1 é necessária para a formação do epitélio do timo e diferenciação a partir de um progenitor epitelial comum de uma rede de cTEC e mTEC necessária para a comunicação com o compartimento linfóide. FoxN1 é expresso em todas as TECs durante a embriogênese, mas não em todas as TECs do timo adulto, indicando que esse gene é estritamente regulado durante o desenvolvimento(23). A mutação em FoxN1 gera digenesia tímica alinfóide cística devido à formação de TECs defeituosas, causando imunodeficiência primária de células T, chamada síndrome nu / SCID, e levando a

um fenótipo sem pêlo "nu", observado tanto em camundongos quanto seres humanos (24). Este defeito do sistema imune representa o primeiro exemplo de fenótipo de imunodeficiências combinadas graves (SCID), não relacionados primariamente a uma anormalidade intrínseca de células hematopoiéticas, mas sim a uma alteração particular de células do epitélio tímico.

Os mecanismos moleculares através dos quais a expressão e atividade FoxN1 são regulados não são completamente compreendidos, apesar de evidências sugerirem que a expressão de FoxN1 é regulada pela sinalização de proteínas "wingless" (Wnt) (25), uma família de glicoproteínas secretadas que desempenham um papel no direcionamento de destino celular (26), e a "bone morphogenetic protein" (BMP), através de sinalização parácrina e autócrina, necessária para o desenvolvimento normal do timo (25, 27). Os genes-alvos de Foxn1 não foram completamente identificados devido a dificuldades técnicas em isolar TEC fisiologicamente intactas nas diferentes etapas do processo de diferenciação, embora evidência crescentes tem demonstrado que vários genes são alvo moleculares de FoxN1, incluindo Notch ligantes, "delta-like ligand-1" e "delta-like ligand-4" (DLL1 e DLL4)(28) e as quimiocinas, CCL25 e CXCL12 (29).

Além do seu papel na organogênese, tem sido demonstrado que FoxN1 coordena a proliferação de TECs tanto em timos de embriões quanto adultos, por meio da regulação de genes em fase S. Em camundongos mutantes para a proteína supressora de tumor RB, a atividade aumentada de fatores de transcrição E2F resulta em aumento da expressão de FoxN1 e consequente proliferação das subpopulações de TEC, enquanto a inibição da expressão de FoxN1 nestes mutantes inibe a expansão do timo (30).

A superexpressão de FoxN1 em camundongos envelhecidos induz ao aumento da proliferação de TECs com alta expressão de MHC II (TEC hi) e impede o desenvolvimento de alterações estruturais associadas à involução do timo (31). Recentemente, Bredenkamp e cols. demonstraram que a regeneração específica de FoxN1 durante o envelhecimento resulta em uma robusta recuperação do timo, caracterizada por um declínio atenuado nos progenitores de células T e nos números de timócitos, paralelamente a um aumento no número de emigrantes tímicos recentes para a periferia (32). O mesmo grupo recentemente demonstrou que é possível reprogramar-se fibroblastos para que estes se diferenciem em TEC através da expressão forçada de FoxN1 (33).

Além do seu papel na proliferação, parte da influência do declínio de FoxN1 no envelhecimento do timo parece estar relacionado com a indução de diferenciação pro-adiposa de TEC, discutida detalhadamente a seguir. De acordo, a diminuição prolongada de FoxN1 e o seu regulador de Wnt-4 levam à degeneração da rede epitelial tímica (34) enquanto que a super expressão de Wnt-4 protege TEC induzido contra a senescência induzida por dexametasona (35).

#### **1.1.4 Células Tronco Epiteliais Tímicas: teoria do progenitor comum**

Células-tronco e progenitoras são caracterizadas pela capacidade de auto-renovação e a propriedade de originar diferentes tipos celulares, apresentando capacidade em potencial de reparo de tecidos danificados através da divisão assimétrica e de originar dois tipos diferentes de células-filhas. Enquanto uma população continua a manter o potencial multipotente, a outra torna-se células especializadas responsáveis pela função do tecido ou órgão. Especificamente, a homeostasia dos tecidos epiteliais é normalmente mantida por contínua auto-renovação das células-tronco epiteliais (36).

Estudos prévios sugeriram que o epitélio cortical e medular possui origem em uma dupla camada germinativa, derivada respectivamente do ectoderma da terceira fenda da faringe e do endoderma da terceira bolsa faríngea (37). No entanto, observações mais recentes têm favorecido a noção de que o epitélio do timo é exclusivamente derivado do endoderma da terceira bolsa (38). De acordo, as células-tronco / progenitoras de TEC (TEPC) foram formalmente identificadas pela sua capacidade de se diferenciar em toda a gama de células epiteliais (39). A teoria que suporta a existência de TEPCs sugere que essa subpopulação surja de células com marcadores cTEC, e, em seguida, adquira marcadores mTEC (38). No entanto, existência de células TEC-tronco / progenitoras que funcionem para manter a homeostasia do microambiente tímico na fase adulta tem sido uma questão de debate.

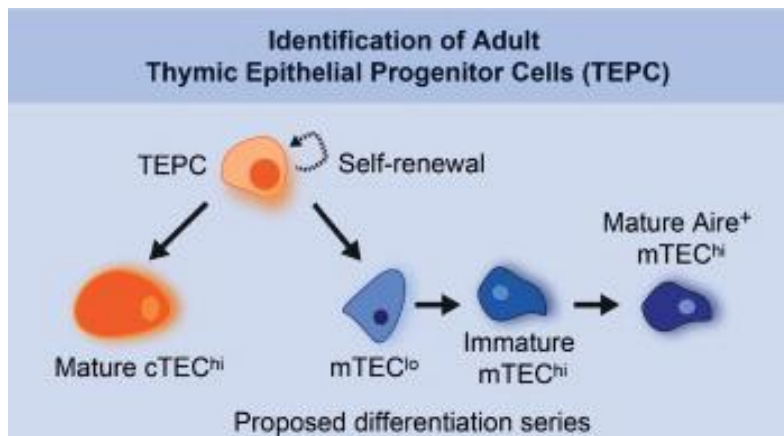
Gray e cols. (40) demonstraram previamente que as TECs constituem uma população dinâmica cuja renovação é reduzida com a idade. Enquanto que em camundongos jovens de 4 semanas de idade aproximadamente 10% de TECs parecem surgir da proliferação diária, a proporção de TECs em divisão diminui com a idade, embora algumas TEC  $ki67^+$  sejam ainda detectados em camundongos envelhecidos de 12 meses. Os vários defeitos observados na renovação e



composição do estroma que acompanham a involução senil são rapidamente revertidos após a depleção de esteróides sexuais, demonstrando que o compartimento de células estromais tímicas é muito dinâmico, com alta rotatividade de TEC e capacidade de regeneração após involução (40, 41).

Um estudo recente identificou células quiescentes cTECs não senescentes com perfil característico de células progenitoras, expressando níveis relativamente baixos de p16INK4a, p19Arf e Serpine1, além de elevada expressão de Bmi1, Foxn1, Trp63 e Wnt4 (42). Estas células foram detectadas apenas após 16 semanas de vida em adultos, mas não no neonato ou camundongos jovens. Interessantemente, demonstrou-se nesse estudo que o dramático aumento da razão de mTEC / cTEC durante as primeiras semanas de vida ocorre de forma independente da apoptose ou modulação da proliferação, favorecendo a hipótese de geração do fenótipo de mTEC a partir de cTEC(42). Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstram que a recuperação do timo após a castração de camundongos idosos reflete um aumento proporcional de células mTEC com alta expressão de MHC II (mTEC hi), que restabelecem o aumento da proporção de mTEC / cTEC e MHC IIhi / MHC IIlo ao nível de animais jovens (40).

Recentemente Wong K e cols (43) identificaram células progenitoras epiteliais no timo adulto dentro da subpopulação de TEClo, caracterizado como EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>-</sup> MHCII<sup>lo</sup> Sca1<sup>+</sup>  $\alpha$ -6integrin<sup>+</sup>. Através da combinação de caracterização molecular e celular e análise funcional de sistemas de cultura 3D *in vivo* e *in vitro*, demonstrou-se a capacidade de auto-renovação dessas células, com potencial de formação de colônias ediferenciação em ambas as linhagens de células epiteliais maduras corticais e medulares, incluindo o subconjunto medular Aire<sup>+</sup>.



**Figure 1.1 Modelo de diferenciação de TEC a partir de um progenitor comum em timos adultos.** Células epiteliais progenitoras tímicas (TEPC) foram identificadas como um subconjunto de TEC imaturas caracterizada como EpCAM<sup>+</sup>UEA-1-MHC II<sup>lo</sup> que exibem várias características marcantes da função tronco / progenitoras, como a capacidade de diferenciação em ambas as linhagens corticais e medulares maduras além do potencial de formação de colônia e auto-renovação *in vitro*. Especificamente, o modelo proposto por Wong e cols., sugere a formação de células cTEC<sup>hi</sup> e mTEC<sup>lo</sup> a partir da diferenciação direta de TEPC, enquanto mTEC<sup>hi</sup> AIRE<sup>+</sup> seriam originadas a partir do amadurecimento de mTEC<sup>lo</sup> (43).

### 1.1.5 Timopoiese: geração de células T $\alpha\beta$

Embora o timo gere continuamente linfócitos T, ele não alberga células-tronco hematopoiéticas com capacidade de autorrenovação. Assim, o repovoamento linfocitário do timo depende do recrutamento periódico de progenitores hematopoiéticos circulantes no sangue (44).

Após a entrada de precursores no timo, ocorrem muitas alterações fenotípicas relacionadas à expressão sequencial de diversas proteínas e rearranjo de genes de TCR. Tais modificações são determinadas pela interação de timócitos com fatores expressos em diferentes nichos do microambiente tímico. Parte de tais interações está relacionada aos eventos de migração celular. Nesse sentido, foi proposto que o grupo de interações moleculares relativas à migração intratímica de linfócitos caracterizaria um sistema multivetorial que determinaria o tempo e a direção da locomoção celular durante o processo de diferenciação intratímica (45). A maturação intratímica de linfócitos T expressando TCR  $\alpha\beta$  pode ser definida com base na

expressão diferencial dos marcadores c-kit, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD69 e CD44 em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1 Caracterização das principais moléculas envolvidas na timopoiese\*.**

(Adaptado de Robey, 1990)

<i>Molécula</i>	<i>Participação no desenvolvimento de células T</i>
c-kit	Receptor de fator de crescimento de células tronco (SCF), é densamente expresso nos primeiros estágios de maturação e diminui após o rearranjo de genes que compõem a cadeia $\beta$ do receptor de antígenos de células T (TCR).
complexo CD3	Formado por um conjunto de proteínas associadas ao TCR, é fundamental na transdução do sinal produzido pelo reconhecimento do antígeno.
CD4 e CD8	São glicoproteínas transmembranares; co-receptores associados ao TCR envolvidos no processo de diferenciação e ativação de células T através, respectivamente, da ligação específica ao complexo MHC de classe II e I expressos no microambiente tímico.
HSA ou CD24	Expressa em altos níveis antes do processo de seleção e ausente nas populações pós-selecionadas, é uma proteína envolvida na apoptose mediada por ativação do TCR, participando da sinalização intracelular durante os eventos de seleção negativa.
CD25	Componente do receptor de IL-2, a indução de sua expressão no estágio de DN2 está associada ao comprometimento dessas células com a geração de linfócitos T em detrimento a células dendríticas.
CD69	Marcador de ativação celular recente, sua expressão no timo está também relacionada ao processo de emigração de timócitos diferenciados.
CD44	Receptor de ácido hialurônico, pode interagir também com metaloproteinases. Expresso em timócitos corticais, participa dos processos de interações celulares, adesão e migração.

Após a entrada no timo, os progenitores T hematopoiéticos iniciam o processo de diferenciação de timócitos dando origem ao estágio DN do desenvolvimento de células T. As células DN1 (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) encontram-se na região cortical, onde estão expressos níveis mais altos os ligantes de Notch, DLL1 e DLL4 (46). Aparentemente, é a sinalização via Notch que induz o comprometimento destas células com a linhagem linfóide (47, 48) enquanto a interleucina-7 (IL-7) e o ligante de CD117 são necessários para a proliferação nesse estágio (49).

Conforme migram para a zona subcapsular, células DN1 se diferenciam em DN2 (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (61), quando a expressão dos genes de ativação de recombinase (RAG) aumenta; aqui é detectado o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias TCR $\alpha$ , mas não para a cadeia TCR $\beta$ , o que só ocorre no estágio DN3 (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>), marcando irreversivelmente o comprometimento com a linhagem T. Nesta etapa, ocorre um processo de seleção denominado seleção  $\beta$ , quando as

células que não finalizam o rearranjo do TCR $\beta$  morrem e somente células bem-sucedidas, que expressam um receptor de célula T imaturo (pré-TCR), sobrevivem e prosseguem no processo de diferenciação. A partir de então, ocorre a transição de DN para DP passando pelo estágio pré-DP ou DN4 (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>), onde extensa proliferação mediada pelo pré-TCR ocorre. Nesse contexto, a expressão de um pré-TCR completo (TCR $\beta$ , CD3 e componentes pré-TCR $\alpha$ ) em DN3 não só estimula a expressão de CD4 e CD8 mas também diminui CD25 (62), exerce exclusão alélica de TCR $\beta$ , indução do rearranjo de TCR $\alpha$ , e uma grande proliferação celular (63), desencadeando uma série de eventos que culminam na geração de timócitos DP que não mais se dividem. Ainda, entre DN4 e DP ocorre um estágio intermediário denominado timócitos simples positivos imaturos (ISP) caracterizados como CD3<sup>low</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, caracterizados por muitos autores somente como uma fase de transição e não como uma população verdadeira (50, 51). Nos timócitos DP os genes de TCR são completamente rearranjados, e o rearranjo produtivo leva à expressão membranar de baixos níveis de TCR $\alpha\beta$  complexados a CD3. Células assim rearranjadas são selecionadas positivamente quanto à capacidade em interagir com o complexo peptídeo-MHC expresso no microambiente tímico (64). Similarmente, a maturação dos estágios SP CD4 ou CD8, a partir de DP, é também mediada por eventos relacionados à sinalização de TCR; nesse caso envolvendo a forma completa do TCR $\alpha\beta$ .

#### **1.1.5.1 Papel da sinalização de DLL1 e DLL4 na timopoiese**

Os primeiros passos da diferenciação de células T exigem sinais de Notch1, que são entregues com sucesso seguindo à interação de Notch1 com o seu ligante, DLL4 no timo (52). A inativação da sinalização de Notch1 em HSCs ou progenitoras multipotentes da medula óssea (PPMP) resulta na geração intratímica de células B e impede o desenvolvimento das células T (53, 54). Por outro lado, a sinalização constitutiva de Notch inibe o desenvolvimento de células B e promove o desenvolvimento de célula T de forma independente do timo, em sistemas de cultura 3D (55, 56). Subsequente à geração dos progenitores tímicos iniciais (ETP), os sinais de Notch1 fornecem sinais essenciais desde as fases iniciais do desenvolvimento de células T até e incluindo a seleção  $\beta$ , que é um ponto de controle importante, quando as células T imaturas passam a expressar o receptor de célula pré-T como uma consequência de sucesso receptor de células T (TCR) beta VDJ recombinação (57).

Seguinte à seleção  $\beta$  bem sucedida, as células T proliferam e diferenciam-se em DP, e embora os sinais Notch1 continuem a fornecer sinais para a diferenciação de células T, o seu requerimento essencial termina com a seleção  $\beta$  bem sucedida.

A capacidade dos diferentes ligantes Notch e seus respectivos receptores em induzir o desenvolvimento de células T tem sido testada em culturas de células estromais. Nessas culturas, que freqüentemente utilizam a linhagem de células estromais OP9, tanto a expressão de DLL1 ou DLL4 nas células do estroma induz o desenvolvimento de células T a partir de células progenitoras hematopoiéticas multipotentes. Especificamente a expressão de DLL1 induz células tronco hematopoiéticas (HSC) CD34<sup>+</sup> de sangue do cordão umbilical humano a se diferenciarem em células T (57). Em estudos com HSCs murinas, DLL1 induziu o desenvolvimento de células T para a fase DP (58). Entretanto, a densidade de ligante Notch é um importante determinante do destino de diferenciação celular nesses ensaios, uma vez que a elevada densidade DLL1 foi necessária para o comprometimento total de HSCs para o destino de células T(59).

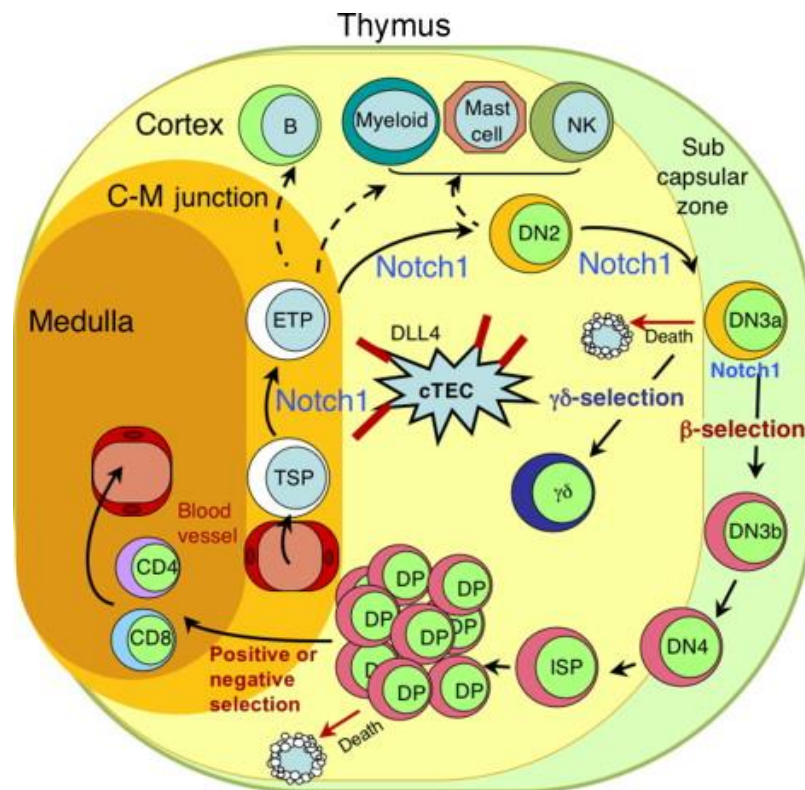
Em contraste com os resultados de células do estroma, o desenvolvimento de células T encontra-se intacto em camundongos com ausência de expressão para DLL1 (60), contrariamente ao observado em camundongos nos quais a expressão de DLL4 foi condicionalmente deletada em TECs, os quais apresentam total ausência de células T. Este resultado é consistente com os dados que demonstram que DLL4 mas não DLL1 é altamente expresso em TECs, ao passo que DLL1 é expresso principalmente nos vasos sanguíneos tímicos (61). Assim, o papel essencial de DLL4 na especificação de células T é provavelmente devido à sua alta expressão em TECs. Além disso, DLL4 liga Notch1 com maior afinidade do que DLL1, ao passo que ambos estes ligantes ligam Notch2 com baixa afinidade (62).

#### **1.1.6 Eventos de seleção intratímica**

Os processos de seleção envolvem a afinidade/avidez das interações entre o TCR dos timócitos e o complexo peptídeo-MHC expresso por células apresentadoras de antígenos. A seleção positiva ou seleção  $\beta$  resgata os timócitos da morte celular programada quando há uma avidez moderada na interação TCR/peptídeo-MHC (63). Timócitos que não passaram por um rearranjo produtivo de TCR não interagem e morrem por negligência nessa etapa. A partir da seleção positiva são obtidos clones de células T que apresentam um repertório de TCR

restrito ao MHC próprio. Ainda nesta etapa, a especificidade dos timócitos pelo MHC classe I ou classe II é considerada como determinante na divergência entre as subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Um modelo para o surgimento das populações SP supõe que as células que passam pela seleção positiva param de expressar CD8 por negligência de sinal e superexpressam o receptor de IL7 (IL-7R) (64). Se a perda de sinalização via CD8 não abolir o sinal via TCR, a expressão de CD8 continua “desligada” e passa-se à produção da subpopulação de timócitos CD4<sup>+</sup>. Por outro lado, se a perda de CD8 interrompe o sinal da seleção positiva, a sinalização via IL-7R faz o silenciamento da expressão da molécula CD4, re-indução da expressão da molécula CD8 e, assim, a célula assume o fenótipo CD8<sup>+</sup>(65).

Conforme se diferenciam em células SP, os timócitos migram para a medula tímica, onde passam por uma nova etapa denominada seleção negativa(2, 7). Nessa etapa, timócitos com TCR potencialmente autorreativos são excluídos por mecanismos que incluem a expressão de AIRE e TRA em células epiteliais e dendríticas tímicas (7, 16). Dessa forma, células T CD8<sup>+</sup> restritas a MHC de classe I e T CD4<sup>+</sup> restritas a MHC de classe II são geradas de forma a possuírem tolerância a peptídeos próprios, mas capazes de responder a antígenos estranhos expressos no contexto de proteínas de MHC próprias. Alguns timócitos com alta afinidade para auto antígenos apresentam destino alternativo, com propriedade regulatória, caracterizado pela formação de células T CD4<sup>+</sup> imunossupressoras, as denominadas células Treg (13, 14). Desta forma, na medula formam-se os linfócitos T maduros aptos para exercer suas funções efetoras e regulatórias, e lá permanecem por alguns dias antes de serem liberados ao *pool*/linfóide periférico.



**Figure 1.2 Representação esquemática da timopoiese.** Células precursoras entram no timo através dos vasos sanguíneos da junção córtico-medular posteriormente as células ETP migram para o córtex e se diferenciam através de sinais recebidos via Notch1 pela ligação com DLL4 expresso em cTECs. Timócitos imaturos DN assim migram para a zona subcapsular e reorganizam seus genes do TCR, que promovem a seleção  $\beta$  através de sinais funcionais pré-TCR  $\alpha\beta$ . As células que não conseguem reorganizar pré-TCR funcionais morrem nessa etapa conhecida como  $\beta$  seleção ou seleção positiva, enquanto aquelas que recebem sinais de pré-TCR, proliferam e diferenciam-se em DP passando pelas fases de DN4 e ISP. Em seguida as células DP migram de volta na direção da medula, quando se diferenciam em células simples positivas individuais CD4 ou CD8 seguintes seleção negativa. Células ETP, DN1 e DN2 que não recebem os sinais de Notch suficientes, podem se desenvolver em células B, células mielóides, mastócitos e células NK, como indicado pela seta pontilhada(66).

## 1.2 Atrofia tímica e imunoscenecência

### 1.2.1 Alterações do timo durante o envelhecimento

### 1.2.1.1 Ruptura da rede epitelial tímica

A atrofia no compartimento epitelial do timo começa em torno da puberdade e progride com a idade. Estudos em humanos demonstraram clara perda em espaços epiteliais, logo no primeiro ano de vida do indivíduo, com ocorrência de 75% de redução até a meia-idade, e, em seguida, um declínio gradual para o resto da vida(67). As TECs de camundongos envelhecidos têm menor capacidade proliferativa e maior taxa de apoptose, em comparação às de animais jovens. Como consequência da perda progressiva de TEC, o timo idoso é preenchido por espaços peri-vasculares não epiteliais, ocorrendo ruptura da junção cortico-medular e aumento da razão de cTEC / mTEC, devido às mTEC serem mais sensíveis aos efeitos do envelhecimento (40). Além disso, a proporção de TEC com uma expressão elevada de MHC da classe II para TEC com baixa expressão de MHC de classe II diminui gradualmente com a idade (40).

Uma interrupção na comunicação entre TEC e timócitos em desenvolvimento parece ser o fator determinante para a degeneração da estrutura epitelial durante o envelhecimento. De fato, várias interações entre essas subpopulações já foram relatadas. Especificamente, a formação, diferenciação e expansão de mTEC exige sinalização de timócitos através da ativação de NF- $\kappa$ B e CD40L (68). No entanto, não fica claro se os mesmos mecanismos que sustentam a formação inicial de um timo funcional desempenham papel na sua degeneração. O que parece é que a diminuição da disponibilidade de nichos epiteliais no estroma do timo envolvido para progenitores de células T ou a deterioração da qualidade desses nichos são responsáveis, em parte, pela redução da timopoiese durante o envelhecimento. As evidências que apoiam essa noção vêm de estudos que demonstram que o acúmulo de TEC produz um aumento proporcional do tamanho do timo. A expressão de ciclina D1 sob um promotor de queratina 5 em TECs resulta em um dramático aumento do tamanho do timo e é suficiente para retardar ou prevenir a involução (69). Usando uma abordagem baseada em fusão de embrião quimera, Jekinson e cols. (70) demonstraram que a atrofia tímica associada à idade ocorre tanto devido à restrição do crescimento do timo por redução da disponibilidade de fatores de crescimento, como devido à diminuição na proliferação de TEPCs. Juntos esses dados demonstram que a integridade do nicho epitelial serve como um fator determinante para a exportação de células T e que a restrição



do número e / ou função de TEC é um componente celular e estrutural crítico para a involução do timo.

Ainda permanece em discussão se o desencadeamento da atrofia do timo durante o envelhecimento pode estar também relacionado com um defeito intrínseco da oferta de progenitores de células-tronco hematopoéticas (CTH) pela medula óssea e sua capacidade de gerar progenitores linfóides de alta qualidade (71). A reconstituição do timo idoso com precursores da medula óssea de camundongos jovens não restaura a estrutura do compartimento tímico ou resgata plenamente a deficiência de timopoiese (72). Por outro lado, a provisão de timos jovens a camundongos envelhecidos demonstrou que as células progenitoras linfóides (LPCs) derivadas de animais senis restabelece a linfopoiese tímica e todas as subpopulações de timócitos (73), o que sugere que a capacidade reduzida de timo envelhecido de sustentar a timopoiese tenha origem em defeitos diretos ou indiretos na estromatímico relacionados à idade.

#### **1.2.1.2 Processo de fibro-adipogênese**

O envelhecimento do timo está associado com o declínio de TEC acompanhado pelo aumento de fibroblastos e dos números de adipócitos. O acúmulo de tecido adiposo com o envelhecimento é resultante da expansão de células portadoras de lípidos no interior da área medular tímica (74). Em adição a este compartimento, a infiltração de adipócitos é também observada em outras zonas do timo, que incluem o espaço perivascular não epitelial, septos interlobulares, região capsular e córtex subcapsular (4).

A relação causal entre adipogênese e involução tímica foi demonstrada pelo efeito da restrição calórica em restabelecer a função do timo durante a senescência (74). Embora os mecanismos que regem a influência da infiltração adipogênica na involução do timo não estejam completamente esclarecidos, há indicações de que o acúmulo de adipócitos durante o envelhecimento resulta da conversão de TECs. Estudos recentes sugerem que durante o envelhecimento TECs façam a transição para fibroblastos e em seguida adipócitos através da ativação do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) no timo (75). Na verdade, já está demonstrado que algumas células EMT no timo senil que expressam receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) e gotículas de gordura parecem comprometer-se com a linhagem dos adipócitos (75). A elevação de PPAR $\gamma$  e seu ativador

xantina-oxidoreductase (XOR), parece conduzir à atrofia de timo através da indução da adipogênese ectópica. Ainda, a inibição específica de PPAR $\gamma$  em células do estroma tímico geram redução na EMT, impedindo a sua transformação adipogênica através de um mecanismo dependente de XOR, resultando em elevada exportação de timócitos maduros para a periferia (74).

Assim, a perda do fenótipo TEC e aparecimento de precursores fibro-adipogênicos a partir de uma subpopulação de células estromais tímicas pode ter implicações diretas no comprometimento da timopoiese durante o envelhecimento.

### **1.2.1.3 Redução no desenvolvimento de timócitos**

No timo adulto pós-natal, o desenvolvido da rede de TEC tridimensional fornece um microambiente único para a colonização do timo, migração e diferenciação de CTH. Esta disposição 3D do microambiente é essencial para o desenvolvimento de timócitos, fenômeno esse relacionado com a indução de DLL1 e DLL4 na superfície de TEC e a conseqüente ativação da sinalização de Notch em ETP.

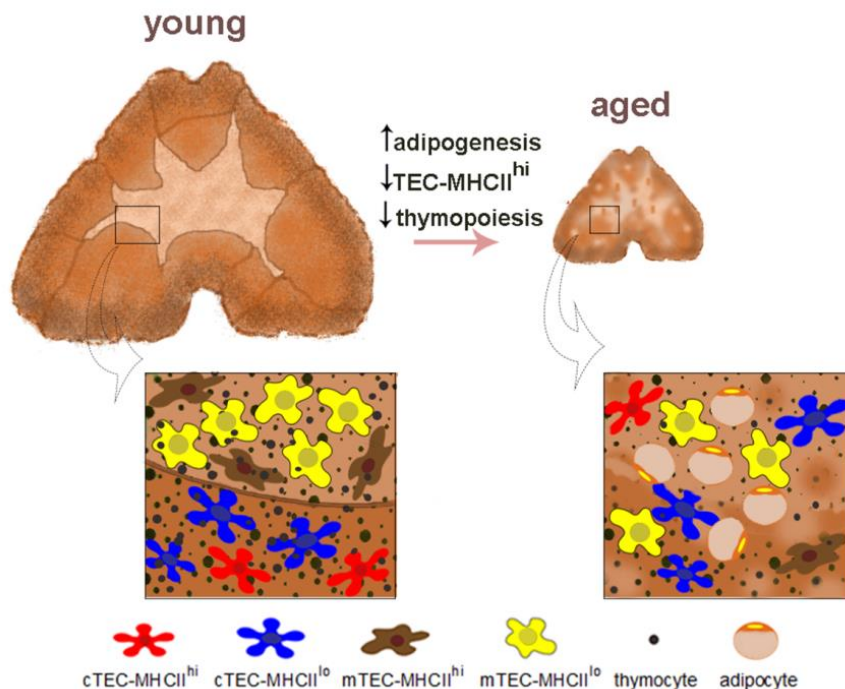
Camundongos envelhecidos têm menor número de ETPs, que apresentam redução na proliferação e potencial de diferenciação. Enquanto ETPs obtidas a partir de camundongos jovens são capazes de se diferenciar em todas as fases de desenvolvimento de células T quando semeadas em cultura de timo fetal (FTOC) (76), ETPs obtidas de animais envelhecidos apresentam reduzida capacidade de diferenciação em células T, associada a um aumento da apoptose e uma expressão reduzida de Ki67<sup>+</sup>(41). Embora estas alterações induzidas pela idade em ETP pareçam resultar, em parte, de mecanismos intrínsecos, como o aumento da expressão do gene supressor de tumor, Ink4a (31), um declínio na sinalização de Notch causado pelo comprometimento de TEC também é especulado. De fato, já está demonstrado que a expressão de DLL1 e DLL4 é reduzida no timo envelhecido(77).

Também tem sido especulado que a redução na população de ETPs observada no timo de camundongos em idade avançada está associada com uma deficiência de recrutamento periódico de HPCs derivadas da medula óssea, mediado principalmente pela quimiocina CCL25, produzida por TEC, e pela expressão de P-selectina em veias especializadas no timo. No entanto, Gui e cols. (78) demonstraram que o recrutamento de LPCs circulantes para o timo não é

afetado com o envelhecimento, bem como a expressão de P-selectina e CCL25. Além disso, LPCs obtidas de camundongos envelhecidos podem colonizar o timo jovem em um sistema de transplante de cápsula renal (78).

Muitos estudos têm apontado alterações relacionadas com a idade em fases posteriores do desenvolvimento de DN, com a observação de uma diminuição na proporção de células DN2 e DN3(41). A flutuação de DN parece ter um impacto direto na fase seguinte da timopoiese, durante a geração de timócitos DP. O declínio da comunicação entre estroma e timócitos em desenvolvimento durante o envelhecimento também resulta em perda do reconhecimento de antígenos próprios e não próprios, devido a uma falha do processo de seleção, diminuição ou uma incapacidade inerente de rearranjo de TCR(79).

Embora tenha sido relatado que a exportação de ambas as populações de células SP CD4 e CD8 esteja alterada durante a senescência, observações em humanos e modelos experimentais murinos demonstram um declínio mais dramático na subpopulação células T CD8 (80), sugerindo que as alterações induzidas pelo envelhecimento no microambiente tímico diferencialmente regulem o desenvolvimento de células T convencionais.



**Figure 1.3 Mecanismos subjacentes à atrofia do timo durante o envelhecimento.** A comunicação entre TEC e timócitos é essencial para a homeostase do timo. Durante o envelhecimento, esta comunicação é interrompida

eo resultado é a depleção celular em ambos os compartimentos linfóide (diminuição do número de todas as subpopulações de timócitos) e epitelial. Devido a uma depleção em células TEC<sup>hi</sup>, a razão entre TEC<sup>hi</sup> / TEC<sup>lo</sup> diminui gradualmente com a idade. A deficiência de subconjuntos TEC parece ser, pelo menos parcialmente ligada à sua conversão para adipócitos, um fenômeno que parece ocorrer principalmente na medula do timo(81).

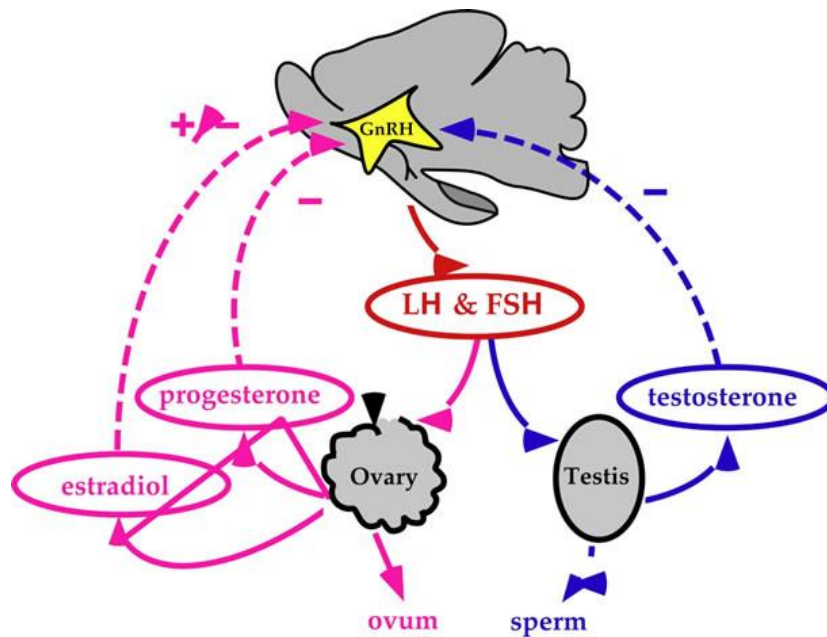
### **1.2.2 Hormônios sexuais e timo**

.A senescência imune parece ser um processo multifactorial, com evidências implicando aumento de hormônios sexuais esteroidais e diminuição da produção de fatores de crescimento, tais como o hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), IL-7 e fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (82). Os efeitos imunossupressores dos esteróides sexuais são de amplo alcance e profundos, geralmente sendo aceitos como os principais contribuintes à involução do timo. Apenas algumas horas após a sua administração, testosterona causa pronunciada atrofia do timo de um modo semelhante ao envelhecimento em camundongos(83). Além disso, os efeitos sistêmicos dos esteróides sexuais podem ser indiretos, influenciando a produção de algumas das citocinas e hormônios de crescimento acima mencionados. Por exemplo, a depleção de hormônios sexuais resulta em produção de fatores de crescimento como o KGF (84). A produção de esteróides sexuais é iniciada através do hipotálamo, que libera LHRH através de neurônios secretores aferentes à adeno hipófise. Especificamente, LHRH se liga a receptores específicos LHRH-R expressos em células especializadas denominadas gonadotrofos (85). Uma vez estimulados, os gonadotrofos produzem hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). LH estimula a ovulação em fêmeas e a produção de testosterona em machos, enquanto FSH estimula os folículos imaturos a crescerem e maturarem em fêmeas ao mesmo tempo em que aumenta a produção de proteínas ligadoras de andrógenos por células de Sertoli em machos. Estes, por sua vez, regulam a produção de testosterona, progesterona e estrogênio. Cada um desses esteróides tem um impacto negativo sobre o timo e a medula óssea (85) e a sua produção está controlado por um ciclo de retroalimentação negativa. De acordo, LHRH tem sido um alvo principal de intervenções clínicas, através da administração segura e eficaz de agonistas e antagonistas de LHRH(86). De acordo, a castração química ou cirúrgica

induz profunda regeneração do timo que por vez é revertida com a adição de hormônios sexuais (87, 88). Além disso, o timo encontra-se até três vezes aumentado em camundongos geneticamente resistentes a andrógenos quando comparados aos respectivos controles não resistentes (83)

Em face do exposto, LHRH pode ter um papel positivo nas fases iniciais do desenvolvimento linfóide, assim como na manutenção da função imune(89, 90). Embora considerado clinicamente seguro, tratamentos envolvendo análogos de LHRH apresentam efeitos colaterais como a indução de menopausa e a osteoporose óssea através da perda de estrógeno (91).

Embora andrógenos geralmente possuam ação imunossupressora, há evidência do papel essencial durante o desenvolvimento do timo nas fases iniciais, uma vez que a presença de androgénos em camundongos fêmeas neonatais resulta em aumento do tamanho do timo e correspondente aumento na proliferação de timócitos(92). Receptores de andrógenos são expressos ao longo do timo em ambos os compartimentos linfóides e estromais, sendo os timócitos CD8<sup>+</sup> e DN as células a expressarem níveis mais elevados(93). No entanto, apesar desta robusta expressão em timócitos em desenvolvimento e da indução direta de apoptose em células T por esteróides sexuais, estudos em quimera demonstram que os efeitos negativos da testosterona são mediados primariamente pela expressão de receptores de andrógeno no estroma (94, 95). Dada essa dicotomia no papel de hormônios sexuais em promover o desenvolvimento inicial do sistema imune, ao mesmo tempo em que age como moléculas supressoras associadas à involução do timo senil, é provável que uma mudança definitiva do seu papel na regulação imune ocorre na época da puberdade.



**Figura 1.4 Representação do eixo hipotálamo – hipófise – gonadal.** Neurônios hipotalâmicos secretores de GnRH estimulam a síntese / liberação de LH e FSH pela adeno hipófise que uma vez distribuídos sistemicamente pela corrente sanguínea estimulam a ovulação e espermatogênese bem como a secreção de estradiol e progesterona pelos ovários e testosterona pelos testículos. Os hormônios gonadais por vez agem tanto na hipófise quanto no hipotálamo através de um mecanismo de retroalimentação negativa inibindo a secreção de GnRH, FSH e LH (<http://pblcr.salk.edu/research.php>).

### **1.2.3 Regeneração da atrofia tímica senil através de castração**

A eficácia da castração cirúrgica para o rejuvenescimento tímico tem sido amplamente relatada (87, 96). Os números e a função de células T não são somente aumentadas em camundongos envelhecidos que apresentam atrofia significativa relacionada com a idade, mas também em camundongos jovens pré-púberes. Nestes camundongos, a castração restaurou a timopoiese, levando a uma regeneração significativa do número de células T “naïve” periféricas no prazo de 10 dias(41). Além disso, a castração também reforça a expansão das células do estroma tímico, havendo aumento significativo de TECs após 10 dias de castração em camundongos envelhecidos, gerando um contingente epitelial de recolonização tanto no córtex quanto na medula (40). A castração não só aumenta o número de

TECs, como também restaura as proporções normais de mTEC / cTEC e a integridade estrutural do timo observada em camundongos jovens(40).

Os efeitos combinados das alterações no timo e medula óssea após-castração acarretam em melhora da função imune, tais como resposta de células T para CD3 / CD28, herpes simplex virus e tumores transplantáveis (87). Como tal, os gatilhos e mecanismos específicos através dos quais a castração media a regeneração do timo permanecem incertos. Enquanto a maioria dos estudos de depleção de esteróides sexuais tem sido realizados em animais do sexo masculino, dados obtidos a partir da remoção cirúrgica dos ovários demonstram hipertrofia do timo mediada por estrógenos (97, 98). Curiosamente, a expansão de células T periféricas, após a ovariectomia não pode ser atribuída a um aumento da timopoiese, como no caso da castração masculina, mas primariamente à expansão periférica de células pré-existentes, consequentemente havendo predominância de um fenótipo dominante de célula T de memória(99). No entanto, ao contrário da castração que depleta completamente testosterona em poucas horas, após a ovariectomia, o estrogênio ainda permanece na circulação, devido à conversão da testosterona pela glândula adrenal, embora em níveis baixos (100), além da produção ectópica de estrogênio por tecido adiposo(101).

### **1.3 Activina e imunorregulação**

#### ***1.3.1 Mecanismos de ação de activina***

As activinas são membros da superfamília de fator de crescimentotransformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e são compostas por dímeros de subunidades  $\beta$  ligadas por pontes de sulfato ( $\beta$ A e  $\beta$ B) que também podem dimerizar com uma subunidade  $\alpha$  para formar a inibina A ( $\alpha\beta$ A) e inibina B ( $\alpha\beta$ B). Em consequência, três formas de activina têm sido descritos, activina A ( $\beta$ A $\beta$ A), activina B ( $\beta$ B $\beta$ B) e activina AB ( $\beta$ A $\beta$ B). A maioria da informação existente sobre o papel de activinas na modulação do sistema imune foca na participação de activina A nesse processo, embora ajam dados emergentes para um papel semelhante de activina B (102-104). Dada a multiplicidade das ações de activinas, as quais atuam como fatores de crescimento e hormônios, existe uma complexa biologia relacionada com o seu controle e função. A ação hormonal refere-se à capacidade de activina em estimular

a secreção de FSH pela hipófise, uma ação que também envolve mecanismos parácrinos (105).

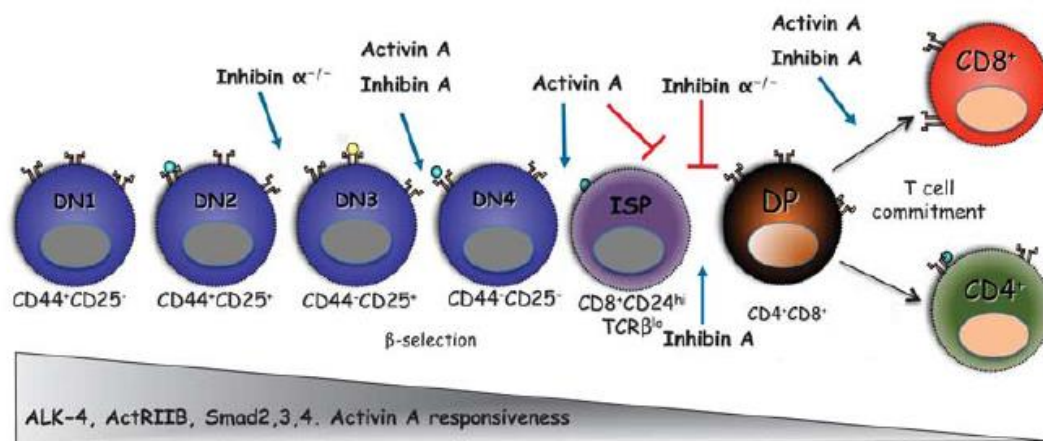
A complexidade dos sistemas de controle que modulam a ação de activina foi descrita em profundidade em revisões recentes (106). Folistatina (FST), uma poderosa proteína de ligação de activina, é a principal molécula endógena que controla as ações biológicas de activina. Esse nome refere-se à capacidade dessa proteína de suprimir a secreção de FSH por células da hipófise, bloqueando os efeitos parácrinos de activina. FST liga activinas com elevada afinidade [Kd 50-900pM], e inibe todas as ações de activina (107). Duas formas de FST são produzidos por um mecanismo de “*splicing*” alternativo de mRNA. A forma mais curta, FS288 se liga intrinsecamente a proteoglicanas que contem sulfato de heparano e é normalmente associada à superfície celular, embora possam ser libertadas para a circulação pela heparina(107). Em contraste, FS315 é a forma principal de circulação e só se liga a sulfato de heparano após ligar activina devido a uma alteração conformacional nessa isoforma que expõe o local de ligação de sulfato de heparano (108). FST também se liga a vários fatores de crescimento estruturalmente relacionados com afinidade 10 vezes menor do que às activinas, modulando as suas ações, como a activina.

### **1.3.2 Efeito de activina na proliferação e diferenciação de células T**

TGF- $\beta$ 1 parece regular negativamente a transição DN1-DN2, além de promover a diferenciação de timócitos maduros CD8, enquanto BMPs inibem a diferenciação de timócitos, regulando as transições DN1-DN2 e DN3-DN4, e, por conseguinte, desempenham um papel no controle da  $\beta$ seleção (109, 110). Ainda no início da década de 80 o grupo liderado por Lopukhin e cols. demonstrou efeito protetor de activina na involução tímica senil. O tratamento de camundongos com activina durante 20 dias gerou supressão da involução do timo juntamente ao aumento da proliferação de timócitos, observado seis meses após o final do tratamento(111). No início da década de 90 um novo estudo demonstrou efeito protetor de activina na involução tímica recorrente de trauma, sugerindo que essa molécula poderia atuar no timo como uma molécula anti-estresse(112). A partir desse ponto a investigação sobre os mecanismos de regulação de activina sobre o timo estagnou e somente foram retomados quase 15 anos depois com a demonstração de que activina induz a fosforilação de Smad-2 (R-Smad) em



timócitos (113), sugerindo um papel da sinalização de activina na diferenciação de células T. Posteriormente foi demonstrado que tanto activina como os seus receptores são expressos no timo murino (114). Especificamente as subunidades de ligantes  $\beta$ A,  $\beta$ B e  $\alpha$ são expressas principalmente em células do estroma. Apesar do antagonismo funcional relatado em células reprodutivas, Licona-Limon e cols demonstraram que activinas e inibinas regulam a diferenciação de células T (115), promovendo a transição DN3-DN4, sugerindo seu papel positivo durante a seleção  $\beta$ . Entretanto, esses fatores parecem diferencialmente regular a transição DN4-DP. A adição de activina A em sistema de cultura FTOC induz acumulo de células ISP e baixa geração de DP, ao passo que inibina promove a diferenciação de DN4 para DP. Ambos os ligantes promovema diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> em cultura, sugerindo que activina A possa regular o comprometimento com a linhagem T CD8.



**Figura 1.5 Inibinas e activinas regulam a diferenciação de células T.** Acvr1a (ALK-4), Acvr2b e Smad 2, 3 e 4 são expressos no timo fetal e adulto, preferencialmente nas fases iniciais do desenvolvimento. Inibinas e activinas regulam a transição de DN para DP, bem como DP para SP CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em FTOC.

#### 1.4 Justificativa

Embora a expectativa de vida tenha aumentado muito nos últimos anos com o desenvolvimento da medicina e reformas sanitárias, gastos com a saúde do idoso ainda sobrecarregam o sistema de saúde público. Especificamente, muitas patologias desenvolvidas por idosos é decorrente da redução do repertório de células T naivas resultante da involução e perda da função tímica . Estudos recentes

identificaram os hormônios sexuais como grandes vilões do sistema imune e nesse sentido a administração de LHRH tem sido atualmente utilizada como estratégia clínica de inibição da secreção de hormônios sexuais e restabelecimento do repertório de células T em situações de imunossupressão. Embora considerado clinicamente seguro, tratamentos envolvendo análogos de LHRH apresentam efeitos colaterais como a indução de menopausa e a osteoporose óssea através da perda de estrógeno. A identificação de activina A como uma importante molécula intermediadora desse processo, permite o desenvolvimento de uma nova geração de medicamentos voltados não só para a saúde do idoso, como diversas patologias decorrentes da perda da função tímica, muito mais específicos e com redução de efeitos colaterais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na recuperação do timo senil após a depleção de hormônios sexuais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1 *Analisar os efeitos do envelhecimento sobre o microambiente tímico;***

**2.2.2. Caracterizar uma possível população de células progenitoras de epitélio tímico no timo adulto**

**2.2.3 Identificar moléculas intermediadoras do restabelecimento do timo senil após castração**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e drogas utilizadas

Camundongos machos da linhagem C57/BL6, com 7 semanas (young) ou 9 meses (aged) de idade foram utilizados nos protocolos voltados para análise do efeito do envelhecimento sobre o timo. Para verificarmos os efeitos da inibição congênita de activina  $\beta$ A sobre o desenvolvimento de TEC e timócitos, camundongos machos de 7 semanas com deleção parcial (HET) ou nula de activina (WT) foram analisados. Embriões em 14.5 dias de desenvolvimento (E14.5) WT, HET ou KO para activina  $\beta$ A foram obtidos a partir do cruzamento entre camundongos activina  $\beta$ A HET e utilizados tanto para caracterização fenotípica e cultura de timo fetal embrionário (FTOC). Camundongos atímicos da linhagem “*nude*” foram utilizados como recipientes dos transplantes de FTOC na capsula renal. Tanto para nos experimentos de injeção de folistatina 288 *in vivo* (FST288 i.p., 1 $\mu$ g/animal a cada 48 horas, total de 7 dias) quanto nos experimentos *in vitro* de cultura 3D, com a adição de beta activina (1 ng/mL) ou o peptideo neutralizador anti-beta activina (7.5  $\mu$ g/mL), as drogas utilizadas foram obtidas da empresa R&D systems. A adição de 2-deoxiguanosina (dGuo) em sistema de cultivo FTOC foi realizada para uma eliminação seletiva de timócitos e células dendríticas (1.35 $\mu$ m, Sigma-Aldrich). Para os procedimentos cirurgias os camundongos foram anestesiados com solução de ketamina + xilazina (90 mg/kg ketamina + 4.5 mg/kg xilazina) *i.p.* e a seguir tratados com caprofen (10mg/kg) para alívio da dor. Todos os procedimentos de manipulação *in vivo* de camundongos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da Universidade Monash (SOBSA/MIS/2010/91).

#### 3.2 Técnicas utilizadas *in vivo*

##### 3.2.1 Depleção cirúrgica de hormônios sexuais

Os camundongos foram anestesiados e uma pequena incisão realizada no escroto, os testículos foram expostos e ligados antes de serem removidos. A ferida foi fechada com suturas absorvíveis. Para o controle de estresse cirúrgico, a cirurgia ShCx foi realizada como relatado acima, mas sem a remoção dos testículos. Os

animais foram monitorados a seguir durante três dias para o acompanhamento da cicatrização dentro dos quais a dieta foi suplementada com sementes de girassol.

### **3.2.2 Transplante de cultura FTOC tratada com dGuo na cápsula renal**

Culturas de timo embrionário foram estabelecidas a partir de lobos tímicos obtidos de embriões de camundongos E14.5. Uma vez isolados, os lobos foram mantidos em cultura *ex vivo* sobre filtros de 0.8µm e com adição de dGuo 1.35µM durante 7 dias, conforme protocolo estabelecido por Graham Anderson & Eric J. Jenkinson, 2001. A seguir, os timos fetais de constituição meramente estromal foram transplantados na capsula renal de camundongos atímicos “*nude*” e após 6 semanas o enxerto, baço e sangue foram analisados pra a presença de células T por citometria de fluxo. Também realizamos a análise histológica do transplante tímico conforme o protocolo abaixo.

### **3.3. Histologia**

Cortes histológicos de 5 milímetros foram obtidos no criostato a partir de timos congelados em OCT e em seguida fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos e a 4°C. Para marcação de UEA-1 os cortes foram previamente permeabilizados através da incubação por 30 minutos em PBS/Tween 1%. Ambos os sistemas de detecção foram obtidos através de aglutininas diretamente conjugada UEA1-FITC, com incubações de 1 hora à temperatura ambiente (TA). As imagens foram adquiridas através de microscopia confocal (Nikon C1 confocal) com objetiva de 40x e quantificadas utilizando-se o programa ImageJ.

### **3.4 Anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo ou isolamento celular**

Os anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo ou isolamento celular foram comprados da BD Biosciences ao menos nos casos reportados de outra forma. Os conjugados utilizados incluem anti-CD326/EpCAM (clone G8.8, Biolegend), anti-CD31/PECAM-1 (clone MEC13.3), anti-CD45 (clone 30-F11) lectina UEA-1 (Vector Laboratories), anti-Ly51/6C3/BP-1 (clones 6C3 e BP-1); anti-MHCII IA/IE (clone M5/114.15.2), anti-Aire (5H12-2), anti-Ki67 (B56), anti-alfa6 integrin (CD49f) e anti-Sca-1 (Ly6 A/E). Células não viáveis, marcadas positivamente para iodeto de propídeo (PI+) foram excluídas da análise. As amostras foram adquiridas

no citômetro de fluxo BD FACSCantoll (Becton Dickson, San Diego, USA) equipado com o programa Diva. Para posterior análise, foi utilizado o software FlowLogic (Inivai Technologies).

### **3.5 Digestão do tecido tímico para análise fenotípica e isolamento de células estromais**

#### **3.5.1 Digestão de timos individuais para análise fenotípica de células estromais tímicas**

A digestão individual de timos foi realizada como previamente descrito (Gray 2008). Os lóbulos tímicos foram recolhidos individualmente de cada camundongo e limpos de tecido conjuntivo e gordura, antes de serem cortados com tesoura e colocados em tubos de 10 ml separados para digestão de cada timo. A seguir, os lóbulos foram lavados uma vez com 2 mL de meio RPMI-1640 fresco, por agitação suave durante cerca de 30 segundos utilizando uma pipeta de vidro de grande diâmetro interno para liberar os timócitos. Fragmentos do timo foram deixados para assentar e o sobrenadante foi armazenado em gelo durante combinação com as frações seguintes do timo digeridos. A seguir, foram adicionados 2 ml de RPMI-1640 contendo 0,1% de DNase (Roche) e 0,02% (w / v) de Liberase (todas as enzimas obtidas da Roche) nos fragmentos de timo e incubados a 37 ° C durante intervalos de 10-15 minutos. Após incubações, fragmentos do timo foram agitados suavemente durante cerca de 1 minuto até que o meio tornasse visivelmente turvo. A seguir os fragmentos assentaram e o sobrenadante foi recolhido em tubos contendo 0,02% (v / v) Albumina de Soro Bovino (BSA) e 5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em PBS (tampão FACS) para neutralizar a reação enzimática e mantido em gelo. Os fragmentos digeridos foram re-incubados com mistura de enzima fresca e agitados com pipetas de orifício de tamanho progressivamente menores, terminando com ponteiros de 200 µl - 1000µL, até que todos os fragmentos visíveis foram dispersos. Para digestão individual, todas as frações, incluindo a lavagem de timócitos foram reunidas para a enumeração precisa das diversas populações tímicas (Gray et al., 2008). As células foram lavadas com tampão FACS e recuperadas por centrifugação a 500gmax durante 5 minutos a 4 ° C, sendo a seguir ressuspensas em tampão de FACS gelado a e filtrada através de uma malha de

nylon de 100  $\mu$ M (Filtrar Madison, Highett, Victoria, Austrália) antes da contagem utilizando um contador Coulter Z2 (Beckman Coulter, EUA).

### **3.5.2 Digestão de timos agrupados para isolamento de células estromaistímicas**

Timos obtidos de 5-10 camundongos foram limpos e a seguir agrupados, processados como reportado acima e colocados em tubos de 10mL contendo 5-7mL de RPMI-1640. Os lobos tímicos foram a seguir agitados com uma pipeta de vidro de amplo diâmetro interno por aproximadamente 1 minuto para liberar timócitos, durante 3-4 vezes e as lavagens de timócitos descartadas. Os lobos dos timo foram reunidos e incubados com 5 mL de Liberase/ DNase mix e a seguir submetidos a um protocolo de agitação e etapas de incubação, semelhante ao estabelecido para digestão individual do timo. Após a conclusão da digestão, todas as frações foram agrupadas e filtradas através de rede de nylon 100  $\mu$ M antes de serem contadas. As células foram recuperadas por centrifugação a  $500g_{max}$  durante 5 minutos e ressuspensas em tampão de FACS gelado..

## **3.6 Isolamento de células estromais tímicas**

### **3.6.1 Isolamento magnético de células estromais CD45<sup>-</sup>**

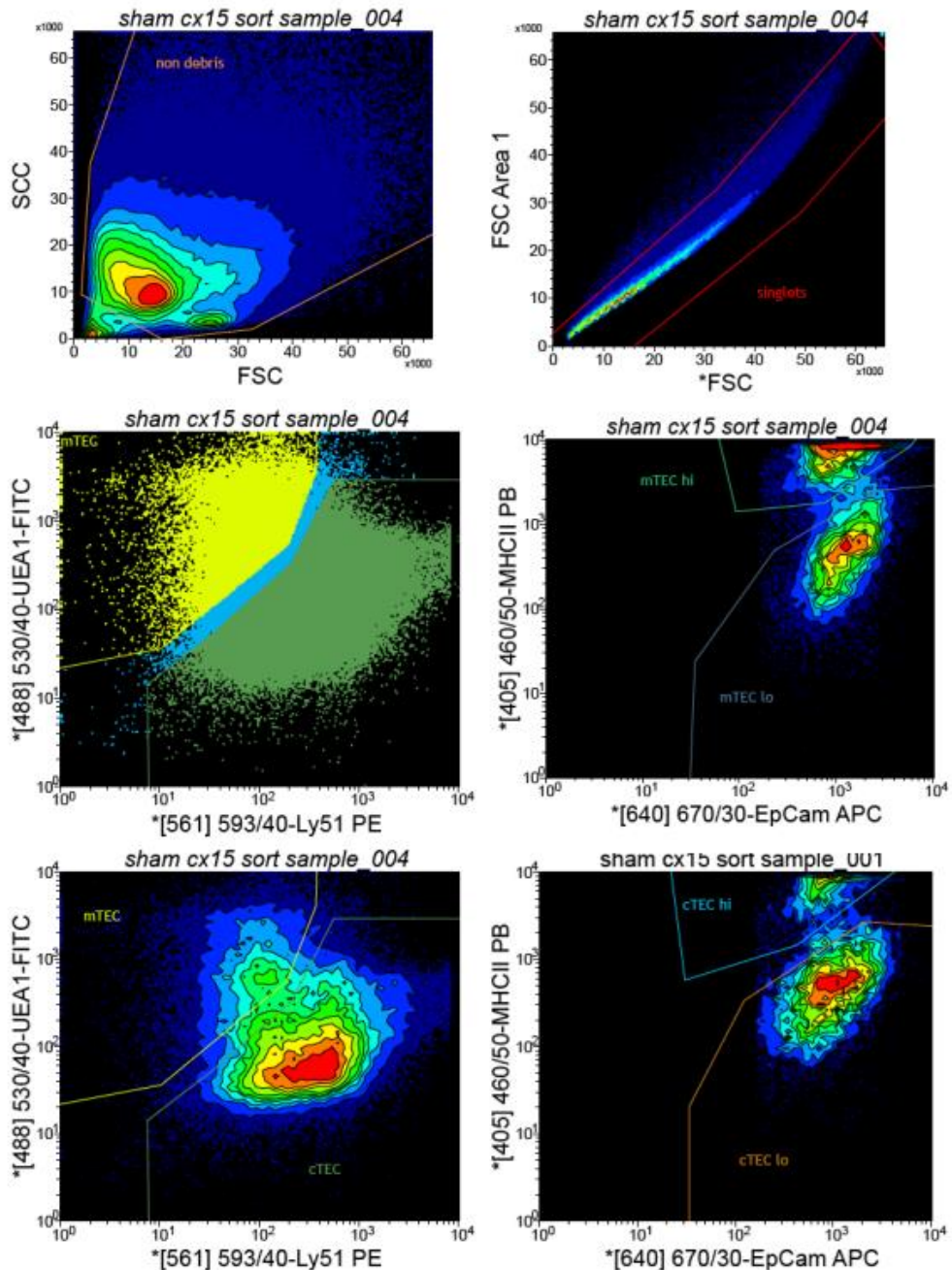
Células obtidas a partir da digestão de timos agrupados foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em 95 $\mu$ L de tampão de FACS por  $1 \times 10^7$  células. 5 $\mu$ L de microesferas anti-CD45 (Miltenyi Biotec, Alemanha) foram adicionados por  $1 \times 10^7$  células e incubadas durante 20 minutos a 4 ° C. Após a incubação, as amostras foram lavadas com tampão FACS e centrifugadas a  $300g_{max}$  durante 10 minutos para remover quaisquer microesferas não ligadas. O sedimento de células foi ressuspenso em tampão de FACS para uma concentração celular final de  $0,5 \times 10^8$  células / mL. As amostras foram passadas em uma máquina AutoMACS® (Miltenyi Biotec, Alemanha) utilizando o programa "Deplete\_S" com um máximo de  $2 \times 10^8$  células por amostra (4 mL). Após a separação, a fração positiva foi descartada e as frações negativas reunidas (se dividir em pequenas quantidades para ser executado através do AutoMACS) e recuperadas por centrifugação. O sedimento celular foi ressuspenso em cerca de 1 mL de tampão de lise pré-aquecido de glóbulos vermelhos (8,3 g Cloreto de / L de amônio em 500 mL de 0,01 M de Tris-HCL, pH

final =  $7,5 \pm 0,2$ ) e incubadas durante 1-2 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . As células foram lavadas uma vez com tampão FACS, recuperada por centrifugação, contadas e depois novamente suspensas em solução de anticorpo apropriado para separação celular ( $10\mu\text{L}$  por  $1 \times 10^6$  células).

### **3.6.2 Isolamento celular por citometria de fluxo**

Células CD45-enriquecidas foram ressuspensas em tampão de FACS a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células / mL e separadas utilizando um separador de células BD Influx™ (BD Biosciences). As células foram separadas a 20 p.s.i. através de um bocal de  $100\mu\text{M}$  em não mais do que 3000 células / segundo. As células selecionadas foram recolhidos em 30% (v / v) de soro fetal bovino (FCS) em RPMI-1640 e recuperadas por centrifugação a  $500g_{\text{max}}$  durante 5 minutos. A contagem celular foi realizada para verificar o número de células do estroma de timo recuperadas através de centrifugação a  $500g_{\text{max}}$  durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Para quantificação genica, o sobrenadante foi removido e o sedimento de células ressuspensas em tampão de lise a partir do kit de isolamento de RNA apropriado e agitados cuidadosamente para quebrar-se as células antes do congelamento em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até que o isolamento de RNA foi realizado. Os perfis celulares utilizadas para o isolamento seletivo de cTECs e mTECs com alta e baixa expressão de MHC classe II, representadas como cTEChi, cTEClo, mTEChi e mTEClo, estão demonstrados abaixo.





**Figura 3.1** Perfil fenotípico de TEC isoladas por citometria de fluxo. cTEC<sup>hi</sup> (EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>-</sup> Ly-51<sup>+</sup> MHC II<sup>hi</sup>), cTEC<sup>lo</sup> (EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>-</sup> Ly-51<sup>+</sup> MHC II<sup>lo</sup>), mTEC<sup>hi</sup> (EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>+</sup> Ly-51<sup>-</sup> MHC II<sup>hi</sup>) e mTEC<sup>lo</sup> (EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>+</sup> Ly-51<sup>-</sup> MHC II<sup>lo</sup>).

### 3.7 Análise fenotípica de células T e células estromais tímicas

Para a análise fenotípica,  $5 \times 10^6$  células foram dispostas em placas de fundo U contendo 96 poços e em seguida, centrifugada a  $300g_{max}$  durante 3 minutos a  $4^\circ C$ . O sedimento celular foi incubado com  $50\mu L$  anticorpo primário durante 15 minutos a  $4^\circ C$ . Seguindo a incubação as células foram lavadas com  $200\mu L$  de tampão de

FACS, sedimentadas e incubadas com os anticorpos secundários apropriados ou conjugados a estreptavidina. Após o passo final de lavagem / recuperação, as células foram novamente suspensas em 500µl /  $5 \times 10^6$  células em tampão de FACS e adquiridas no citometro BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), utilizando até oito canais fluorescentes. Em casos onde a marcação intracelular foi realizada, após a marcação de superfície, as células foram lavadas duas vezes em PBS 200µl. 150µl da solução de fixação / permeabilização da BD foi adicionado a cada poço, misturados e cuidadosamente incubado durante 30 minutos a 4 °C. Seguindo a incubação, as células foram lavadas em solução de lavagem Fix / Perm. As células foram incubadas com 50µl de anticorpo primário durante 30 minutos a 4 °C e em seguida lavadas em solução de lavagem Fix / Perm. Uma vez que a marcação celular foi completada as células foram novamente ressuspensas em 500µl de tampão de FACS /  $5 \times 10^6$  células para aquisição. Os dados foram analisados utilizando software V6.1.1 FACSDiva™ (BD Biosciences, EUA) e v400.2A software FlowLogic™ (Inivai Technologies, Austrália). A compensação foi realizada por meio de marcação única.

### **3.8 Análise molecular de subpopulações de estroma tímico isoladas**

#### **3.8.1 Isolamento de RNA, síntese de cDNA e análise por qPCR**

Diferentes subpopulações de TECs isoladas por FACS, foram conservadas e ressuspensas em tampão de lise apropriado (Ambion lysis buffer) e conservadas em freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA total das diferentes subpopulações de células enriquecidas foi extraído utilizando-se o RNeasy Micro Kit (Qiagen, USA) e quantificado no Nanodrop (Thermo Scientific, USA). A partir de amostras equivalentes em 0.5µg de RNA, sintetizamos cDNA utilizando-se SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA), na presença de primer pre validado (QuantiTect Primer Assays, Qiagen) de acordo com a recomendação do fabricante.

A análise de expressão gênica por PCR em tempo real, foi realizada a partir de amostras de 100 ng de cDNA diluídas em Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), no sistema ABI PRISM 7500 FAST RealTime PCR System (Applied Biosystems, USA). O qPCR foi realizado a 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. A expressão constitutiva de

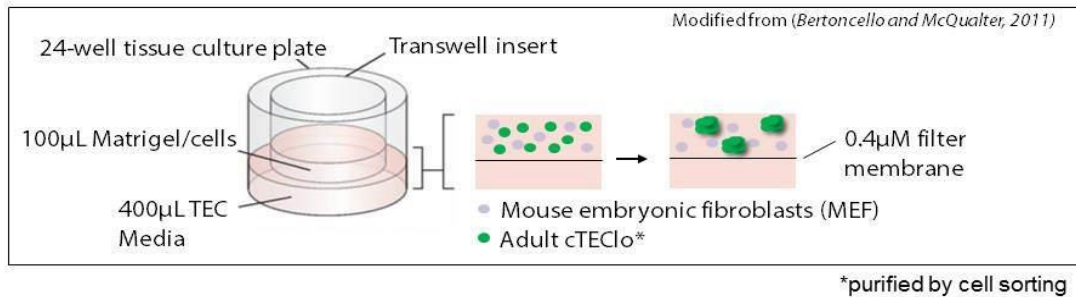
GAPDH foi utilizada para verificar a uniformidade das amostras utilizadas. A especificidade dos produtos do PCR foi analisada através da curva de dissociação. Os dados foram analisados por Rotor-Gene Q Series Software 2.0 (Qiagen). Os níveis de expressão gênica relativos foram calculados a partir do método de análise comparativa Ct ( $2^{-\Delta Ct}$ ) e normalizados com base na expressão gênica no grupo “young” ou “ShCx” pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.8.2 Análise por microarranjo gênico

O RNA isolado foi amplificado a partir de TEC (> 99%), utilizando o Kit *Ambion Total Prep Amplification* e hibridados com *arrayAffymetrix*(TEC CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>; 10 camundongos por amostra, n = 3 por diferentes pontos SSA / ShSSA e jovem / envelhecido). Tanto os microarranjos a bioinformática foram realizados no Facility Australian Genome Research (AGRF). A qualidade do RNA foi verificada através de dados estabelecidos com o Agilent Bioanalyzer 2100. Os dados brutos foram importados para Partek v 6.5 e submetidas a análise estatística por ANOVA one-way

### 3.9 Cultura celular em sistema 3D

Células cTEC foram purificadas por FACS e combinadas com fibroblastos irradiados obtidos a partir de embriões de camundongos (MEF) em uma razão celular final de 1:10. As células foram ressuscendidas em 50% de matrigel (BD Biosciences) em insertos 0,4µm (Millipore) dispostos em placas de 24 poços (ver esquema abaixo) e incubados durante 10 minutos a 37°C previamente à adição de meio de cultura para TEC (RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino, 55 µM 2-mercaptoetanol, 10mM HEPES, 1x 10<sup>3</sup> U/mL de penicilina, 1x10<sup>4</sup> µg streptomina, 2 mM GlutaMAX, 1mM piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 5 µg/mL insulina, 2,75 µg/mL transferrina, 3,35 ng/mL selenio, 2x10<sup>-9</sup> M 3,3',5-triiodo-L-tiorina, 0,4 µg/mL hidrocortisona, 24µg/mL adenina, 1x10<sup>-9</sup> M colero toxina, 0,0002% [v/v] heparina e 20 ng/mL de fator de crescimento de queratinócito [R&D systems]), acrescido ou não de beta activina e anti-beta activina. As culturas foram incubadas em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>). Para a digestão das colônias, os insertos de transwell foram lavados em PBS e digeridos em RPMI-1640 contendo 1U/ml Liberase TM suplementada com 0.02% (w/v) DNase I e filtrados através de uma rede de 100 µM de nylon.



**Figura 3.2 Método para cultura *in vitro* de TEC em sistema 3D.** Células cTEC<sup>lo</sup> purificadas a partir de citometria de fluxo são plaqueadas em insertos de 0,4µm contendo MEF na razão de 1:10 + matrigel e em seguida dispostas em placas de 24 poços contendo meio de cultura suplementado. Após 7 dias, a diferenciação em mTEC é verificada através da digestão do matrigel com liberase + DNase seguida de caracterização fenotípica.

### 3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de teste não paramétrico, não pareado de Mann-Whitney U usando Prism (Graphpad Software, San Diego). Para a análise comparativa da expressão gênica relativa em animais Cx foi utilizado o teste t de Student. Em todos os casos, o valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

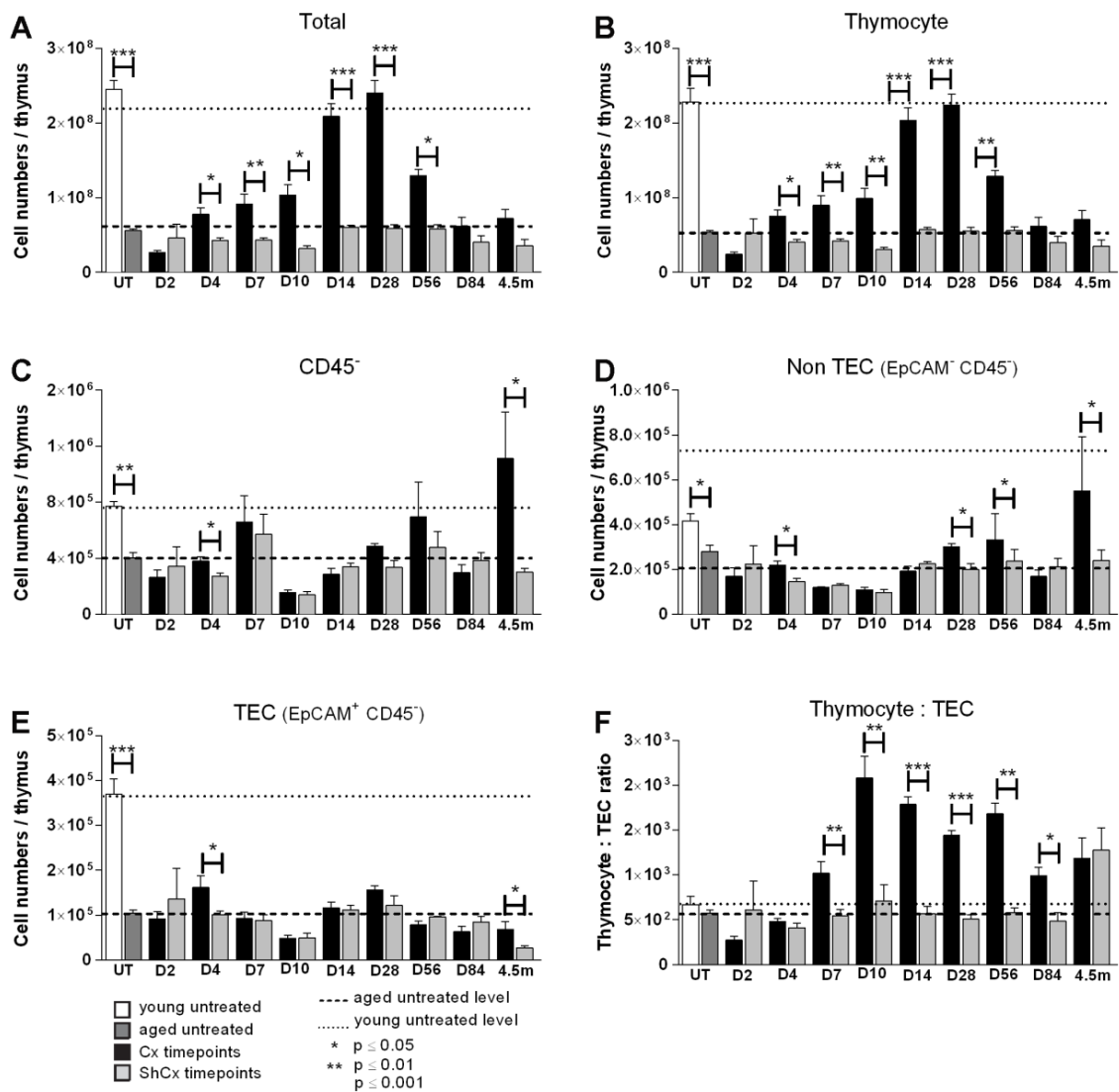
## 4 RESULTADOS

### ***4.1. A atrofia tímica senil é caracterizada por acentuada redução no número de mTEC e timócitos e simultâneo acúmulo de cTEC lo***

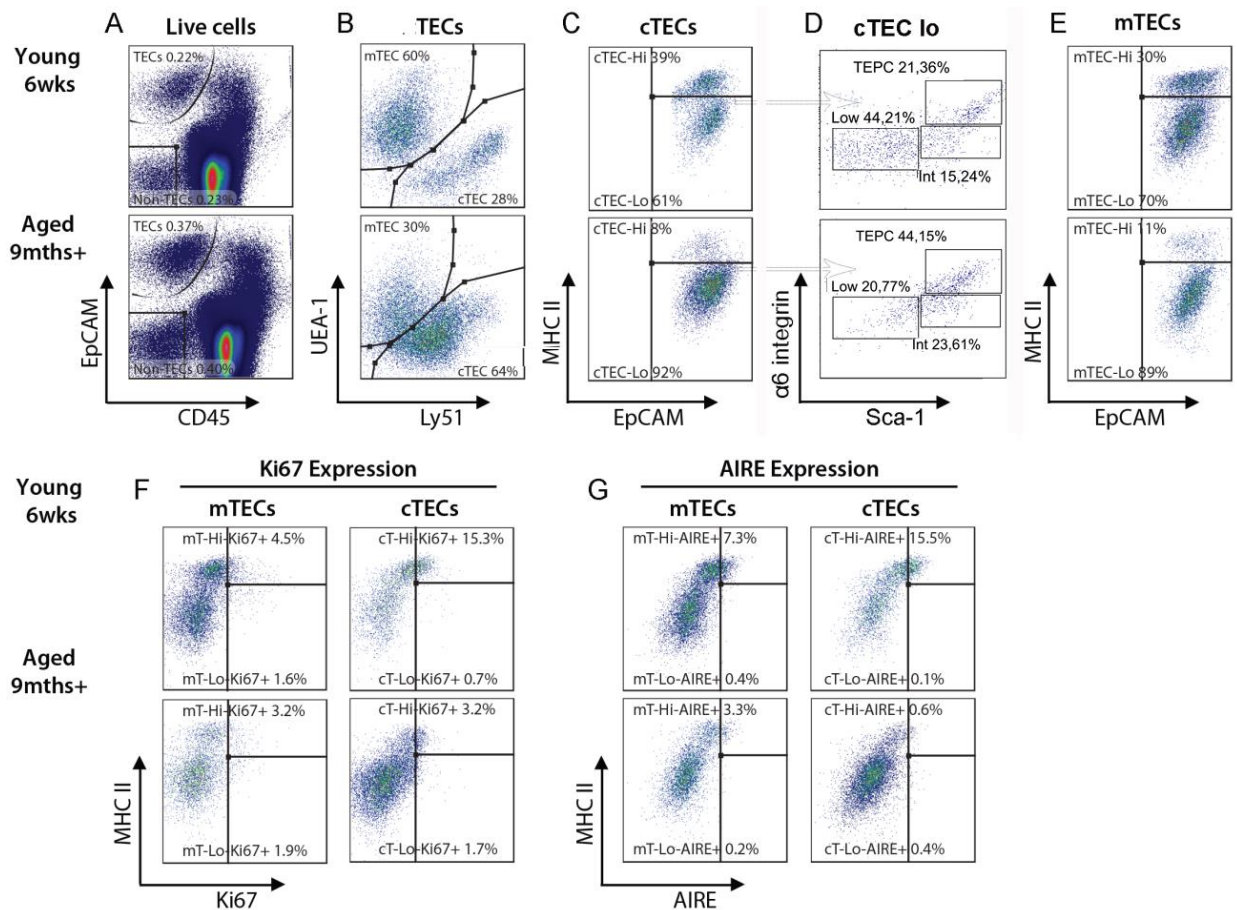
Camundongos envelhecidos (9 meses) apresentam uma redução do total de células do timo em aproximadamente 3 vezes, quando comparados aos seus correspondentes jovens (5-7 semanas) (Fig. 1A). Tal variação reflete a redução do número de timócitos, que corresponde a aproximadamente 99% das células totais no timo (Fig. 4.1B e 4.2A). Entretanto células estromais CD45<sup>-</sup> TEC e não TEC também encontram-se reduzidas nos timos desses animais (Fig. 4.1C-E), fazendo com que a proporção entre timócitos e TEC se mantenha constante nos 2 grupos (Fig. 4.1F). A análise fenotípica demonstra uma redução acentuada dos valores absolutos e relativos de mTEC em animais senis (Fig. 4.2B; 4.3G e H) levando a uma aumento proporcional de cTEC (Fig. 4.2B e 4.3A), embora os números totais dessas células permaneçam inalterados (Fig. 4.3G). Especificamente, o envelhecimento está associado ao aumento da subpopulação de cTEC expressando baixos níveis de MHCII (cTEC lo) tanto em termos percentuais (Fig. 4.2C; 4.3E) quanto absolutos (Fig. 4.3F), e simultânea redução da população de células corticais expressando altos níveis de MHCII (cTEC hi) (Fig. 4.2C; 4.3C). A proporção de células progenitoras epiteliais tímicas (TEPC) também encontra-se aumentada dentro da subpopulação de cTEC lo, enquanto células com potencial intermediário de TEPC encontram-se reduzidas (Fig. 4.2D). As células TEPC também encontram-se aumentadas quando analisadas dentro da subpopulação de TEC totais (Tabela 1). Os valores totais de mTEC hi e mTEC lo encontram-se reduzidos em aproximadamente 10 vezes (Fig. 4.3J e M) no timo senil, sem haver alteração na proporção entre as duas populações (Fig. 4.2E; Fig. 4.3L). Tais flutuações no compartimento epitelial durante o envelhecimento refletem o perfil de proliferação dessas células como observado através da marcação de ki67. Tanto a proporção quanto o total de cTEC lo ki67<sup>+</sup> estão aumentados no timo senil (Fig. 4.4C e D) enquanto de cTEC hi ki67<sup>+</sup> estão reduzidos (Fig. 4.2E; 4.4C e D). Similarmente, ambos os valores absolutos e relativos de mTEC hi ki67<sup>+</sup> e mTEC lo ki67<sup>+</sup> encontram-se reduzidos (Fig. 4.2E; 4.4E-H). O total de mTEC hi AIRE<sup>+</sup> e mTEC lo AIRE<sup>+</sup> também encontra-se reduzido no timo de animais senis (Fig. 4.5B e D), embora a proporção dessas células permaneça inalterada (Fig. 4.5A e C).

## **4.2 A expansão do compartimento linfóide após castração está associada ao aumento de mTEC e expressão de MHCII em cTEC e mTEC**

A depleção de hormônios sexuais através da técnica de castração induz uma onda de expansão do compartimento linfóide e estromal (tanto TEC quanto não TEC) tímico a partir do dia 4 pós castração (D4) (Fig. 4.4A-E). O gradual aumento no número de timócitos apresenta pico em D28 (Fig. 4.4B), e é desproporcional ao observado em TEC, gera um aumento da razão entre timócitos e TEC (Fig. 4.4F). As células cTEC apresentam aumento do MHCII a partir de D7, seguido da redução de cTEC lo, tanto em termos absolutos quanto relativos (Fig. 4.3C-F). Uma vez que a população de cTEC lo apresenta a maior fração do compartimento epitelial cortical de animais envelhecidos (~90%), essa redução reflete na perda dos números totais de cTEC entre D14 e D84 (Fig. 4.3B). Particularmente, a proporção de células TEPC apresenta um progressivo declínio entre D14 e D84. Entretanto, em uma fase tardia pós castração, entre 4 e 5 meses, a redução dos números de cTEC total e cTEC lo não é mais observada (Fig. 4.3B e 3F), embora a expansão de cTEC hi ainda ocorra nesse ponto (Fig. 4.3D). A depleção de hormônios sexuais durante o envelhecimento gera inversão das proporções de cTEC e mTEC (Fig. 4.3A e G) e aumento dos totais de mTEC que é observado até a fase mais tardia analisada de 4-5 meses pós castração. Particularmente, um sustentável aumento de mTEC hi ocorre entre D10 e D56 enquanto é observada a expansão de mTEC lo de uma forma periódica, em D4, D28 e 4-5 meses (Fig. 4.3J e M). De acordo, ocorre aumento progressivo da proliferação de TEC com alta expressão de MHCII, mTEC hi e cTEC hi, a partir de D4 (Fig. 4.4A, B, E e F), enquanto a população de cTEC lo ki67<sup>+</sup> apresenta redução total e parcial a partir de D10 (Fig. 4.4C e D). Curiosamente, o acúmulo de mTEC lo ki67<sup>+</sup> só ocorre a partir de D7 (Fig. 4.4G e H), embora os números totais dessa população já estejam aumentados a em D4 (Fig. 4.3M), sugerindo que as células mTEC lo possam estar se diferenciando a partir de cTEC lo. Além de induzir alteração quantitativa, a castração também gera mudanças no fenótipo de TEC, como observado através do aumento de mTEC hi AIRE<sup>+</sup> a partir de D14 e mTEC lo AIRE<sup>+</sup> em D28 (Fig. 4.5B e D).

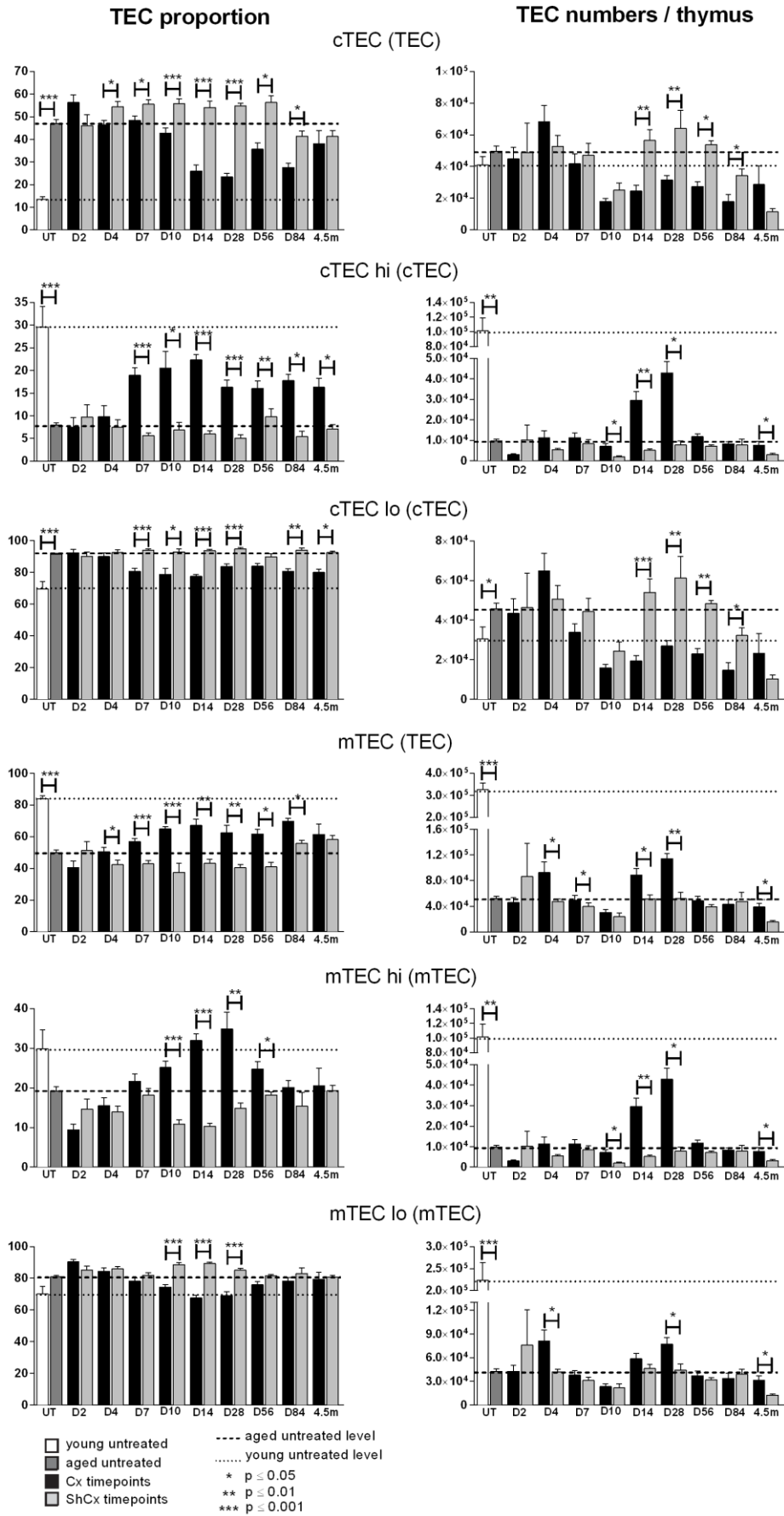


**Figura 4.1** Totais celulares obtidos a partir timos de camundongos jovens (young untreated), envelhecidos não tratados (aged untreated), envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados em diferentes dias após castração. **(A)** Número de células totais, **(B)** total de timócitos (CD45<sup>+</sup>), **(C)** total de células estromais (CD45<sup>-</sup>), **(D)** total de células estromais não epiteliais (non TEC, CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>-</sup>), **(E)** total de células epiteliais tímicas (TEC, CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>) e **(F)** razão dos valores de timócito sobre TEC.



**Figura 4.2 Perfis citofluorimétricos de TEC obtidas de animais jovens (young 6 weeks, painel superior) e envelhecidos (aged 9 months, painel inferior).**(A) Percentuais de TEC totais ( $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$ ) e non TEC ( $\text{EpCAM}^-\text{CD45}^+$ ) analisados a partir de células viáveis totais, (B) cTEC ( $\text{Ly51}^+\text{UEA-1}^-$ ) e mTEC ( $\text{Ly51}^-\text{UEA-1}^+$ ), (C) cTEC hi ( $\text{EpCAM}^+\text{MHCII}^{\text{hi}}$ ) e cTEC lo ( $\text{EpCAM}^+\text{MHCII}^{\text{lo}}$ ), (D) células progenitoras epiteliais tímicas (TEPC,  $\alpha 6 \text{ integrin}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}}$ ), intermediárias (Int,  $\alpha 6 \text{ integrin}^{\text{int}} \text{Sca-1}^{\text{lo}}$ ) e com baixo potencial progenitor ( $\alpha 6 \text{ integrin}^{\text{lo}} \text{Sca-1}^{\text{lo}}$ ), analisadas dentro da população de cTEC lo, (E) mTEC hi ( $\text{EpCAM}^+\text{MHCII}^{\text{hi}}$ ) e mTEC lo ( $\text{EpCAM}^+\text{MHCII}^{\text{lo}}$ ), (F) células proliferativas mTEC hi e mTEC lo  $\text{ki67}^+$  (painéis da esquerda) cTEC hi e cTEC lo  $\text{ki67}^+$  (painéis da direita) e (G) células positivas para regulador autoimune (AIRE) mTEC hi e mTEC lo  $\text{AIRE}^+$  (painéis da esquerda) e cTEC hi e cTEC lo  $\text{AIRE}^+$  (painéis da direita).





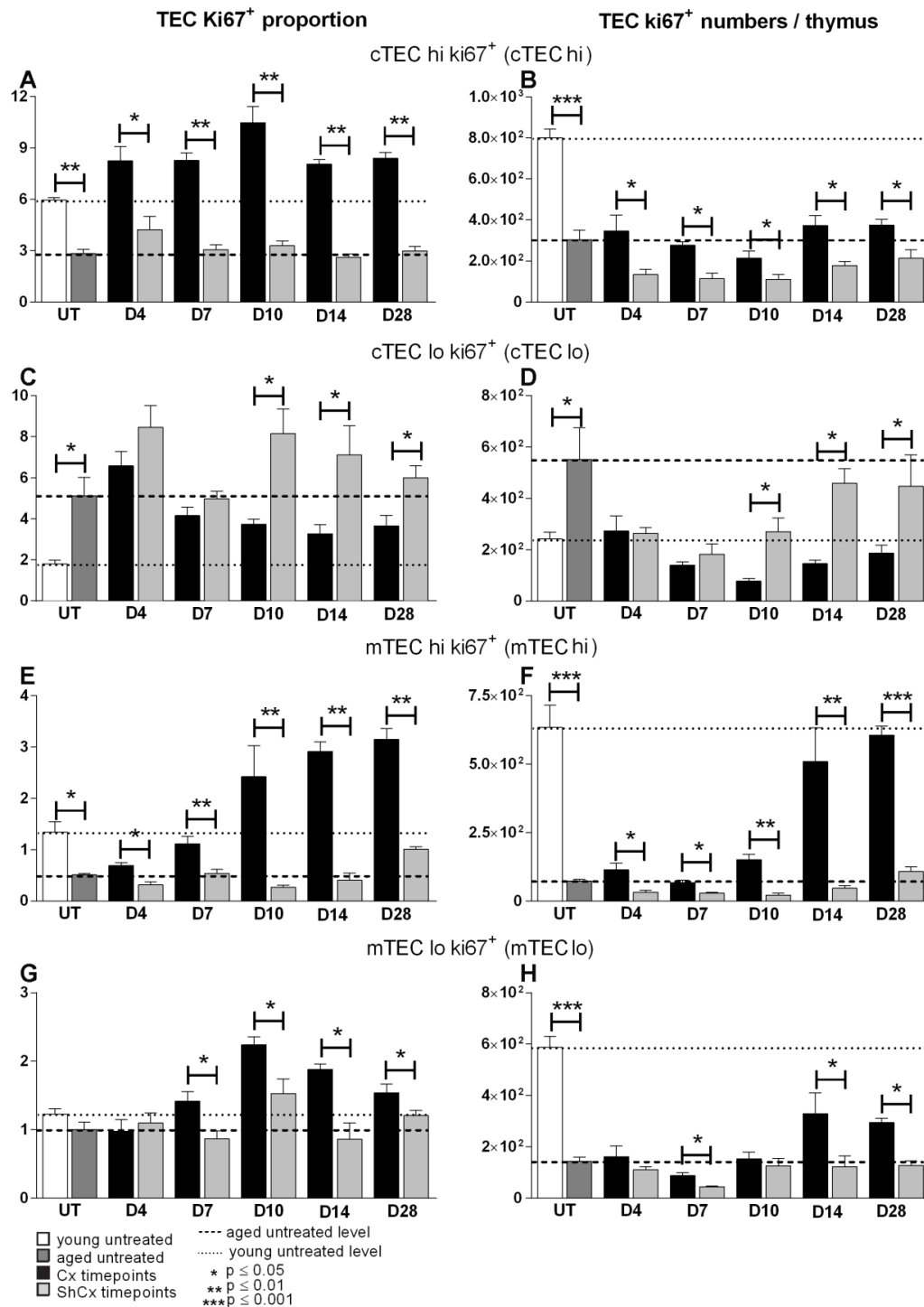
**Figura 4.3** Valores relativos (coluna da esquerda) e absolutos (coluna da direita) de TEC em timos de camundongos jovens (young untreated), envelhecidos não tratados (aged untreated), envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados em diferentes dias após castração. **(A e B)** Valores relativos (analisados em TEC totais) e absolutos de cTEC, **(C e D)** valores relativos (analisados em cTEC) e absolutos de cTEC hi, **(E e F)** valores relativos (analisados em cTEC) e absolutos de cTEC lo, **(G e H)** valores relativos (analisados em TEC totais) e absolutos de mTEC, **(I e J)** valores relativos (analisados em mTEC) e absolutos de mTEC hi e **(L e M)** valores relativos (analisados em mTEC) e absolutos de cTEC lo.

**Table 4.1** Proporção das diversas subpopulações de TEC em camundongos jovens (young), envelhecidos (aged) e envelhecidos castrados (Cx), analisados em diferentes dias após castração.

\*p≤0,05 Cx vs aged, \*\*p≤0,01 Cx vs aged

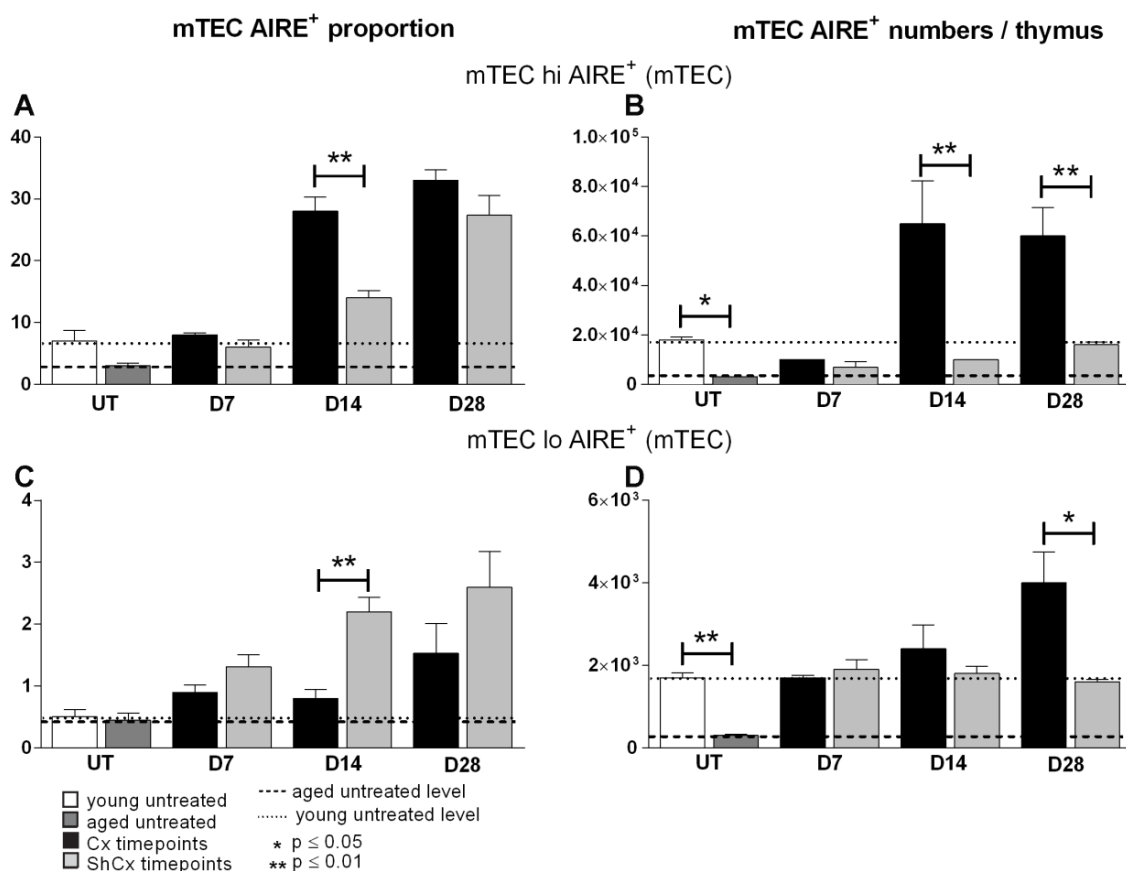
#p≤0,05 aged vs young, ##p≤0,01 aged vs young, ###p≤0,001 aged vs young

	mTEC hi	mTEC lo	cTEC lo (TEPC)	cTEC lo (non TEPC)	cTEC hi
<b>Young</b>	27 ± 1.6%	63 ± 3.0%	3.5 ± 0.1%	3.5 ± 0.1%	3 ± 0.2%
<b>Aged</b>	10 ± 0.4%#	40 ± 0.1%	33 ± 0.5%###	13 ± 0.5%##	4 ± 0.1%
<b>Cx D7</b>	10 ± 0.4%	40 ± 0.1%	25 ± 1.3%	15 ± 0.9%	10 ± 0.2%
<b>Cx D14</b>	23 ± 0.8%*	49 ± 0.1%	19 ± 0.6%*	3 ± 0.1%**	6 ± 0.1%
<b>Cx D28</b>	25 ± 2.3%*	50 ± 1.02%	17 ± 0.2%*	4 ± 0.1%*	4 ± 0.1%
<b>Cx D56</b>	17 ± 0.4%	45 ± 0.1%	15 ± 1.5%*	17 ± 1.2%	6 ± 0.12%
<b>Cx D84</b>	14 ± 0.3%	56 ± 1.3%	10 ± 0.7%**	14 ± 0.2%	6 ± 0.2%



**Figura 4.4** Valores relativos (coluna da esquerda) e absolutos (coluna da direita) de TEC proliferativas ki67<sup>+</sup> obtidas de camundongos jovens (young untreated), envelhecidos não tratados (aged untreated), envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados em diferentes dias após castração. **(A)** Valores relativos (analisados em cTEC hi) e **(B)** absolutos de cTEC hi ki67<sup>+</sup>, **(C)** valores relativos (analisados em cTEC lo) e **(D)** absolutos de cTEC lo ki67<sup>+</sup>, **(E)** valores relativos (analisados em mTEC hi) e **(F)** absolutos de mTEC hi

ki67<sup>+</sup> e **(G)** valores relativos (analisados em mTEC lo) e **(H)** absolutos de mTEC lo ki67<sup>+</sup>.



**Figura 4.5** Valores relativos (coluna da esquerda) e absolutos (coluna da direita) de mTECs AIRE<sup>+</sup> obtidas de timos de camundongos jovens (young untreated), envelhecidos não tratados (aged untreated), envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados em diferentes dias após castração. **(A)** Valores relativos (analisado em mTEC hi) e **(B)** absolutos de mTEC hi AIRE<sup>+</sup>, **(C)** valores relativos (analisado em mTEC lo) e **(D)** absolutos de mTEC lo ki67<sup>+</sup>.

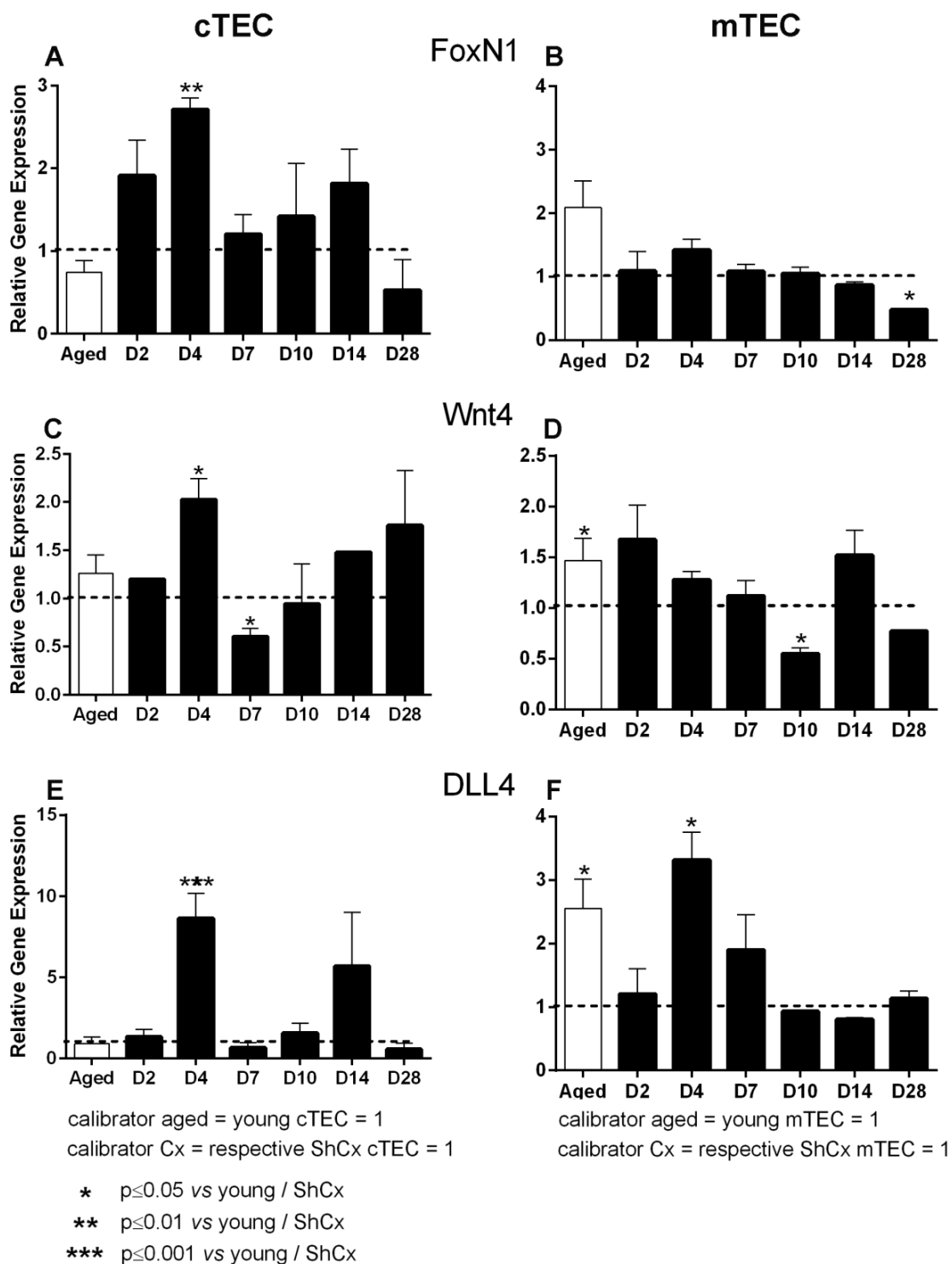
### 4.3 A depleção de hormônios sexuais induz aumento da expressão de FoxN1, Wnt4 e DLL4 concomitante à sinalização de activina em cTEC lo de animais senis

A senescência afeta de forma diferenciada a expressão de FoxN1, Wnt4 e DLL4 nos diferentes compartimentos tímicos. Animais envelhecidos não apresentam modulação de nenhum desses genes em cTEC (Fig. 4.6A, C e E), enquanto a expressão de Wnt4 e DLL4 está aumentada em mTEC (Fig. 4.6B, D e F). A

depleção de hormônios sexuais por vez, induz o aumento da expressão de FoxN1, Wnt4 e DLL4 em cTEC após 4 dia4.s (Fig. 4.6A, C e E), concomitante ao aumento adicional de DLL4 em mTEC (Fig. 4.6F), seguido posteriormente da redução de FoxN1 e Wnt4, respectivamente em D28 e D10, no compartimento medular (Fig. 4.6B e F). A análise específica dentro das subpopulações de cTEC e mTEC demonstra que o envelhecimento resulta em aumento de FoxN1, Wnt4 e DLL4 em cTEC lo e de FoxN1 em mTEChi. A expressão desses genes permanece inalterada em cTEC lo, enquanto Wnt4 está aumentada em cTEC hi obtidas de animais envelhecidos (Fig. 4.7A, C e E). A castração afeta majoritariamente células cTEC lo, aumentando a expressão de FoxN1, Wnt4 e DLL4, embora gere redução de Wnt4 em cTEC hi e aumento de DLL4 em mTEC lo (Fig. 4.7B, D e F). Esses dados demonstram um perfil único de ativação de cTEC lo induzidos por castração.

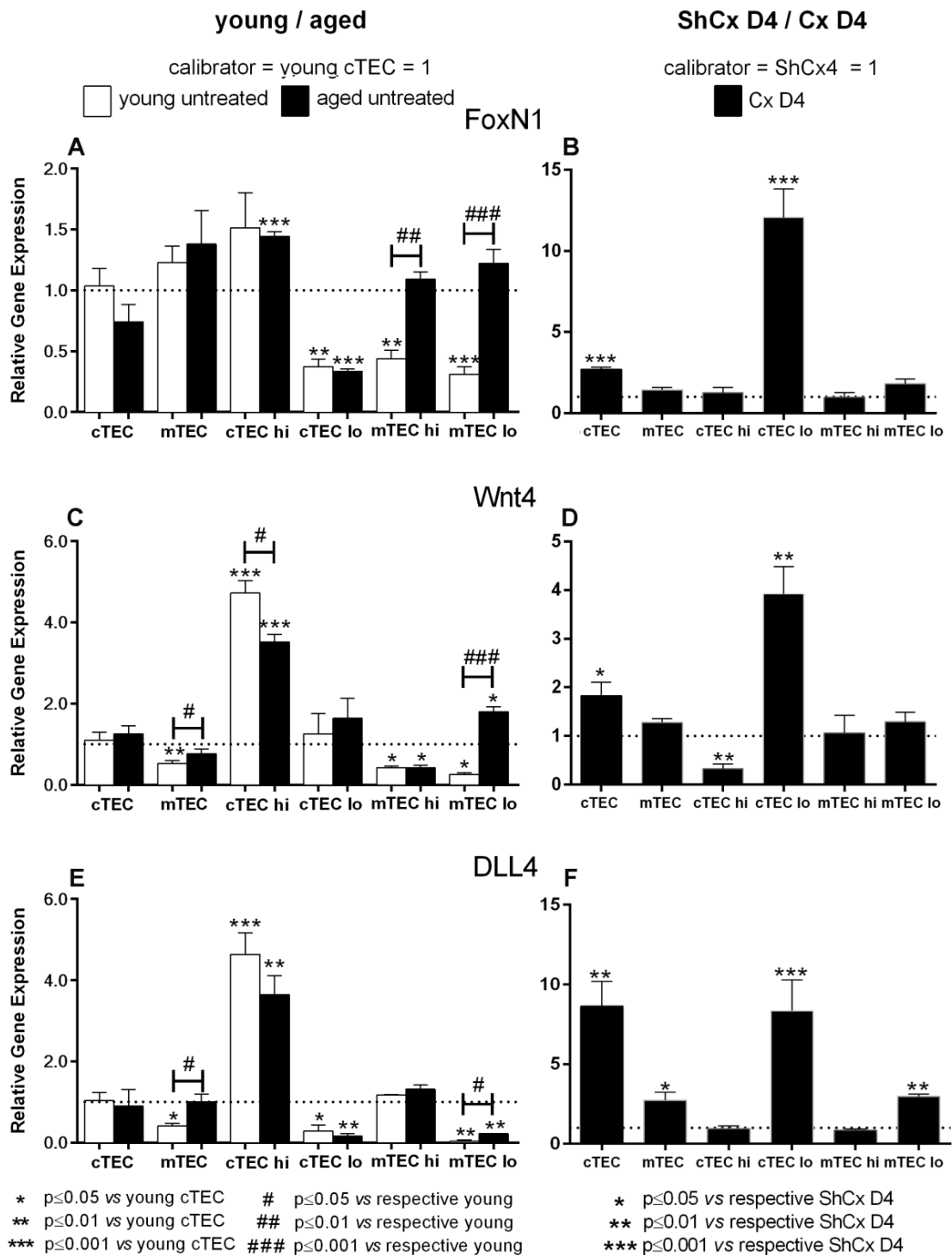
Com o objetivo de identificarmos um possível mecanismo associado à modulação desses genes reguladores em TEC de animais castrados, dados obtidos através da técnica de microarranjo gênico de TEC totais de animais jovens e envelhecidos, castrados ou não, foram analisados. A representação em heatmap do transcriptoma de TEC de animais jovens e envelhecidos demonstra que muitos genes são modulados de forma contrária ao de animais jovens durante o envelhecimento, ocorrendo aumento (vermelho) ou redução (azul) quando comparados ao gene constitutivo *Gadph* (Fig. 4.8A). No total 464 genes estão reduzidos em animais envelhecidos e são restabelecidos aos níveis de jovens após castração enquanto, contrariamente, 31 genes apresentam aumento de expressão durante a senescência e são diminuídos com a depleção de hormônios sexuais. Dentre os genes aumentados em animais envelhecidos está a folistatina (FST). O aumento em aproximadamente três vezes de FST em TEC foi revertido após castração no timo senil, progressivamente em D4 e D7 (Fig. 4.8B). Uma vez que FST neutraliza a ação de activina, previamente reportada por influenciar diferentes etapas da timopoiese, analisamos a expressão de activina e FST pelos diferentes grupos de células estromais em animais envelhecidos castrados ou não. FST está aumentada tanto em cTEC quanto em fibroblastos de animais envelhecidos e apresenta uma progressiva redução em cTEC, mTEC, células endoteliais e fibroblastos após castração que culmina em D10 (Fig. 4.9A, painel superior). Paralelamente a expressão de activina  $\beta$ A também está aumentada em mTEC e fibroblastos no timo senil, embora um aumento adicional de 10 vezes ocorra em

fibroblastos nos diferentes dias após castração, acompanhado do aumento em aproximadamente 60 vezes da expressão de activina  $\beta$ A em cTECs, observado em D10 (Fig. 4.9A, painel inferior). Além de induzir maior disponibilidade de activina, a depleção de hormônios sexuais também modula os diferentes receptores nos quais esse peptídeo atua. Acvr1a, que ativa a via intracelular de smad 2/3 subsequente à dimerização do receptor tipo 2, está aumentado em aproximadamente 10 vezes em cTEC lo após castração (D4), embora os níveis de expressão em cTEC hi permaneçam os mesmos (Fig. 4.9B, gráfico superior). Os receptores do tipo 2, acvr2a e acvr2b que ligam diretamente activina, também estão aumentados em células cTEC lo de animais castrados quando comparados ao grupo sham. Adicionalmente, ocorre aumento de acvr2a em cTEC lo e de acvr2b em cTEC hi de animais envelhecidos não tratados (Fig. 4.9B, gráfico mediano e inferior). Além de estimular o circuito intratímico de activina, a castração de animais envelhecidos também induz aumento de activina  $\beta$ A circulante em D4 (Fig. 4.9C).



**Figura 4.6** Expressão gênica de FoxN1, Wnt4 e DLL4 em cTEC (coluna da esquerda) e mTEC (coluna da direita) de animais envelhecidos não tratados ou castrados em diferentes dias. Expressão de FoxN1 em (A) cTEC e (B) mTEC. Expressão de Wnt4 em (C) cTEC e (D) mTEC. Expressão de DLL4 em (E) cTEC e (F) mTEC. Os valores representados de animais envelhecidos não tratados estão normalizados em relação ao grupo jovem (young = 1), enquanto os valores de

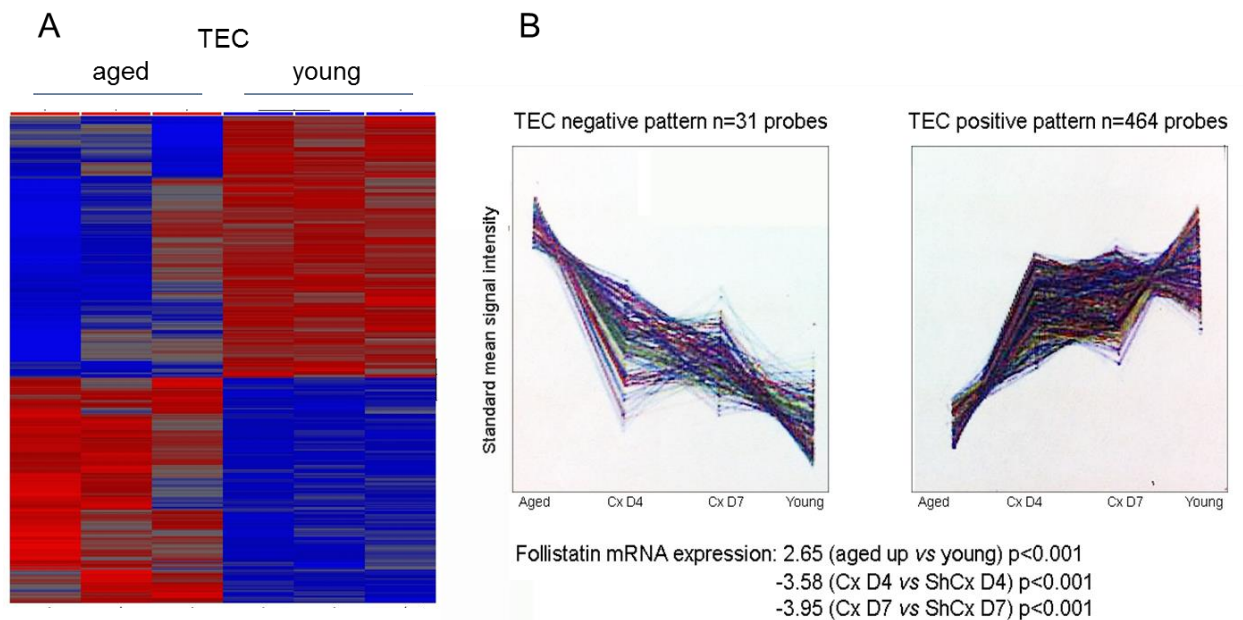
animais envelhecidos castrados estão normalizados em relação aos respectivos grupos sham (ShCx = 1).



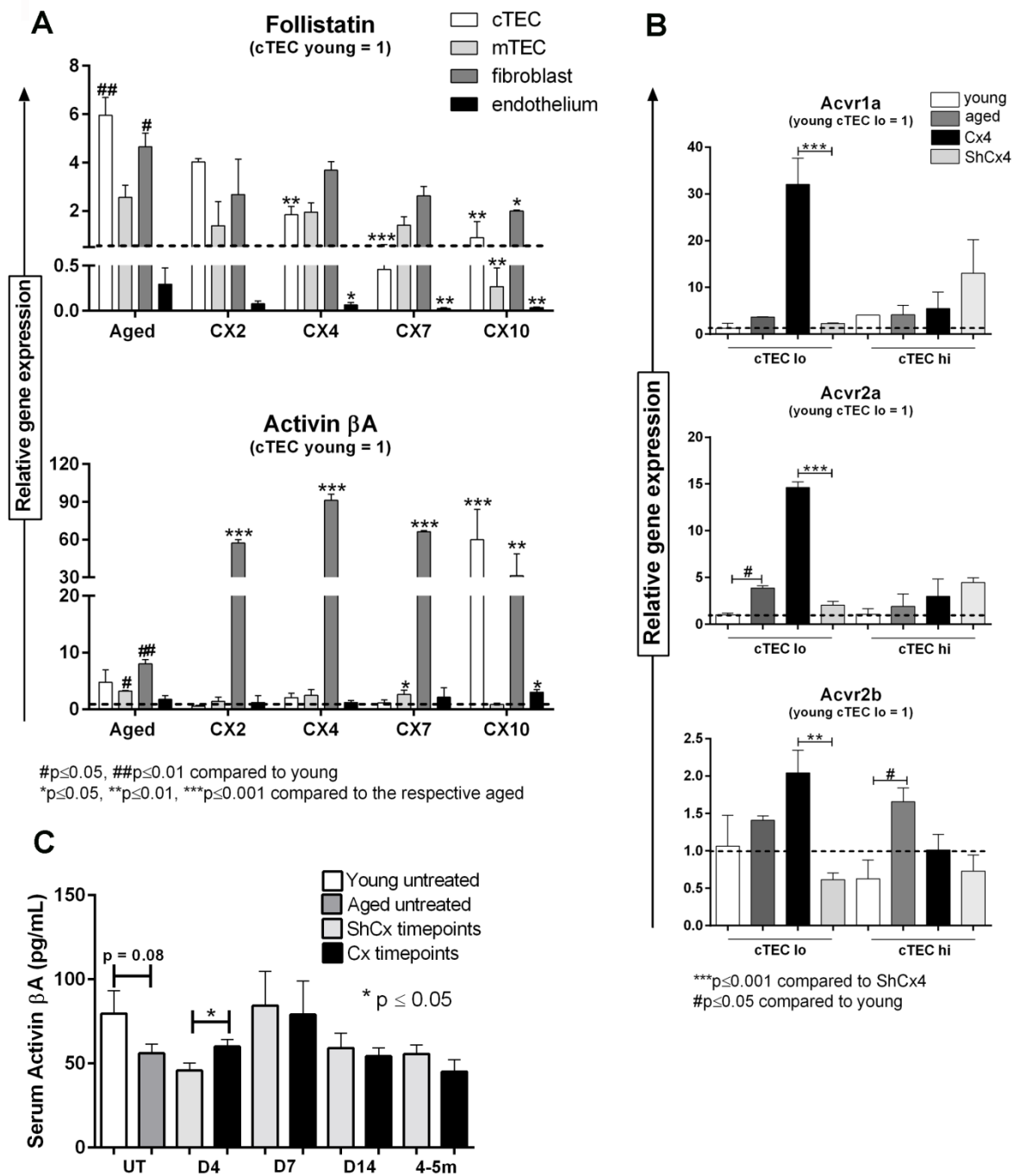
**Figura 4.7** Expressão gênica nas diferentes subpopulações de TEC obtidas de animais jovens ou envelhecidos não tratados (barra branca e preta respectivamente, coluna da esquerda) e animais envelhecidos castrados analisados no dia 4 após castração (coluna da direita). (A e B) Expressão de FoxN1, (C e D) Wnt4 e (E e F) DLL4. Os valores representados de animais jovens e



envelhecidos não tratados foram normalizados em relação a cTEC do grupo jovem (cTEC young = 1), enquanto os valores de animais envelhecidos castrados estão normalizados em relação aos respectivos grupos sham (ShCx D4 = 1).



**Figura 4.8 Perfil de expressão gênica em TECs totais obtidas de animais envelhecidos não tratados (aged), envelhecidos castrados após 4 e 7 dias (Cx D4 e Cx D7) e jovens (young) através da técnica de microarranjo de DNA. (A)** Heatmap obtido a partir da análise genética de amostras de mRNA de TEC obtidas de animais jovens (young, representado à esquerda) e envelhecidos (aged, representados à direita). Os transcriptomas obtidos de animais jovens foram comparados ao de animais idosos, estando em vermelho representados os genes que apresentam aumento de expressão enquanto em azul os que estão reduzidos em relação ao calibrador Gadph. **(B)** (Painel da esquerda) 31 sondas demonstram tendência de redução do perfil gênico de animais envelhecidos em direção ao perfil jovem seguinte à técnica de castração em D4 e D7. (Painel da direita) 464 sondas demonstram tendência de aumento do perfil gênico de animais envelhecidos em direção ao perfil jovem seguinte à técnica de castração em D4 e D7.



**Figura 4.9 Modulação intratímica do circuito de activina-folistatina. (A)** Expressão gênica de activina  $\beta$ A (gráfico inferior) e seu antagonista follistatina (gráfico superior) nas subpopulações de células estromais tímicas cTEC, mTEC, fibroblastos e endotéliais de animais jovens, envelhecidos não tratados e envelhecidos castrados em diferentes dias. Os valores representados estão normalizados em relação à expressão em cTEC de animais jovens (cTEC young = 1) dentro dos respectivos grupos celulares. **(B)** Expressão gênica dos receptores de activina Acvr1a (painel superior), Acvr2a (painel mediano) e Acvr2b (painel inferior)

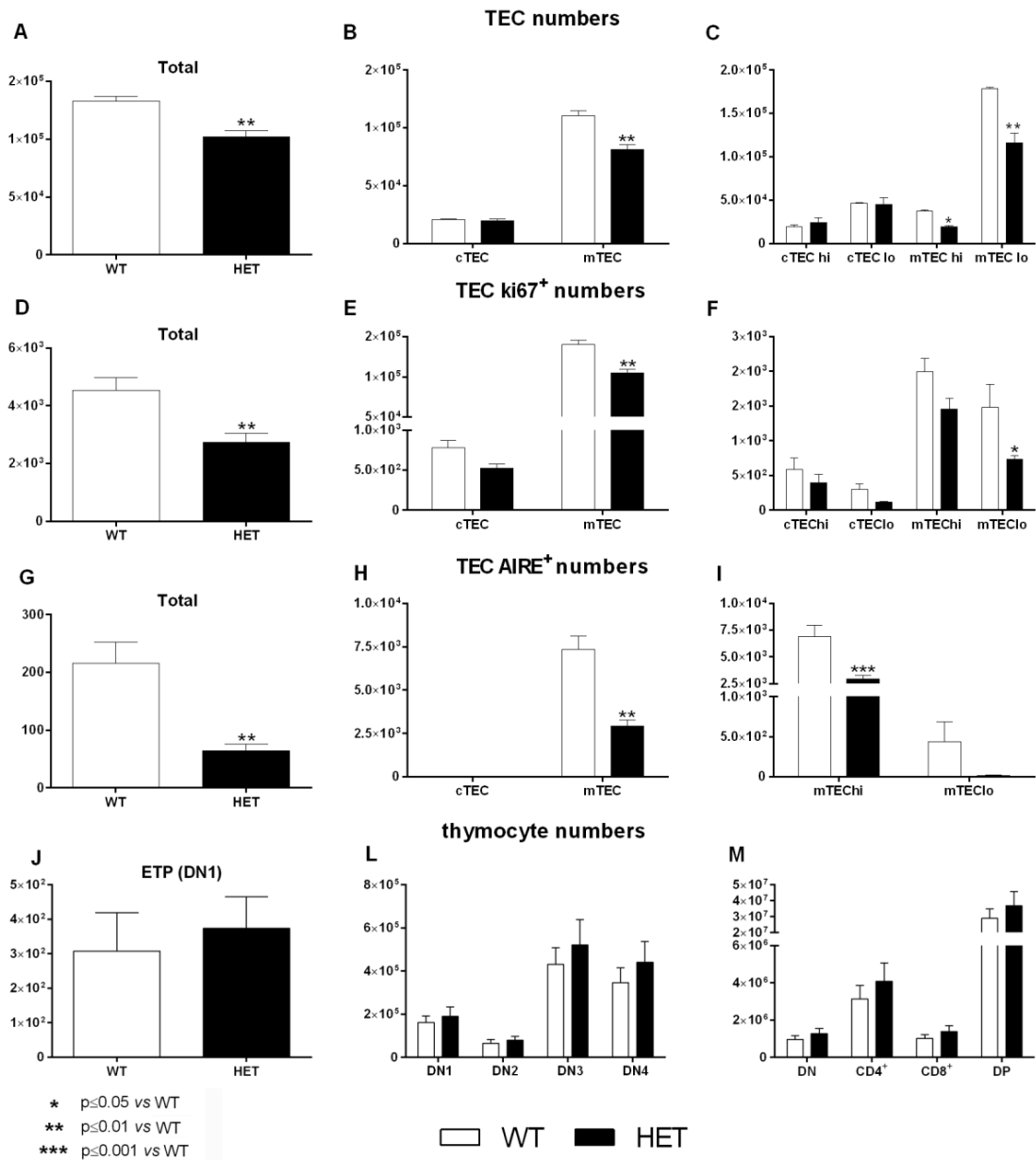
em cTEC lo e cTEC hi. Os valores representados estão normalizados em relação à expressão em cTEC lo de animais jovens (cTEC lo = 1). **(C)** Quantificação de activina  $\beta$ A no soro de camundongos jovens, envelhecidos não tratados, envelhecidos castrados e envelhecidos sham castrados em diferentes dias. Valores expressos em pg/mL de soro.

#### **4.4 Camundongos deficientes para a expressão de activina apresentam redução no desenvolvimento de mTEC**

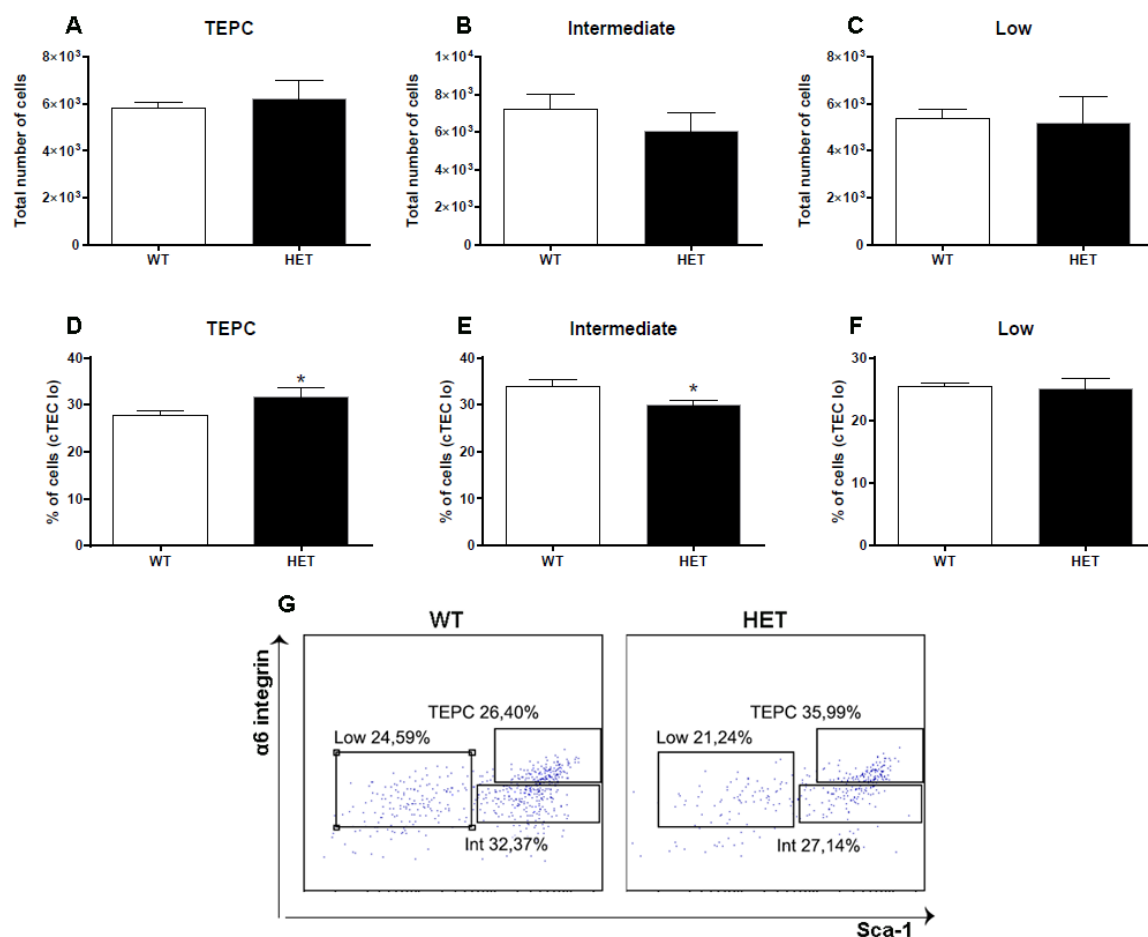
Uma vez que camundongos com total deficiência na expressão de activina  $\beta$ A morrem logo após o nascimento, analisamos os efeitos desse peptídeo sobre o desenvolvimento tímico utilizando-se como modelo experimental camundongos adultos jovens com ausência parcial ou nula de activina  $\beta$ A (HET e WT, respectivamente) e embriões E14.5 com ausência total, parcial ou nula (KO, HET e WT, respectivamente). Os dados obtidos demonstram que camundongos jovens HET apresentam redução do número de TEC totais, particularmente de mTEC, associado ao deficiente desenvolvimento de ambas as subpopulações de mTEC hi e mTEC lo (Fig. 4.10A-C). Ao analisarmos a proliferação celular, observamos que embora o número total de mTEC ki67<sup>+</sup> esteja reduzido nesses camundongos, somente mTEC lo ki67<sup>+</sup> demonstra decréscimo significativo, enquanto os números de células mTEC hi proliferativas permanecem os mesmos quando comparados ao grupo WT (Fig. 4.10D-F). A expressão de AIRE também encontra-se reduzida em camundongos HET, especificamente em mTEC hi, tanto em termos percentuais quanto absolutos (Fig. 4.10G-I). Nenhuma alteração nos valores das diferentes subpopulações de timócitos ou células progenitoras (ETP) foi observada em animais jovens com deleção parcial de activina (Fig. 4.10J-M). A análise do potencial progenitor dentro da população de cTEC lo demonstra que embora não haja alteração dos valores totais das diferentes subpopulações (Fig. 4.11A-C) ocorre alteração das proporções, havendo aumento da razão de TEPC em animais activina HET (Fig. 4.11D) enquanto os números de células com potencial intermediário estão reduzidos (Fig. 4.11E), não havendo alteração nos percentuais de cTEC lo com baixo potencial de TEPC (Fig. 4.11F). Representação do perfil citofluorimétrico de cTEC lo de acordo com o potencial progenitor, baseado na expressão de integrina  $\alpha$ 6 e Sca-1 (Fig. 4.12F).

Os dados obtidos a partir de embriões E14.5 demonstram que a ausência parcial ou total de activina está associada à redução nos números de cTEC e mTEC. Particularmente, TEC com baixa expressão de MHCII são as principais comprometidas nesses embriões, havendo redução de cTEC lo e mTEC lo, embora os valores totais de mTEC hi também estejam diminuídos com ausência total de activina (Fig. 4.12A-F). Os números de cTEC hi permanecem inalterados em HET e KO (Fig. 4.12B). Adicionalmente, a ausência da sinalização de activina está associada ao aumento do total de timócitos (Fig. 4.12G) em embriões, ao mesmo tempo em que os valores de ETP e DN permanecem os mesmos (Fig. 4.12H-M).

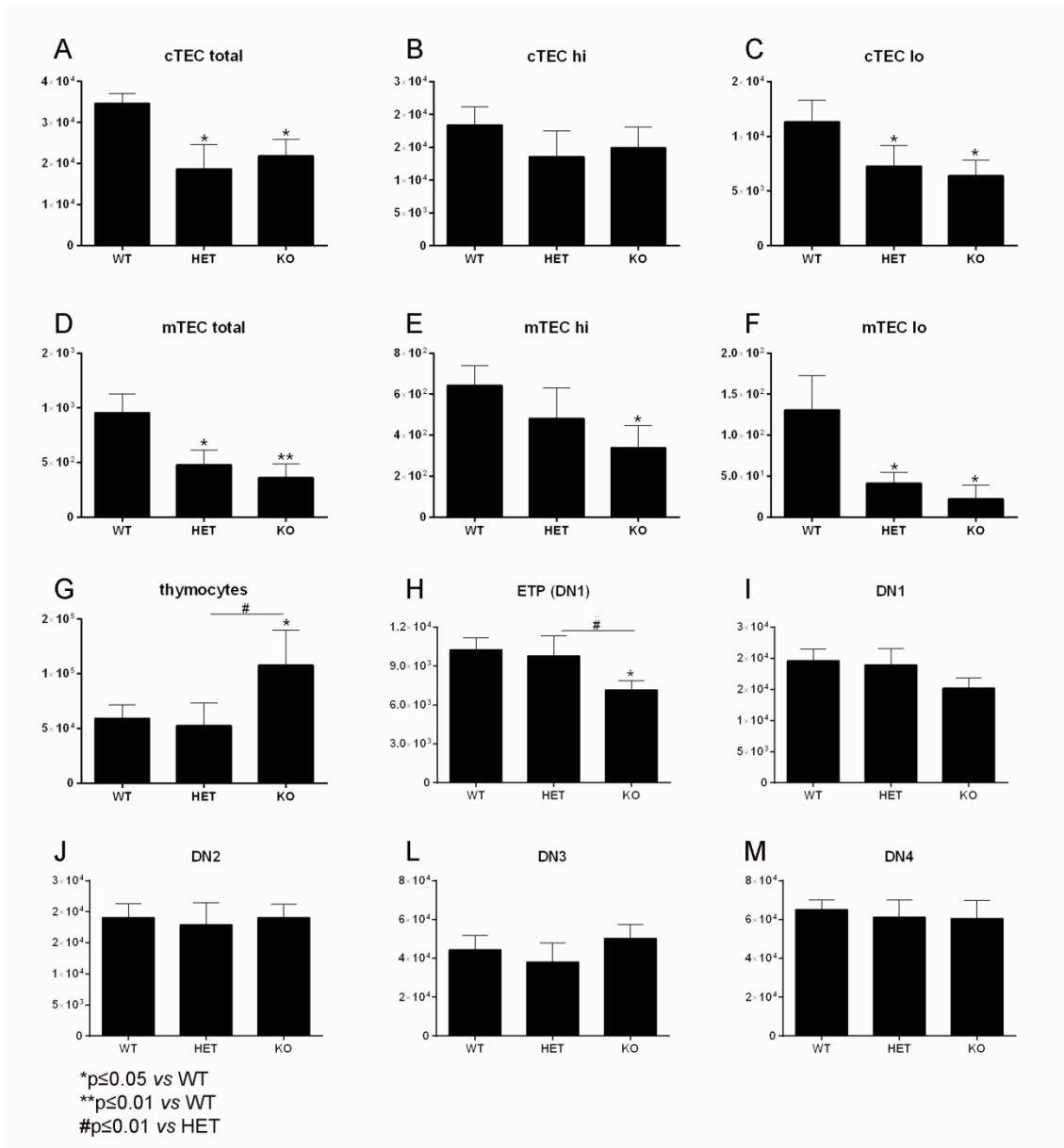
Com o objetivo de verificarmos a influencia da via de activina sobre a diferenciação de mTEC a partir de cTEC, células cTEC lo foram isoladas a partir de timos de animais jovens e mantidas em cultura por um período de 7 dias em meio contendo ou não anticorpo neutralizador de activina. Como observado em Fig. 4.13A (painel superior e mediano superior) e B, a adição de anti-activina reduziu a diferenciação de mTEC a partir de cTEC lo em aproximadamente 200%. Por outro lado, quando células cTEC lo foram isoladas de camundongos envelhecidos, a adição de activina  $\beta$ A aumentou a diferenciação de mTEC em aproximadamente 100% (Fig. 4.13 A, painel mediano inferior e inferior e B). Esse aumento foi associado à redução dos percentuais de TEPC, sugerindo que a adição de activina aja através da mobilização de células progenitoras para o restabelecimento de mTEC em animais envelhecidos a proporções semelhantes às encontradas em animais joven



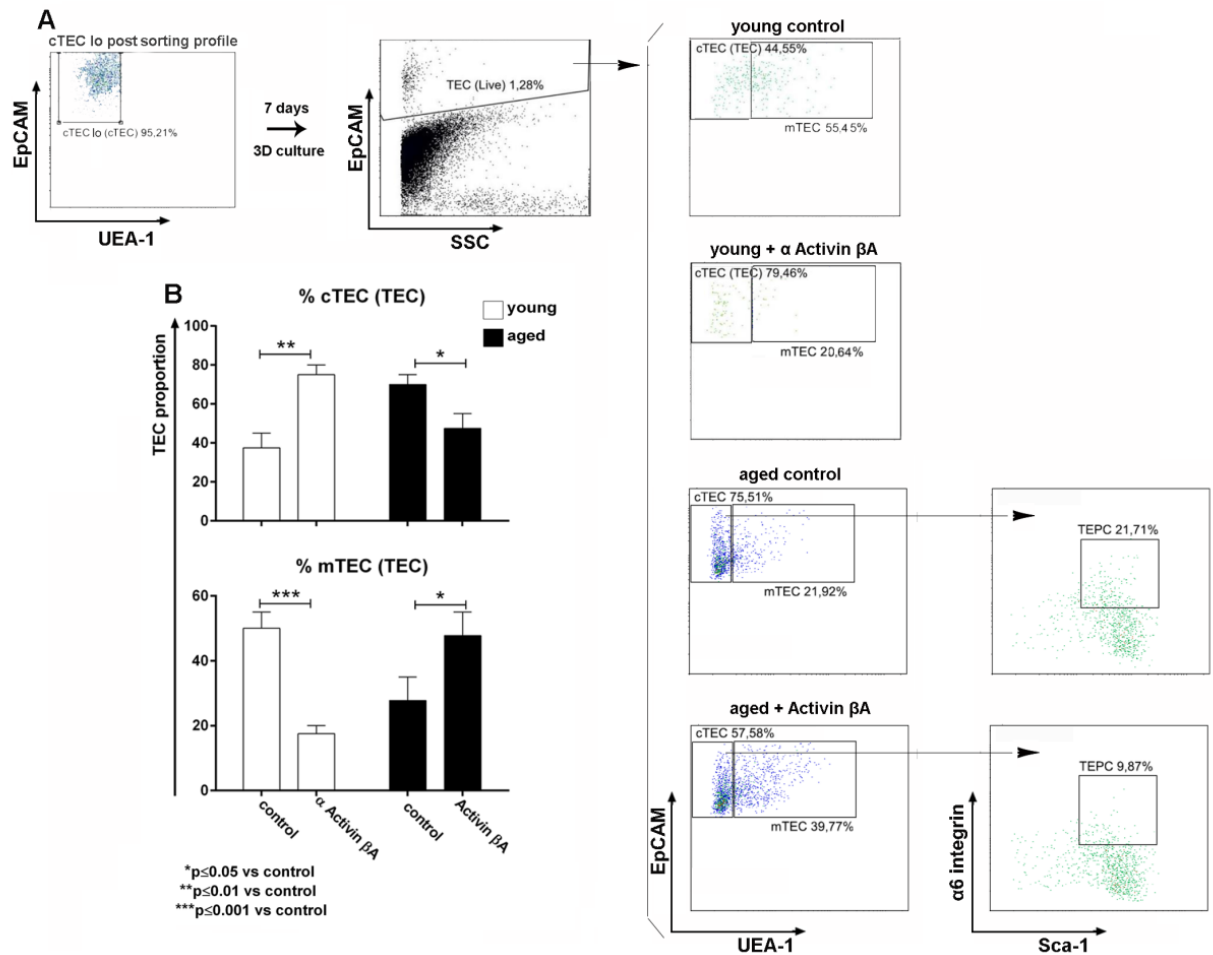
**Figura 4.10.** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67<sup>+</sup>, TEC AIRE<sup>+</sup> e timócitos obtidas de camundongos jovens com expressão total (WT, barra branca) ou parcial (HET, barra preta) de ativina βA. (A) TEC total, (B) cTEC e mTEC, (C) cTEC hi, cTEC lo, mTEC hi e mTEC lo, (D) total de TEC ki67<sup>+</sup>, (E) cTEC ki67<sup>+</sup> e mTEC ki67<sup>+</sup>, (F) cTEC hi ki67<sup>+</sup>, cTEC lo ki67<sup>+</sup>, mTEC hi ki67<sup>+</sup> e mTEC lo ki67<sup>+</sup>, (G) total de TEC AIRE<sup>+</sup>, (H) cTEC AIRE<sup>+</sup> e mTEC AIRE<sup>+</sup>, (I) mTEC hi ki67<sup>+</sup>, mTEC lo ki67<sup>+</sup>, (J) progenitores primários de células T (ETP), analisados dentro de DN1, (L) supopulações de células duplo negativas DN1, DN2, DN3 e DN4 e (M) subpopulações de timócitos DN, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e DP. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.



**Figura 4.11.** Valores e representação esquemática de células cTEC lo classificadas como TEPC, potencial intermediário (Intermediate) e baixo potencial de TEPC (Low) obtidas de camundongos jovens com expressão total (WT, barra branca) ou parcial (HET, barra preta) de activina  $\beta$ A. Valores totais de (A) TEPC, (B) células intermediárias e (C) células com baixo potencial de TEPC. Valores percentuais, analisados dentro da população de cTEC lo, de (D) TEPC, (E) células intermediárias e (F) células com baixo potencial de TEPC. (G) Representação citofluorimétrica da população de cTEC lo obtidas de animais WT e HET de acordo com a expressão de integrina  $\alpha$ 6 e Sca-1.



**Figura 4.12.** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC e timócitos de embriões de camundongos (E14.5) com expressão total (WT), parcial (HET) ou nula (KO) de *activina βA*. (A) cTEC, (B) cTEC hi, (C) cTEC lo, (D) mTEC, (E) mTEC hi, (F) mTEC lo, (G) timócitos totais, (H) progenitores primários de células T (ETP), analisados dentro de DN1, (I) supopulações de células duplo negativas DN1, (J) DN2, (L) DN3 e (M) DN4. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.

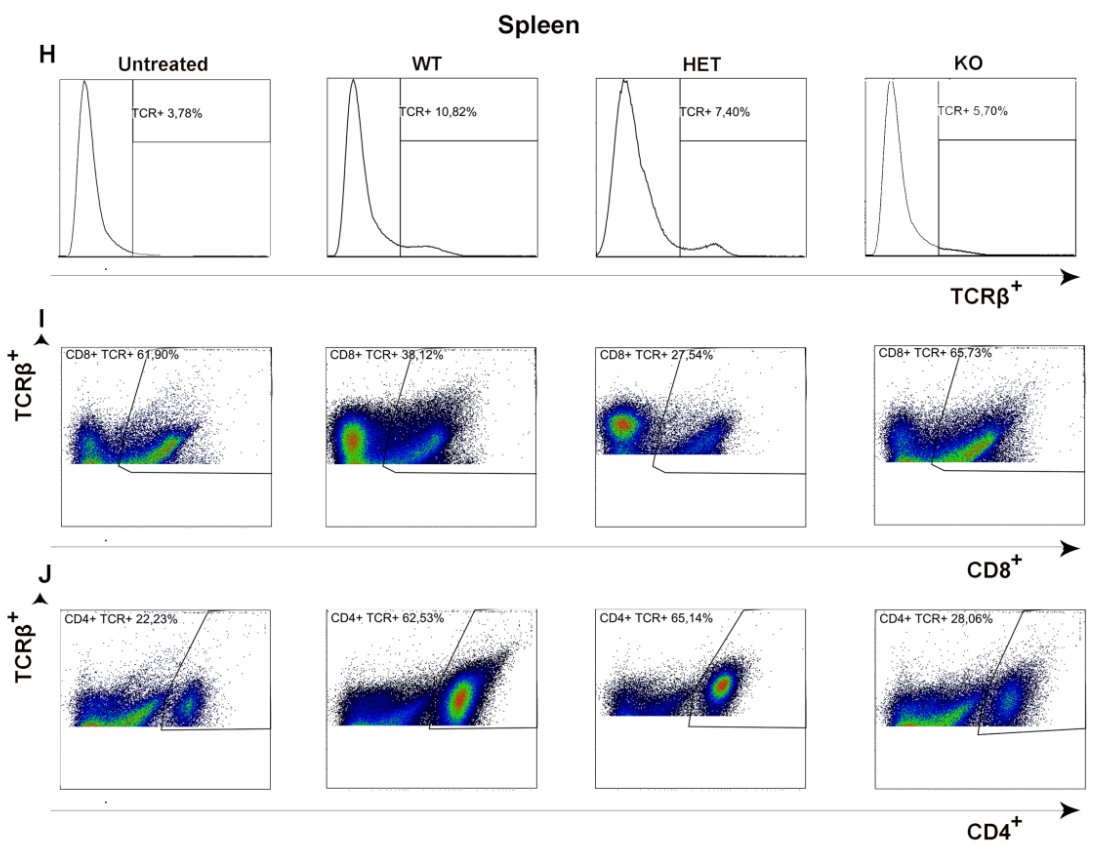
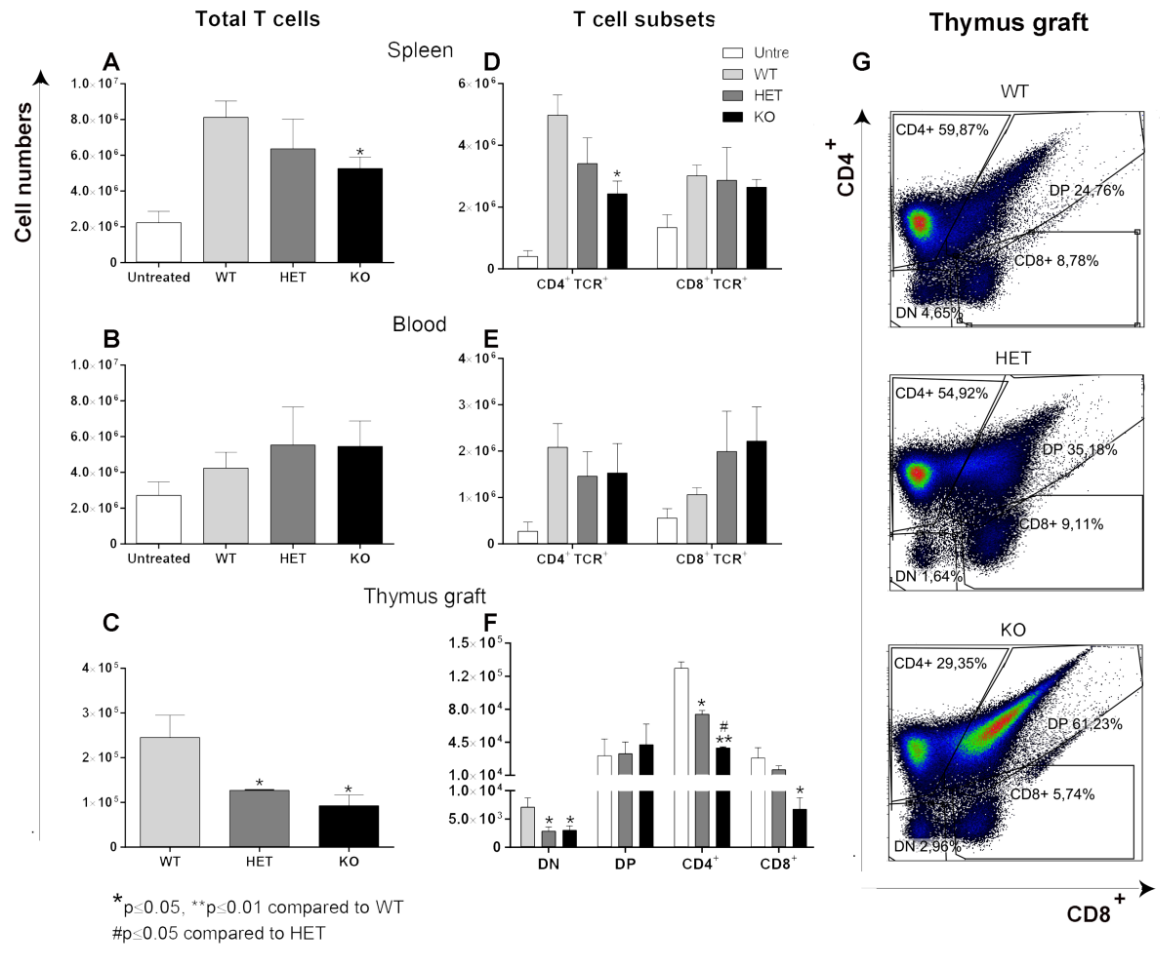


**Figura 4.13. Cultura celular 3D de células epiteliais tímicas (cTEC lo) + fibroblastos de embriões de camundongos (MEF) durante 7 dias. (A)** Células cTEC lo (EpCAM<sup>+</sup> UEA-1<sup>-</sup> MHCII<sup>lo</sup>) isoladas a partir de timos de camundongos jovens ou envelhecidos com pureza igual ou maior a 95% foram cultivadas em meio de cultura adicionado ou não de activina  $\beta$ A ou anti-activina. Após 7 dias, as culturas foram digeridas e analisadas por citometria de fluxo. À direita painéis representativos de um experimento em três demonstram perfil de diferenciação de cTEC lo em mTEC de animais jovens em meio de cultura puro (superior) ou adicionado de anti-activina (mediano superior) e de animais envelhecidos em meio de cultura puro (mediano inferior) ou adicionado de activina  $\beta$ A (inferior). Nos grupos de animais envelhecidos está destacado o percentual de TEPC à direita. **(B)** Média dos percentuais de cTEC (painel superior) e mTEC (painel inferior) de cada grupo obtida a partir de três experimentos independentes.

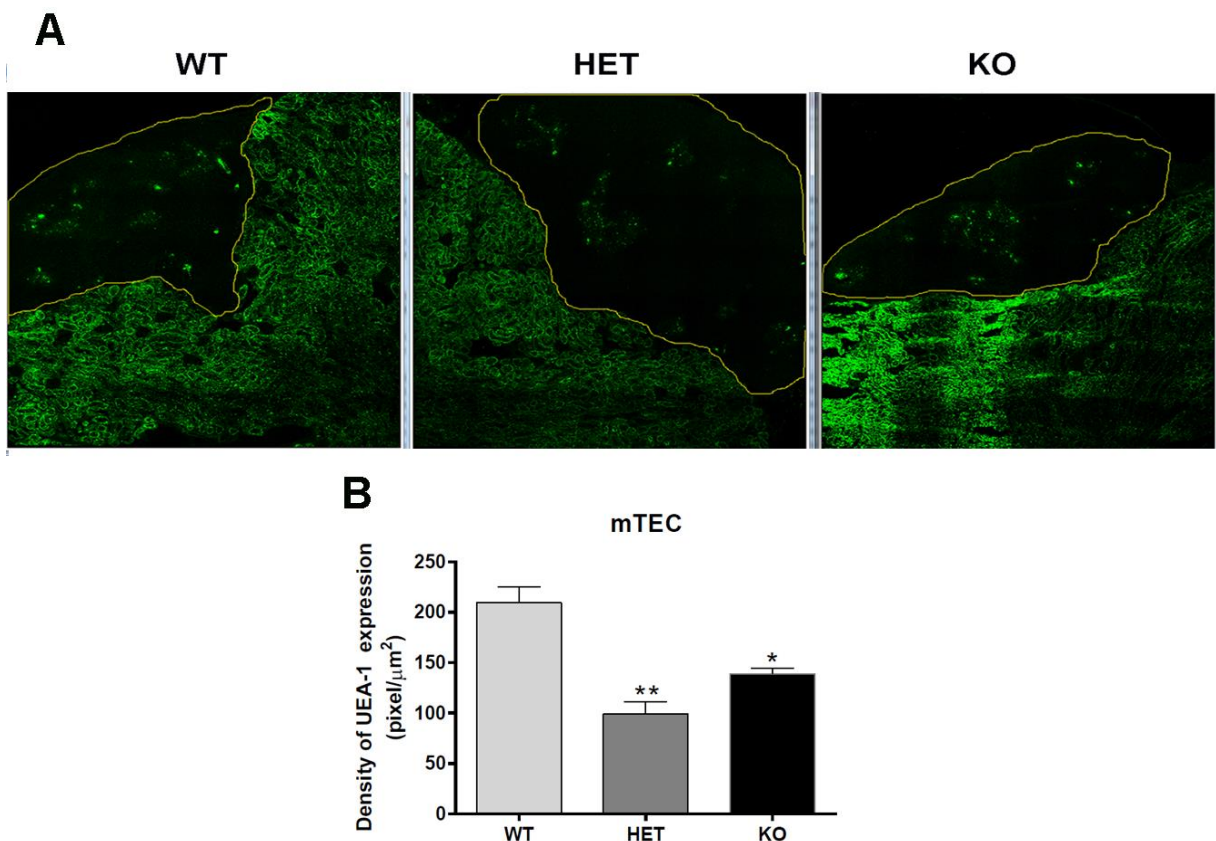
#### 4.5 A sinalização de activina em TEC é necessária para o desenvolvimento de células T



Buscando elucidar se as alterações promovidas por activina no micrambiente tímico poderiam influenciar o desenvolvimento de timócitos de maneira independente da disponibilidade de progenitores pela medula óssea, culturas de timo fetal depletadas de células T por adição de deoxiguanosina (FTOC) e provenientes de embrião WT, HET ou KO para activina  $\beta$ A, foram transplantadas em camundongos atímicos “*nude*”. Após 6 semanas os enxertos tímicos, sangue e baço desses camundongos foram analisados. Os resultados demonstram uma redução do total de células T (Fig. 4.14A), especificamente T CD4<sup>+</sup> (Fig. 4.14D), no baço de camundongos que receberam transplantes oriundos de embriões KO. De acordo, a análise fenotípica revela um gradativo decréscimo do percentual de células TCR<sup>+</sup> no baço de camundongos enxertados com timos HET e KO, quando comparados a WT (Fig. 4.14K), seguido de aumento nos percentuais de células T CD8<sup>+</sup> (Fig. 4.14I) e redução de CD4<sup>+</sup> (Fig. 4.14J) em KO. Entretanto os números de células T não estão alterados no sangue desses animais (Fig. 4.14B e E), embora os valores totais de timócitos, especificamente DN, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estejam reduzidos (Fig. 4.14C e F) com a ausência total de activina. Células DN e CD4<sup>+</sup> também estão reduzidas nos enxertos tímicos HET (Fig. 4.14C). Como observado em Fig. 4.14G, a redução dos percentuais de células simples positivas e DN em KO é seguida pelo aumento dos percentuais de DP, embora o número total dessa subpopulação não esteja alterado em termos absolutos (Fig. 4.14D). A histologia dos enxertos demonstra que a depleção de activina resulta na redução de células mTEC, caracterizadas como células UEA-1<sup>+</sup> (Fig. 4.15A), como confirmado pela análise quantitativa desse marcador (Fig. 4.15B). Juntos, esses dados indicam que a sinalização de activina é necessária para o desenvolvimento de mTEC e de células T maduras CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.



**Figura 4.14 Perfis de células T no timo, sangue e baço de camundongos atímicos “nudes” transplantados com cultura de timo embrionário (FTOC, E14.5) com expressão normal (WT), parcial (HET) ou nula (KO) de activina  $\beta$ A. Baço e sangue de camundongos atímicos não transplantados (untreated) foram adicionados como controles. (A) Total de células TCR<sup>+</sup> no baço, (B) sangue e (C) enxerto tímico. (D) Total das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no baço e (E) sangue. (F) Total das subpopulações de tímócitos DP, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e DN no enxerto tímico. Valores representam o total de células por enxerto. (G) Perfil citofluorimétrico das subpopulações de tímócitos obtidas do enxerto tímico provenientes de cultura de timos de embriões WT (painel superior), HET (painel mediano) e KO (painel inferior). (H) Perfil citofluorimétrico de células TCR<sup>+</sup> totais, (I) TCR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> e (J) TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> no baço de camundongos atímicos não transplantados (painel esquerdo), transplantados com timos de embriões WT (painel mediano esquerdo), HET (painel mediano direito) ou KO (painel direito), (I) células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>.**



**Figura 4.15 Análise da expressão de UEA-1 em enxertos renais realizados a partir do transplante de cultura de timo embrionário (FTOC, E14.5) com**

**expressão normal (WT), intermediária (HET) ou nula (KO) de activina  $\beta$ A.** (A) Representação histológica de enxertos renais de acordo com a expressão do marcador de TEC medular UEA-1. O contorno em amarelo delimita a área do enxerto. Imagens adquiridas em aumento de 400x. (B) Quantificação de UEA-1 nos enxertos renais. Os valores estão representados em pixel /  $\mu\text{m}^2$  de área do enxerto.

#### **4.6 A castração induz restabelecimento da atrofia tímica através do aumento da sinalização de activina**

O envolvimento da via de activina na atrofia tímica foi verificado através da administração *i.p.* de folistatina a cada 48 horas em camundongos jovens e por um período de 7 ou 14 dias. Semelhante ao observado durante o envelhecimento, o tratamento com FST durante 7 dias induz aumento de cTEC e redução de mTEC no timo jovem, quando comparado aos respectivos controles tratados com PBS (Fig. 4.16B), embora os valores totais de TEC permaneçam os mesmos nos dois grupos (Fig. 4.16A). Especificamente, as populações de TEC lo são as principais afetadas com a inibição de activina, havendo aumento do número de cTEC lo simultaneamente à redução de mTEC lo, sem alteração em cTEC hi e mTEC hi (Fig. 4.16C). O total de mTEC lo  $\text{ki67}^+$  é reduzido com o tratamento com FST, assim como de cTEC hi  $\text{ki67}^+$ , embora nenhuma alteração na proliferação de cTEC lo seja detectada (Fig. 4.16F). A administração de FST por 7 dias também gera redução da população de mTEC AIRE<sup>+</sup>, particularmente mTEC hi AIRE<sup>+</sup> (Fig. 4.16H e I). Tais alterações no compartimento epitelial estão associadas à redução do número total de timócitos CD8<sup>+</sup> e aumento de DP, enquanto os números de DN e ETP permanecem os mesmos (Fig. 4.16J-M). Entretanto, a administração de FST realizada por um período maior de 14 dias, não resulta em alteração do compartimento epitelial (Fig. 4.17A-I) nem do total de ETP (Fig. 4.17J), embora as subpopulações de DN (Fig. 4.17L) e de timócitos totais (Fig. 4.17M) estejam reduzidas nesses animais, sugerindo que mecanismos de recuperação e resistência ao tratamento prolongado com FST estejam presentes no microambiente tímico de animais jovens, embora as populações linfocitárias demonstrem ser sensíveis à exposição prolongada de FST nos timos desses animais.

Com o objetivo de elucidarmos se o aumento da sinalização de activina está associado ao restabelecimento da atrofia tímica senil pós castração, animais envelhecidos castrados com 7 ou 14 dias foram tratados com injeções *i.p.* de

folistatina, a cada 48 horas, desde o primeiro dia pós castração e até o momento da análise. Os dados obtidos demonstram aumento do total de TEC em D7 (Fig. 4.18A) associado à redução do número de cTEC em D14 (Fig. 4.18B) e aumento do número de mTEC em ambos os dias 7 e 14 pós castração (Fig. 4.18C), quando comparados aos respectivos sham. Tais variações pós castração são observadas somente nos grupos tratados com PBS. A administração de FST reduz o número total de TEC em Cx14 (Fig. 4.18A), de cTEC no grupo Sh14 (Fig. 4.18B) e reverte o aumento de mTEC observado em Cx7 e Cx14 (Fig. 4.18C), quando comparado aos respectivos controles tratados com PBS. Especificamente, a castração induz aumento de cTEC hi em Cx7 e Cx14, em animais tratados tanto com PBS quanto com FST, quando comparado aos grupos sham, ao passo que o tratamento com FST reverte a expansão de cTEC hi em Cx14, embora não em Cx7 (Fig. 4.18D). Ocorre redução de cTEC lo em Cx14 (Fig. 4.18E), quando comparado a sham, e em Sh14 tratado com FST, em relação aos tratados com PBS (Fig. 4.18E). A castração também induz aumento de células mTEC hi tanto em Cx7 quanto em Cx14 nos grupos tratados com PBS, embora aumento em Cx14 também tenha ocorrido em FST. Essa expansão de mTEC hi em Cx7 e Cx14 é inibida com a adição de FST (Fig. 4.18F). Os números de mTEC lo estão aumentados em Cx7 somente no grupo PBS e a administração de FST previne esse aumento (Fig. 4.18G). Tais variações estão ou não relacionadas à proliferação celular. A castração induz aumento do número total de cTEC ki67<sup>+</sup> e cTEC hi ki67<sup>+</sup> em ambos os dias 7 e 14, tanto em animais tratado com PBS quanto FST, quando comparados aos respectivos sham (Fig. 4.18H e I). Da mesma forma como observado para cTEC lo totais, o número de cTEC lo ki67<sup>+</sup> está reduzido em animais Cx14 que receberam PBS, quando comparado ao respectivo grupo sham, e Sh14 tratado com FST, quando comparado aos tratados com PBS (Fig. 4.18J). O total de mTEC ki67<sup>+</sup> está aumentado em ambos Cx7 e Cx14 nos grupos tratados com PBS, embora aumento dessas células em Cx14 também tenha sido observado em FST. O tratamento com FST também reduz mTEC ki67<sup>+</sup> em Cx7 e Cx14, quando comparado aos animais que somente receberam PBS como controle (Fig. 4.18L). As variações na proliferação de mTEC hi são as mesmas observadas para mTEC total, com exceção de que FST somente inibe o aumento de mTEC hi ki67<sup>+</sup> em Cx14, não em Cx7, embora o total de mTEC hi esteja reduzido em ambos os ponto (Fig. 4.18M). Da mesma forma como observado para mTEC lo totais, o número de mTEC lo ki67<sup>+</sup> aumentou em animais

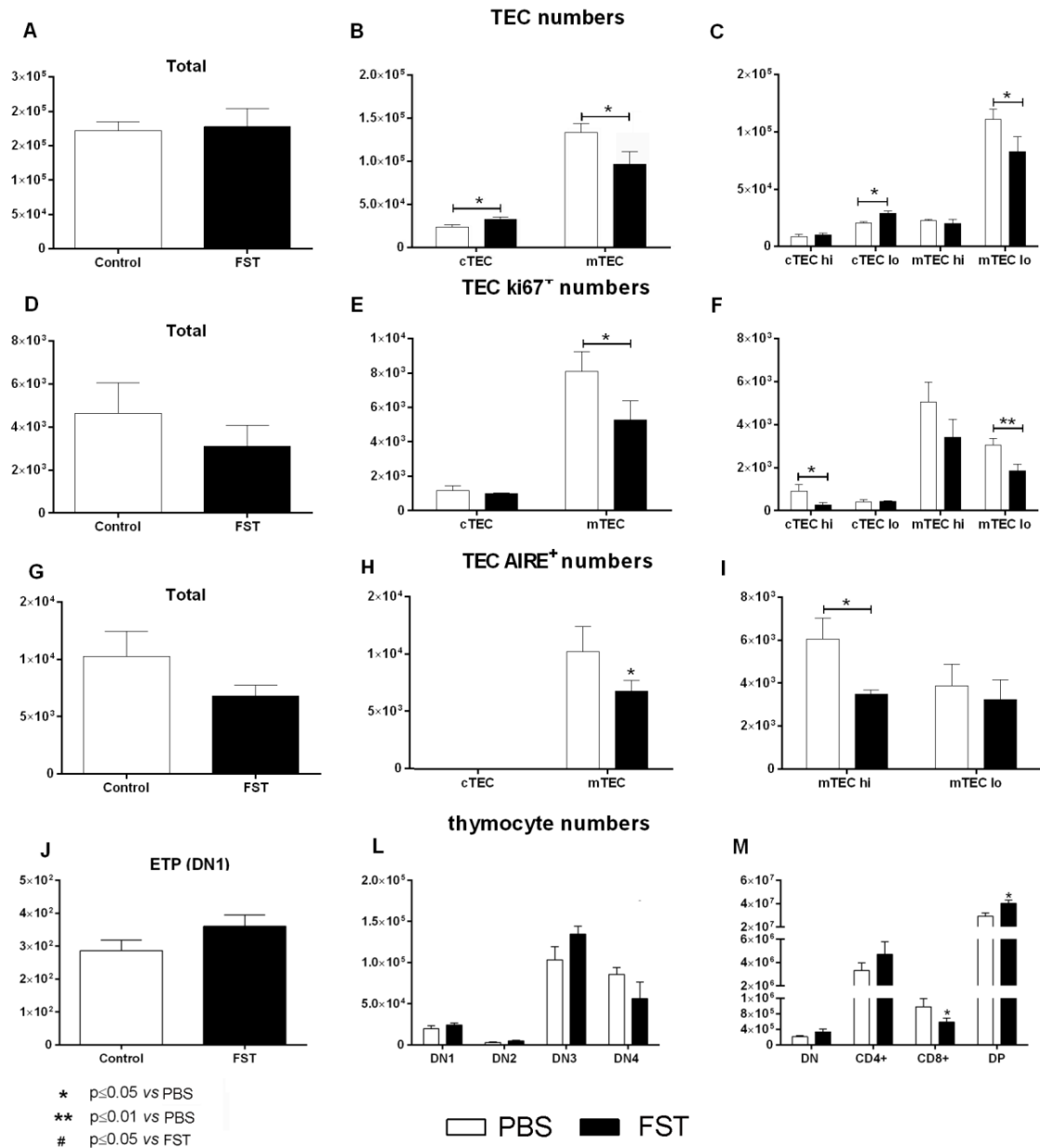
Cx7 que receberam PBS, quando comparado ao respectivo grupo sham, sendo que FST inibiu essa modulação (Fig. 4.16N). As variações observadas em mTEC AIRE<sup>+</sup> (Fig. 4.18O) e mTEC hi AIRE<sup>+</sup> (Fig. 4.18P) são as mesmas de mTEC ki67<sup>+</sup> e mTEC hi ki67<sup>+</sup>, respectivamente, com exceção de que a administração de FST não inibe o aumento de mTEC AIRE<sup>+</sup> observado em Cx7. O total de células mTEC lo AIRE<sup>+</sup> não é alterado por castração ou administração de FST (Fig. 4.18Q).

A análise do potencial progenitor dentro da população de cTEC lo demonstra que embora a depleção de hormônios sexuais não gere alteração dos valores totais das diferentes subpopulações (Fig. 4.19A-C), resulta em alteração das proporções de cTEC lo pontualmente em D14, havendo redução da razão de TEPC em animais envelhecidos Cx14 (Fig. 4.19D) bem como da razão de células com potencial intermediário (Fig. 4.19E), enquanto os percentuais de cTEC lo com baixo potencial de TEPC estão reduzidos nesses animais, quando comparado ao respectivo grupo Sham (Fig. 4.19F). A adição de FST por um período de 14 dias restabeleceu os percentuais de TEPC, ao mesmo tempo em que reduziu ainda mais a razão de células cTEC lo intermediárias, demonstrando que a inibição de activina em animais castrados resulta em acúmulo de TEPC, a níveis semelhantes ao observado em animais envelhecidos Sham castrados.

A análise das subpopulações de células T demonstra aumento de ETP, DN (DN1-4), DP, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em Cx7 e Cx14, tanto nos grupos tratados com PBS quanto FST, quando comparados aos respectivos sham (Fig. 4.20A-G). A adição de FST em Cx7 reverte o aumento de ETP, DN1, DN2 e DN4, embora o valor total de DN permaneça inalterado (Fig. 4.20A-F). FST também reduz os números de ETP, DN2 e DN3 em Sh7 (Fig. 4.20A, C e D, respectivamente) e de DN1 em Sh14 (Fig. 4.17B). Tanto o aumento de DN4 quanto de DN totais em Cx14 é revertido com a adição de FST (Fig. 4.20E e F, respectivamente). Da mesma forma, os valores de CD4<sup>+</sup> são restabelecidos aos níveis de sham quando a castração é associada ao tratamento com FST em Cx14 (Fig. 4.20H), embora FST não demonstre nenhum efeito em CD8<sup>+</sup> (Fig. 4.20I). O aumento observado no valor de tímócitos simples positivos mediado por castração está associado à maior proliferação dessas células. Células T CD4<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> (Fig. 4.20J) e CD8<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> (Fig. 4.20L) estão aumentadas em Cx7 e Cx14, tanto nos grupos tratados com PBS quanto FST. Entretanto, FST não influencia no número de células CD4<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> (Fig. 4.20J), embora o total

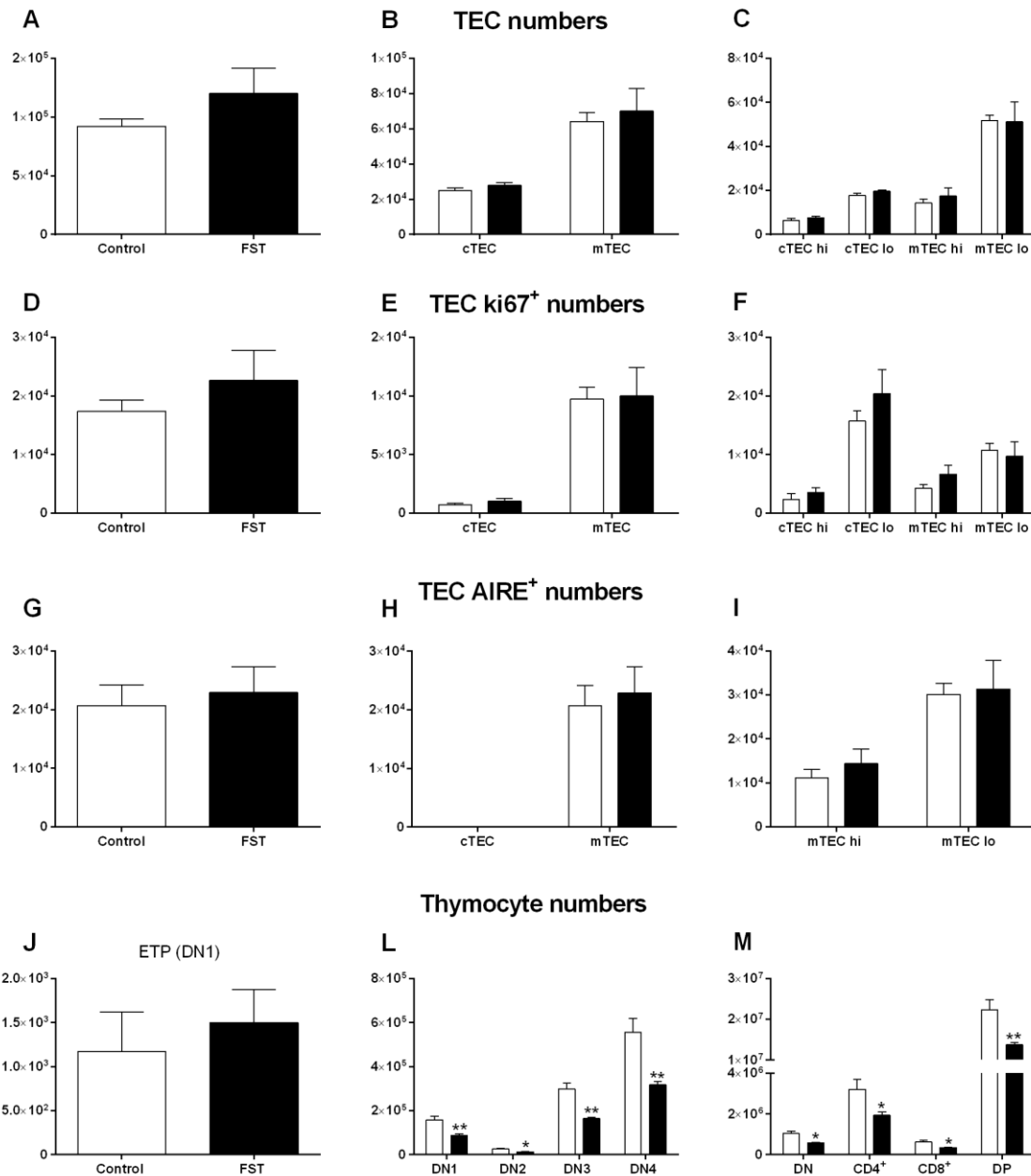
de tímócitos CD4<sup>+</sup> esteja reduzido nessas condições, sugerindo aumento de seleção negativa mediado por FST.

Uma vez que a expressão de DLL4 em cTEC tem sido amplamente reportada como fundamental para o desenvolvimento de células T, analisamos uma possível participação de DLL4 no restabelecimento do timo senil pós castração através da análise da expressão desse ligante nas diferentes subpopulações de cTEC. O envelhecimento gera redução do número de células expressando DLL4<sup>+</sup> em todos os grupos de cTEC analisados (Fig. 4.21A, C e E). A redução do total de cTEC DLL4<sup>+</sup> observada em animais envelhecidos é revertida em Cx7 e Cx14, somente no grupo tratado com PBS (Fig. 4.21B), enquanto a administração de FST reverte o aumento de cTEC DLL4<sup>+</sup> observado em Cx14 em direção aos níveis de Sh14 (Fig. 4.21B). Os valores de cTEC hi DLL4<sup>+</sup> também foram aumentados em Cx7 e Cx14, em ambos os grupos que receberam PBS e FST, quando comparados aos respectivos Sham (Fig. 4.21D). Entretanto, o tratamento com FST reduziu o número de cTEC hi DLL4<sup>+</sup> somente em Cx14 (Fig. 4.21C). Nenhuma variação foi observada no total de cTEC lo DLL4<sup>+</sup> (Fig. 4.21F) após castração, embora FST tenha levado à redução de cTEC lo DLL4<sup>+</sup> em Cx14. Esses dados demonstram que o aumento de activina resultante da depleção de hormônios sexuais restabeleça a timopoiese em parte por aumentar a expressão de DLL4 por cTEC.



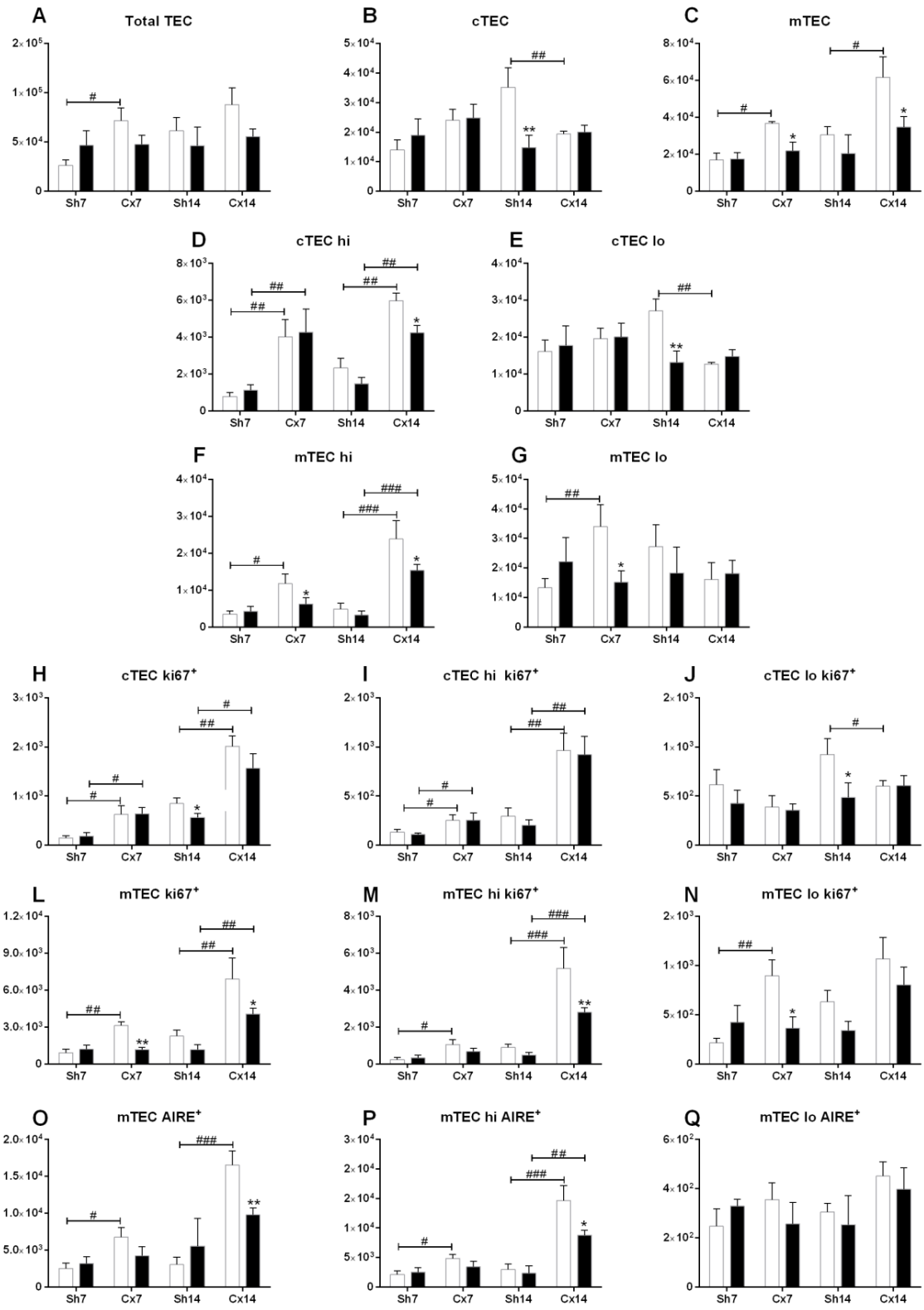
**Figura 4.16** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67<sup>+</sup>, TEC AIRE<sup>+</sup> e timócitos obtidas de camundongos jovens tratados durante 7 dias com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). **(A)** TEC total, **(B)** cTEC e mTEC, **(C)** cTEC hi, cTEC lo, mTEC hi e mTEC lo, **(D)** total de TEC ki67<sup>+</sup>, **(E)** cTEC ki67<sup>+</sup> e mTEC ki67<sup>+</sup>, **(F)** cTEC hi ki67<sup>+</sup>, cTEC lo ki67<sup>+</sup>, mTEC hi ki67<sup>+</sup> e mTEC lo ki67<sup>+</sup>, **(G)** total de TEC AIRE<sup>+</sup>, **(H)** cTEC AIRE<sup>+</sup> e mTEC AIRE<sup>+</sup>, **(I)** mTEC hi ki67<sup>+</sup>, mTEC lo ki67<sup>+</sup>, **(J)** progenitores primários de células T (ETP), analisados dentro de DN1, **(L)** supopulações de células duplo negativas DN1, DN2, DN3 e DN4 e **(M)** subpopulações de timócitos DN, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e DP. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.





**Figura 4.17** Valores totais das diferentes subpopulações de TEC, TEC ki67<sup>+</sup>, TEC AIRE<sup>+</sup> e timócitos obtidas de camundongos jovens tratados durante 14 dias com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). **(A)** TEC total, **(B)** cTEC e mTEC, **(C)** cTEC hi, cTEC lo, mTEC hi e mTEC lo, **(D)** total de TEC ki67<sup>+</sup>, **(E)** cTEC ki67<sup>+</sup> e mTEC ki67<sup>+</sup>, **(F)** cTEC hi ki67<sup>+</sup>, cTEC lo ki67<sup>+</sup>, mTEC hi ki67<sup>+</sup> e mTEC lo ki67<sup>+</sup>, **(G)** total de TEC AIRE<sup>+</sup>, **(H)** cTEC AIRE<sup>+</sup> e mTEC AIRE<sup>+</sup>, **(I)** mTEC hi ki67<sup>+</sup>, mTEC lo ki67<sup>+</sup>, **(J)** progenitores primários de células T (ETP), analisados dentro de DN1, **(L)** subpopulações de células duplo negativas DN1, DN2, DN3 e DN4 e **(M)** subpopulações de timócitos DN, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e DP. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.

### TEC numbers



# p ≤ 0.05 vs respective Sh    \* p ≤ 0.05 vs PBS  
 ## p ≤ 0.01 vs respective Sh    \*\* p ≤ 0.01 vs PBS  
 ### p ≤ 0.001 vs respective Sh

□ PBS    ■ FST

Figura 4.18 Valores totais de TEC, TEC ki67<sup>+</sup> e mTEC AIRE<sup>+</sup> em camundongos envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise (7 ou 14 dias) com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). (A) TEC total, (B) cTEC, (C) mTEC, (D) cTEC hi, (E) cTEC lo, (F) mTEC hi, (G) mTEC lo, (H) cTEC total ki67<sup>+</sup>, (I) cTEC hi ki67<sup>+</sup>, (J) cTEC lo ki67<sup>+</sup>, (L) mTEC total ki67<sup>+</sup>, (M) mTEC hi ki67<sup>+</sup>, (N) mTEC lo ki67<sup>+</sup>, (O) mTEC total AIRE<sup>+</sup>, (P) mTEC hi AIRE<sup>+</sup> e (Q) mTEC lo AIRE<sup>+</sup>. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.

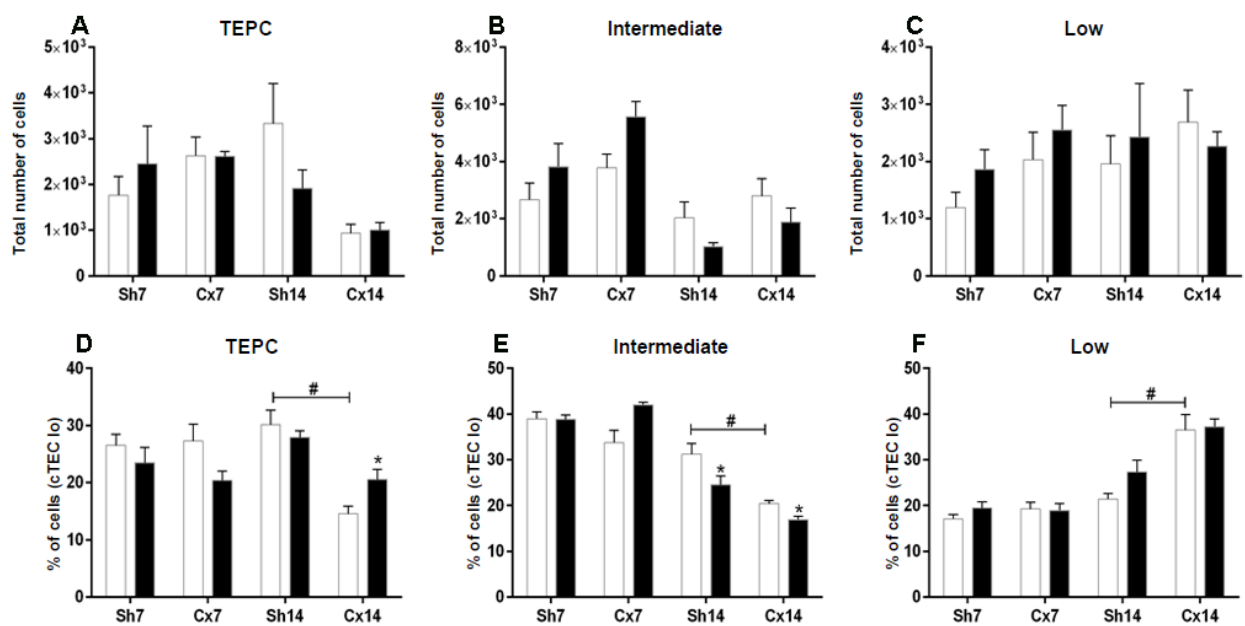
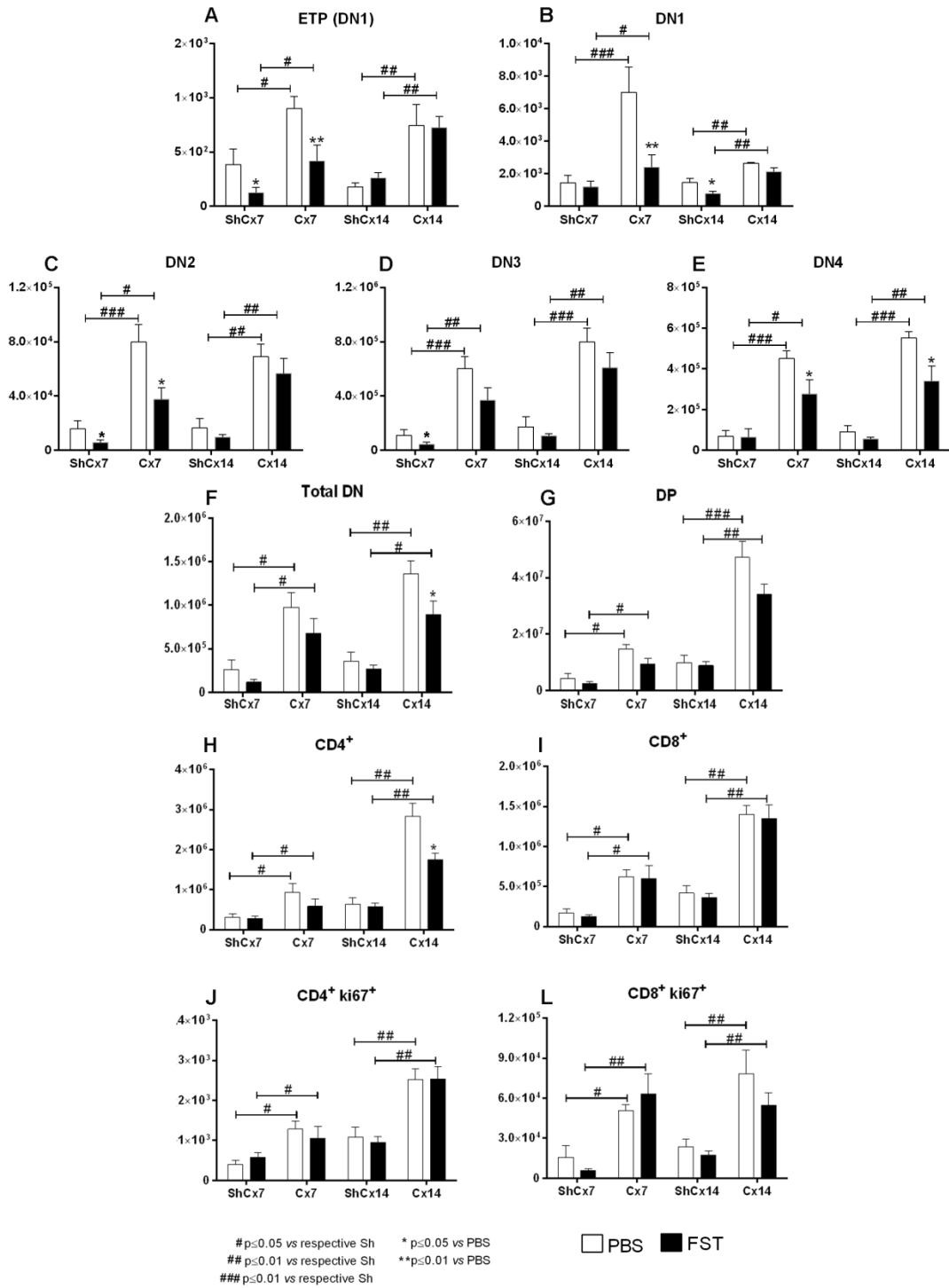


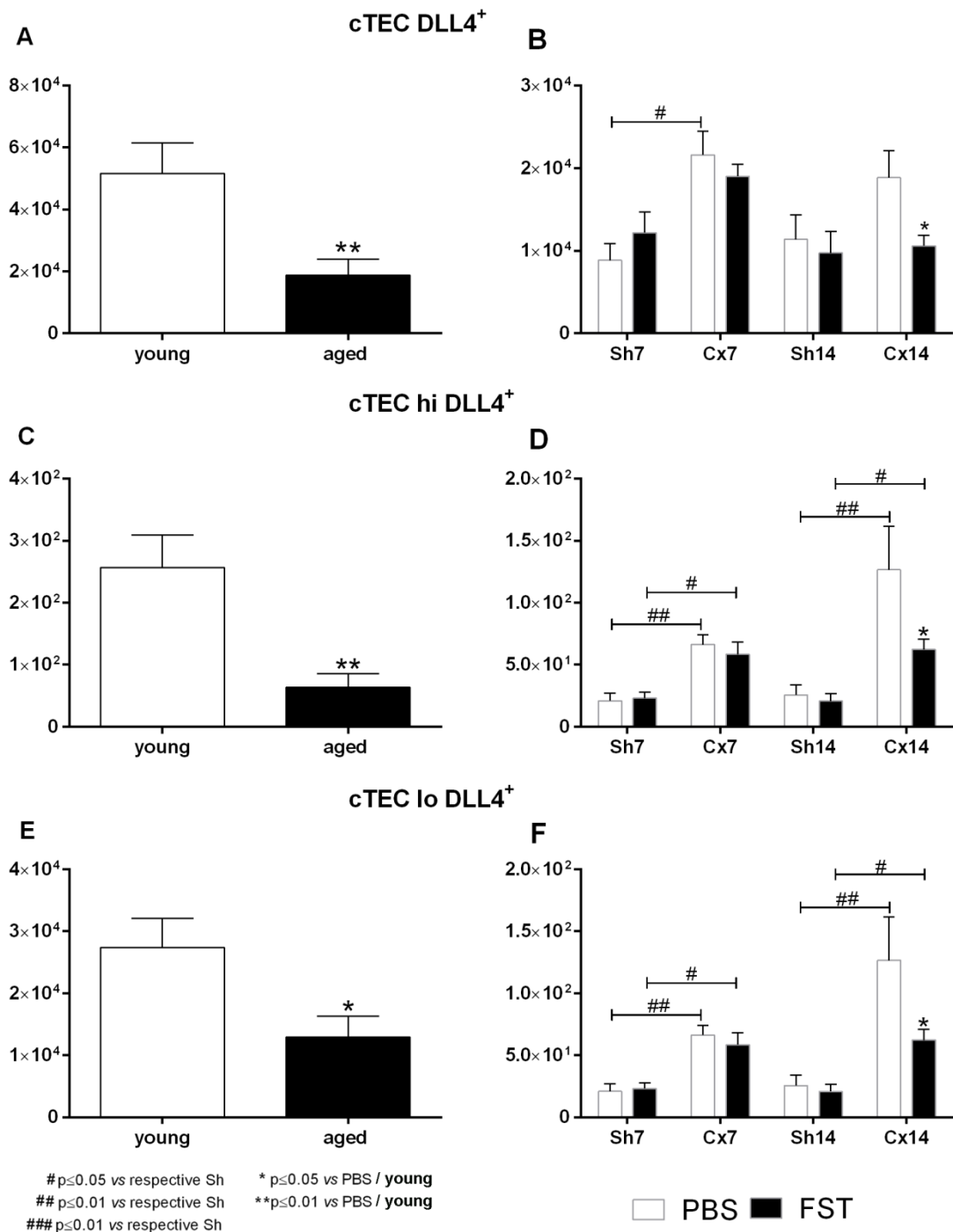
Figura 4.19 Valores de células cTEC lo classificadas como TEPC, potencial intermediário (Intermediate) e baixo potencial de TEPC (Low) em camundongos envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise (7 ou 14 dias) com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). Valores totais de (A) TEPC, (B) células intermediárias e (C) células com baixo potencial de TEPC. Valores percentuais, analisados dentro da população de cTEC lo, de (D) TEPC, (E) células intermediárias e (F) células com baixo potencial de TEPC.

## Thymocyte numbers



**Figura 4.20** Valores totais de timócitos e timócitos ki67<sup>+</sup> em camundongos envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise (7 ou 14 dias) com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). (A) progenitores primários de células T (ETP), analisados dentro de DN1. Supopulações de células duplo negativas (B) DN1, (C) DN2, (D) DN3 e (E) DN4.

Subpopulações de timócitos **(F)** DN total, **(G)** DP, **(H)** CD4<sup>+</sup> e **(I)** CD8<sup>+</sup>. Total de células T proliferativas **(J)** CD4<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> e **(L)** CD8<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup>. Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.



**Figura 4.21** Valores totais de TEC DLL4<sup>+</sup> em animais jovens e envelhecidos sem tratamento, bem como envelhecidos castrados (Cx) e sham castrados (ShCx) analisados nos dias 7 ou 14 após castração e tratados entre o período da cirurgia e análise (7 ou 14 dias) com folistatina *i.p.* (FST, barra preta) ou PBS como controle (barra branca). Total de **(A)** cTEC DLL4<sup>+</sup> em animais jovens e

envelhecidos não tratados, **(B)** cTEC DLL4<sup>+</sup>em animais envelhecidos castrados ou Sham, **(C)**cTEC hi DLL4<sup>+</sup>em animais jovens e envelhecidos não tratados, **(D)** cTEC hi DLL4<sup>+</sup>em animais envelhecidos castrados ou Sham, **(E)**cTEC lo DLL4<sup>+</sup>em animais jovens e envelhecidos não tratados, **(F)** cTEC lo DLL4<sup>+</sup>em animais envelhecidos castrados ou Sham,Os valores representados referem-se a celulariedade em 1 lobo tímico.

## 5 DISCUSSÃO

As abordagens atuais para extensão da vida útil objetivam a redução da morbidade associada ao envelhecimento através da manutenção de todos os órgãos a níveis ótimos. Entretanto, em pessoas saudáveis de meia idade, enquanto a maioria dos órgãos está funcionalmente intacta, o timo já se apresenta amplamente disfuncional. Conseqüentemente, o envelhecimento do timo precede as manifestações de imunosenescência e morbidades associadas, tornando o desenvolvimento de técnicas voltadas para o retardo desse processo através do restabelecimento da função tímica uma prioridade em estudos voltados para a melhora da expectativa de vida de indivíduos com idade avançada. Enquanto múltiplos mecanismos podem contribuir para a atrofia tímica senil, a correlação temporal do declínio tímico com a puberdade tem apontado um papel-chave de esteróides sexuais. A depleção de hormônios sexuais, tanto cirúrgica quanto química, gera o restabelecimento do timo (116, 117) e da função de células T (118) em modelos experimentais murinos de senescência, além de estimular o aumento de células T CD4<sup>+</sup> derivadas do timo em indivíduos idosos do sexo masculino (87). Os receptores de andrógenos são expressos no epitélio tímico (94) e embora sejam conhecidas as subpopulações de tímócitos específicas afetadas durante a atrofia mediada por hormônios sexuais andrógeno (41), o mecanismo pelo qual a ativação de receptores expressos no estroma tímico resulta na redução da timopoiese ainda permanece em questão. Nesse sentido, a inibição da comunicação entre TEC e tímócitos em desenvolvimento parece ser um fator de contribuição essencial tanto para o comprometimento da estrutura epitelial durante o envelhecimento quanto do desenvolvimento intratímico de células T(69).

Os dados aqui apresentados demonstram que a redução de TEC observada durante o envelhecimento é proporcional à diminuição do número total tímócitos, enquanto a depleção de hormônios sexuais, através da técnica de castração, induz aumento do compartimento linfóide tímico simultaneamente à expansão de TEC em D4. Entretanto, embora o aumento de tímócitos seja progressivo e culmine em D28 enquanto o total de TEC apresenta dois únicos aumentos pontuais em D4 e após 4,5 meses seguintes à castração, a análise específica dentro das diferentes subpopulações de TEC revela uma contínua e inversa modulação entre cTEC e

mTEC ao longo dos diferentes dias analisados. A razão de TEC com alta expressão de MHCII para TEC com baixa expressão (TEC hi : TEC lo) diminui gradualmente com a idade e é revertida com a castração. Conforme já reportado, a interação com timócitos é necessária para o aumento da expressão de MHCII por TEC durante o desenvolvimento (119) e, portanto, o aumento da razão de TEC lo deve refletir os níveis reduzidos de timopoiese de animais senis. Especificamente, os totais de cTEC hi, mTEC lo e mTEC hi estão reduzidos com o envelhecimento e apresentam aumento após castração. Por outro lado, os dados aqui apresentados demonstram que as células cTEC lo, principais constituintes do epitélio cortical, contrariamente se acumulam com o envelhecimento e são reduzidas após castração.

De acordo com a teoria de que células progenitoras epiteliais tímicas estão contidas dentro da população de cTEC lo, observamos aumento da razão de células TEPC no timo senil simultâneo à redução de células com potencial intermediário, indicando um acúmulo de células progenitoras no timo de animais envelhecidos, enquanto a castração resulta em progressiva redução de células TEPC, indicando que células progenitoras estejam sendo mobilizadas para o restabelecimento do microambiente tímico desses animais. A identificação fenotípica da população de células progenitoras de epitélio tímico em camundongos adultos foi recentemente realizada dentro da população de cTEC lo (43), permitindo um novo campo de exploração e desenvolvimento de terapias voltadas para o rejuvenescimento tímico. Embora relativamente quiescentes *in vivo*, TEPC do timo adulto demonstram significativa formação de colônia *in vitro*, capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagem cortical e medular. Adicionalmente, nossos resultados indicam que a flutuação das subpopulações de TEC refletem as variações observadas no número de células proliferativas. Esses dados corroboram com os previamente apresentados por Gray et al. que pioneiramente demonstrou que a população de TEC é dinâmica, apresentando reduzida capacidade de proliferação e aumento dos percentuais de apoptose em animais envelhecidos (120). Adicionalmente à redução da proliferação, demonstramos aqui que as alterações observadas no compartimento epitelial durante a atrofia tímica senil também resultam da baixa diferenciação de mTEC a partir de células progenitoras. O aumento de células mTEC lo pós castração ocorre anteriormente ao de mTEC lo ki67<sup>+</sup>, sugerindo que essas células possam estar se diferenciando a partir de cTEC lo, embora o efeito da proliferação também pareça atuar nas fases mais tardias para



o restabelecimento dessa subpopulação. Além das alterações quantitativas, a castração também restabelece a qualidade de TEC, como observado pelo aumento de mTEC AIRE<sup>+</sup>, com baixa e alta expressão de MHCII.

Trabalhos recentes têm demonstrado a importância de FoxN1 e seu regulador Wnt4 para o restabelecimento da atrofia tímica senil. A expressão de FoxN1 é necessária para a diferenciação de toda a rede de TEC a partir de TEPC e colonização do rudimento tímico por precursores derivados da medula óssea (121). Bredenkamp et al. demonstrou que a indução de FoxN1 durante o envelhecimento resulta em robusta recuperação do timo, caracterizada por aumento do número de tímocitos e maior número de emigrantes tímicos recentes para a periferia (32). Os dados aqui apresentados demonstram que embora a expressão de FoxN1 e Wnt4 não esteja alterada em cTEC de animais envelhecidos, a depleção de hormônios sexuais induz aumento inicial de ambos os fatores de transcrição em cTEC, especificamente em cTEC lo, observado em D4. Por outro lado, ocorre aumento de Wnt4 em mTEC de animais envelhecidos revertido nas fases mais tardias pós castração, embora a expressão de FoxN1 permaneça a mesma, demonstrando que a castração afeta de forma diferenciada as subpopulações de TEC. Adicionalmente, demonstramos aumento de DLL4 em cTEC lo obtidas de animais envelhecidos castrados. Por se ligar e ativar a via de Notch em tímocitos, DLL4 é necessário para o desenvolvimento de células T. De acordo com um estudo recentemente publicado, um dos mecanismos através do qual os esteroides sexuais geram redução da timopoiese é através da inibição direta da expressão de DLL4 em cTEC(122). Esses dados corroboram nossos achados, embora também observemos um aumento anormal desse ligante em mTEC de animais envelhecidos, acentuado após castração especificamente em mTEC lo. É importante ressaltar que o aumento de FoxN1, Wnt4 e DLL4 ocorre em cTEC lo precisamente em D4, e portanto simultaneamente ao aumento dos números de mTEC lo e tímocitos totais e anteriormente à expansão de TEC com alta expressão de MHCII, sugerindo que a ativação de cTEC lo esteja associada à regeneração do timo pós castração.

A análise por microarranjo gênico nos permitiu verificar uma modulação contrária do transcriptoma de TEC obtidas de animais envelhecidos quando comparados a animais jovens. Dentre os genes afetados pelo envelhecimento identificamos 495 genes cuja a expressão em TEC é restabelecida após castração ao nível de animais jovens. Especificamente, dentre os 31 genes que identificamos

cuja expressão encontra-se aumentada durante a senescência está a folistatina (FST), sendo cTEC e fibroblastos as principais células estromais a expressar esse gene no timo senil, como revelado por qPCR. FST, também conhecida como proteína ligadora de activina, é uma glicoproteína de ação autócrina e expressão ubíqua, que liga e bionutraliza activina (123). A castração resulta em redução progressiva da expressão de FST por todas as células do estroma tímico, inicialmente em cTEC e endotélio a partir de D4 e tardiamente de mTEC e fibroblastos em D10. Paralelamente ao aumento de FST é observado aumento da expressão de activina  $\beta$ A por mTEC e fibroblastos de animais envelhecidos, embora um aumento adicional em aproximadamente 10 vezes ocorra em fibroblastos a partir de D2 acompanhado por cTEC em D10. Uma vez que FST inibe activina, esses resultados demonstram que a disponibilidade de activina  $\beta$ A livre está reduzida no córtex e aumentada na medular do timo de animais envelhecidos enquanto a castração parece restabelecer a ação desse peptídeo no córtex tímico. Activina são membros da superfamília de fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que participa na regulação de diversos processos biológicos, incluindo diferenciação e proliferação celular. Dentro os diferentes isotipos de activina, a participação de activina  $\beta$ A, cuja expressão no timo é restrita a células do microambiente (113), é a mais significativa na regulação desses processos. A maior disponibilidade de activina no córtex tímico de animais castrados parece afetar diretamente células cTEC lo, uma vez que a expressão dos receptores de activina Acvr1a, Acvr2a e Acvr2b está aumentada nessa subpopulação em D4. Muitos dos estudos de imunologia têm focado no papel de activina  $\beta$ A porque divide uma via de sinalização comum com TGF- $\beta$ , embora atuem em receptores diferentes. TGF- $\beta$  é considerado um crítico regulador da imunidade mediada por célula T, regulando o desenvolvimento de linfócitos T, homeostase periférica e tolerância a antígenos próprios (124). Embora o papel de activina na imunobiologia dessas células tenha sido menos explorado, recentemente foi reportado que a expressão de componentes de sinalização da via de activina no timo murino influencia diferentes etapas da timopoiese, promovendo diferenciação de DN3 para DN4 ao mesmo tempo em que reduz a transição para DP (113, 114). Além disso, activina promove diferenciação de células T CD8<sup>+</sup>, sugerindo um papel potencial no cometimento de timócitos em desenvolvimento com essa linhagem (115). Entretanto, até o presente momento, nada é sabido em relação a participação desse peptídeo no desenvolvimento e manutenção do microambiente

tímico. Uma vez que o aumento de sinalização de activina observado após quatro dias de castração em cTEC lo ocorre concomitantemente com o aumento da expressão de FoxN1, Wnt4 e DLL4, é possível que exista uma interação dessas vias para o restabelecimento da atrofia tímica senil.

A análise de camundongos adultos com inibição parcial da expressão de activina (heterozigotos, HET) demonstra deficiência no desenvolvimento de células mTEC. Particularmente, tanto mTEC hi quanto mTEC lo estão reduzidas nos timos HET, embora somente a proliferação de mTEC lo esteja diminuída nesses animais enquanto o número de mTEC hi ki67<sup>+</sup> permanece o mesmo, demonstrando que a deficiência da sinalização de activina gera redução da formação de células mTEC hi a partir de mTEC lo. De acordo, o total de células medulares maduras AIRE<sup>+</sup> está diminuído nos timos de animais HET. Embora o total de TEPC não esteja alterado no timo desses animais, a redução da sinalização de activina  $\beta$ A resulta em aumento dos percentuais de cTEC lo ao mesmo tempo em que reduz células com potencial intermediário de TEPC, demonstrando que da mesma forma como observado em animais envelhecidos, a depleção de activina resulta em acúmulo de TEPC. Uma vez que animais com deficiência total de activina  $\beta$ A morrem poucas horas após o nascimento por deficiência respiratória, analisamos o efeito da ausência total da sinalização de activina em embriões E14.5, estágio embrionário no qual o timo já se encontra bem estabelecido e com distinção completa do compartimento cortical e medular. Observamos que tanto o bloqueio total (KO) quanto parcial (HET) de activina durante a embriogênese resulta em redução dos números de cTEC e mTEC com baixa expressão de MHCII, embora os valores de mTEC hi também estejam reduzidos em embriões KO. Curiosamente, os números de timócitos totais estão aumentados em embriões com total ausência de activina, embora as células ETP estejam reduzidas, sugerindo uma ação direta de activina sobre a proliferação de timócitos em desenvolvimento. De fato, estudos anteriores demonstraram que activina  $\beta$ A inibe a ativação e proliferação de timócitos maduros e células T circulantes (125, 126). Consistente com sua homologia a TGF- $\beta$ , activina tem sido amplamente demonstrada como potente inibidora da inflamação e imunidade, embora também em alguns casos possa agir de forma contrária, estimulando a atividade celular, como por exemplo, induzindo a proliferação de fibroblastos e células germinais *in vitro* (126, 127). Uma vez que os números de cTEC hi estão inalterados tanto em camundongos adultos quanto em embriões com

deficiência de activina, nossos dados demonstram que activina não influencia na geração de cTEC hi, embora pareça afetar diretamente o desenvolvimento de mTEC a partir de cTEC lo. De fato, a análise de cultura 3D realizadas a partir de células cTEC lo isoladas de camundongos jovens ou envelhecidos demonstra que a inibição da sinalização de activina em culturas de células jovens tratadas com anticorpo neutralizador do peptídeo resulta em diminuição da diferenciação de mTEC enquanto, por outro lado, a adição de activina à culturas estabelecidas a partir de cTEC lo de camundongos envelhecidos gera aumento dos percentuais de mTEC. É interessante notar que a adição de activina à cultura senil restabeleceu o perfil de diferenciação de mTEC observado em cultura de células jovens não tratadas (respectivamente  $45\pm 9,5\%$  e  $49\pm 3,9\%$ ), enquanto culturas jovens tratadas com anti-activina apresentam percentuais de mTEC semelhante ao estabelecido com cTEC lo de animais envelhecidos (respectivamente  $18\pm 3,4\%$  e  $27\pm 8,1\%$ ). A análise específica de células TEPC dentro de cTEC lo demonstra que a o aumento da formação de mTEC em culturas de células envelhecidas tratadas com activina está associado à mobilização de células progenitoras.

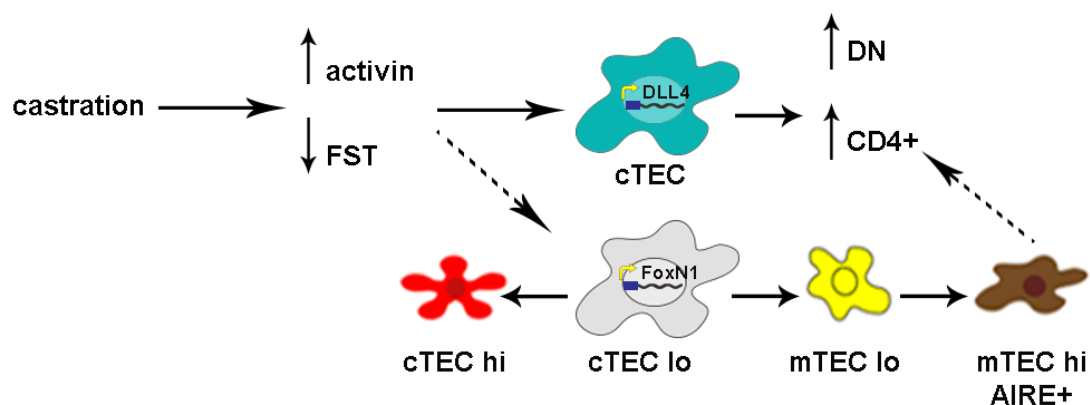
As alterações promovidas por activina no microambiente tímico gera redução do desenvolvimento de timócitos de forma independente da disponibilidade de progenitores pela medula óssea. Camundongos atímicos “*nudes*” transplantados com FTOC de embriões KO para activina apresentam redução da geração de timócitos DN, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no enxerto. Os números de DN e CD4<sup>+</sup> também estão alterados em enxertos de FTOC obtidos de embriões HET, embora não os de CD8<sup>+</sup>, demonstrando que timócitos DN e CD4<sup>+</sup> são mais sensíveis a variações do circuito local de activina do que CD8<sup>+</sup>. De acordo, somente a redução de células T CD4<sup>+</sup> é observada no baço de camundongos KO enquanto os números de CD8<sup>+</sup> permanecem os mesmo de WT. Curiosamente, os valores de DP não estão alterados nos enxertos tímicos HET ou KO, apesar da redução em DN, sugerindo que a inibição da sinalização local de activina estimule o aumento de diferenciação DP a partir de DN, o que está de acordo com dados anteriores que demonstram que a adição de activina *in vitro* diminui a diferenciação de DN em DP (115). Por outro lado, a redução de timócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> observada em HETe KO ocorre de forma independente à mobilização de DP. Um estudo anterior demonstrou que somente timócitos simples positivos (SP) e DN expressam pSmad2, mas não DP, o que está associado à baixa expressão de Acvr1a e Acvr2a nessa subpopulação, tornando

células DP arresponsivas à sinalização por activina (113). A análise histológica revela redução da expressão de UEA-1 em enxertos tímicos KO, indicando que a ausência de activina altere o desenvolvimento do compartimento epitelial medular tímico, e conseqüentemente a capacidade do timo em sustentar o desenvolvimento de tímócitos maduros SP CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, embora os níveis de DP permaneçam os mesmos.

O tratamento de camundongos jovens com FST durante 7 dias gerou um perfil de TEC diferente ao observado quando activina foi depletada desde a fase embrionária, porém semelhante ao de animais idosos, com acúmulo de cTEC lo e redução de mTEC lo. A inibição da via de activina na fase adulta resulta em acúmulo de cTEC lo que parece ser conseqüente da inibição da diferenciação dessas células em mTEC lo, uma vez que o número de cTEC lo ki67<sup>+</sup> permanece inalterado. Interessantemente, a administração prolongada de FST por um período de 14 dias não resultou em alterações no compartimento epitelial, sugerindo uma capacidade intrínseca de regeneração do timo jovem mediante à inibição prolongada da sinalização de activina, bem como um mecanismo de resistência aos efeitos de FST, o que poderia ser explicado por um aumento da expressão dos receptores de activina nessas células. Entretanto, todas as populações de tímócitos encontram-se reduzidas nos timos desses animais, indicando que as alterações no compartimento epitelial observada nas fases iniciais do tratamento com FST tenham resultado no deficiente desenvolvimento de todas as populações de tímócitos, da mesma forma como observado em animais idosos(41).

Os resultados obtidos através da administração de FST em camundongos envelhecidos castrados demonstram que o aumento de activina promovido por castração é necessário para o restabelecimento das subpopulações de cTEC hi, mTEC hi e mTEC lo, o que parece ser dependente da maior indução de proliferação dessas células, embora um aumento de diferenciação a partir de cTEC lo induzido por activina não possa ser excluído. De fato, a administração de FST em animais idosos castrados gera aumento dos percentuais de TEPC em direção aos níveis de animais envelhecidos não castrados, ao mesmo tempo em que gera redução no total de cTEC hi e mTEC hi, respectivamente em Cx14 e Cx7, embora os números de células proliferativas permaneçam inalterados nesses pontos. Juntos, esses resultados sugerem que o bloqueio de activina em animais castrados inibe o amadurecimento de TEC e por conseqüente o restabelecimento da expressão de

MHCII em animais idosos castrados, tanto no compartimento cortical quanto medular. De acordo, o total de mTEC AIRE<sup>+</sup> está reduzido em animais castrados tratados com FST. O total de ETP, DN e CD4<sup>+</sup> também estão reduzidos nesses animais, embora a proliferação de células CD4<sup>+</sup> seja a mesma, mais uma vez indicando um aumento de deleção clonal associado à desregulação da expressão de AIRE resultante da inibição de activina. Uma vez que a expressão de DLL4 pelo compartimento epitelial é necessária para a diferenciação de progenitores hematopoiéticos através da indução da sinalização de Notch nessas células (52), e que já está reportado que a inibição de hormônios sexuais aumenta a timopoiese via modulação da expressão de Notch (122), a inibição do aumento da expressão de DLL4 em ambas as subpopulações de cTEC de animais castrados após tratamento com FST demonstra um claro mecanismo através do qual o aumento de activina induzido por castração esteja associado ao restabelecimento da timopoiese em animais envelhecidos (Fig. 5.1).



**Figura 5.1 Esquema sugestivo representando o mecanismo pelo qual a castração recupera a atrofia tímica senil.** A depleção de hormônios sexuais gera aumento da síntese de activina ao mesmo tempo em que reduz os níveis de FST no timo de animais idosos, resultando em maior expressão de DLL4 por cTEC e do total de timócitos DN e CD4<sup>+</sup>. O aumento da razão activina/FST é necessário para o restabelecimento de células cTEC hi, mTEC lo e mTEC hi AIRE<sup>+</sup> pós castração, um mecanismo que parece estar associado ao aumento de FoxN1 em cTEC lo de animais castrados e à indução da formação de mTEC a partir de cTEC lo por activina. O restabelecimento de mTEC AIRE<sup>+</sup> está associado ao aumento de células T CD4<sup>+</sup> em animais castrados.

## 6 CONCLUSÃO

O rejuvenescimento do sistema imunológico pode ser alcançado por terapias voltadas para o restabelecimento do timo. Tal como em outros tecidos epiteliais, o timo pós-natal parece preservar uma capacidade intrínseca de regeneração por responder a estímulos externos, tais como depleção de esteróides sexuais e administração de citocinas. Em particular, a recuperação do compartimento da TEC é um fator determinante para o restabelecimento sustentado de timopoiese. As abordagens atuais concentram-se na modulação de fatores de crescimento e hormonais secretados por TEC e, por conseguinte, apenas promovem uma recuperação parcial e transitória do timo. A recente identificação de marcadores de células epiteliais progenitoras e do seu padrão de expressão no timo adulto é um passo importante para a análise do potencial prospectivo de TEPCs bem como no estabelecimento de estratégias de regeneração tímica. O surgimento de novas estratégias baseadas na recuperação do TEC, como a ativação TEPC, consiste em uma nova geração de intervenções terapêuticas focadas no restabelecimento de TEC. Em particular, nossos dados demonstram pioneiramente a existência de TEPCs em camundongo envelhecidos que são mobilizadas para a recuperação do compartimento epitelial e consequente aumentada timopoiese após depleção de hormônios sexuais. Além da caracterização dessas células, identificamos a via de activina  $\beta A$  como um importante mediador desse processo, o que foi conseguido tanto através de ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo* quanto através da análise do timo de camundongos geneticamente depletados de activina  $\beta A$  ou tratados com folistatina. Além de modular a diferenciação de TEC a partir de um progenitor comum, activina influencia na qualidade dessas células, sendo necessária para o restabelecimento de cTEC DLL4<sup>+</sup> e mTEC AIRE<sup>+</sup> após castração. A identificação da via de activina como um importante mediador da regeneração tímica de animais envelhecidos consequente à depleção de hormônios sexuais permite o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas para o restabelecimento do desenvolvimento de células T no timo senil e com redução dos efeitos colaterais resultantes da depleção de testosterona, como queda de desempenho sexual e depressão.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends in immunology*. 2004 Apr;25(4):210-7. PubMed PMID: 15039048.
2. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Advances in immunology*. 2008;99:59-94. PubMed PMID: 19117532.
3. Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *Journal of clinical immunology*. 2000 Jul;20(4):250-6. PubMed PMID: 10939712.
4. Dixit VD. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Current opinion in immunology*. 2010 Aug;22(4):521-8. PubMed PMID: 20650623. Pubmed Central PMCID: 2993497.
5. von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Advances in immunology*. 2004;84:201-38. PubMed PMID: 15246254.
6. von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, et al. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunological reviews*. 2003 Feb;191:62-78. PubMed PMID: 12614352.
7. Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology*. 2007;25:649-79. PubMed PMID: 17291187.
8. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends in immunology*. 2002 Jun;23(6):305-13. PubMed PMID: 12072370.
9. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Jun;75(6):951-61. PubMed PMID: 15020651.
10. Savino W, Smaniotto S, Binart N, Postel-Vinay MC, Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 May;992:179-85. PubMed PMID: 12794057.



11. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology*. 2001 Nov;2(11):1032-9. PubMed PMID: 11600886.
12. Hiramane C, Nakagawa T, Miyauchi A, Hojo K. Thymic nurse cells as the site of thymocyte apoptosis and apoptotic cell clearance in the thymus of cyclophosphamide-treated mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996 Aug;75(2):185-201. PubMed PMID: 8765319.
13. Derbinski J, Kyewski B. Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. *Trends in immunology*. 2005 Oct;26(10):503-6. PubMed PMID: 16039157.
14. Mathis D, Benoist C. A decade of AIRE. *Nature reviews Immunology*. 2007 Aug;7(8):645-50. PubMed PMID: 17641664.
15. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology*. 2010 Jan;11(1):7-13. PubMed PMID: 20016504.
16. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Sep 1;198(5):757-69. PubMed PMID: 12953095. Pubmed Central PMCID: 2194183.
17. Dresch C, Ackermann M, Vogt B, de Andrade Pereira B, Shortman K, Fraefel C. Thymic but not splenic CD8(+) DCs can efficiently cross-prime T cells in the absence of licensing factors. *European journal of immunology*. 2011 Sep;41(9):2544-55. PubMed PMID: 21748731.
18. Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature reviews Immunology*. 2004 Sep;4(9):688-98. PubMed PMID: 15343368.
19. Odaka C, Mizuochi T. Macrophages are involved in DNA degradation of apoptotic cells in murine thymus after administration of hydrocortisone. *Cell death and differentiation*. 2002 Feb;9(2):104-12. PubMed PMID: 11840161.
20. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*. 2000 Jan 15;14(2):142-6. PubMed PMID: 10702024.
21. Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mechanisms of development*. 1996 Jun;57(1):3-20. PubMed PMID: 8817449.

22. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schuddekopf K, Smith AJ, et al. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science*. 1996 May 10;272(5263):886-9. PubMed PMID: 8629026.
23. Itoi M, Tsukamoto N, Yoshida H, Amagai T. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. *International immunology*. 2007 Aug;19(8):953-64. PubMed PMID: 17625108.
24. Palamaro L, Romano R, Fusco A, Giardino G, Gallo V, Pignata C. FOXP1 in organ development and human diseases. *International reviews of immunology*. 2014 Mar;33(2):83-93. PubMed PMID: 24432845.
25. Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxP1, the gene defective in nude mice. *Nature immunology*. 2002 Nov;3(11):1102-8. PubMed PMID: 12379851.
26. Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3947-53. PubMed PMID: 12920023.
27. Bleul CC, Boehm T. BMP signaling is required for normal thymus development. *Journal of immunology*. 2005 Oct 15;175(8):5213-21. PubMed PMID: 16210626.
28. Tsukamoto N, Itoi M, Nishikawa M, Amagai T. Lack of Delta like 1 and 4 expressions in nude thymus anlagen. *Cellular immunology*. 2005 Apr;234(2):77-80. PubMed PMID: 16095582.
29. Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *European journal of immunology*. 2000 Dec;30(12):3371-9. PubMed PMID: 11093154.
30. Garfin PM, Min D, Bryson JL, Serwold T, Edris B, Blackburn CC, et al. Inactivation of the RB family prevents thymus involution and promotes thymic function by direct control of Foxp1 expression. *The Journal of experimental medicine*. 2013 Jun 3;210(6):1087-97. PubMed PMID: 23669396. Pubmed Central PMCID: 3674705.
31. Lagresle C, Gardie B, Eyquem S, Fasseu M, Vieville JC, Pla M, et al. Transgenic expression of the p16(INK4a) cyclin-dependent kinase inhibitor leads to enhanced apoptosis and differentiation arrest of CD4-CD8- immature thymocytes. *Journal of immunology*. 2002 Mar 1;168(5):2325-31. PubMed PMID: 11859122.

32. Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*. 2014 Apr;141(8):1627-37. PubMed PMID: 24715454. Pubmed Central PMCID: 3978836.
33. Bredenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nature cell biology*. 2014 Sep;16(9):902-8. PubMed PMID: 25150981. Pubmed Central PMCID: 4153409.
34. Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, Anderson G, et al. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *PloS one*. 2010;5(5):e10701. PubMed PMID: 20502698. Pubmed Central PMCID: 2872673.
35. Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, et al. Wnt-4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone-induced senescence. *Rejuvenation research*. 2011 Jun;14(3):241-8. PubMed PMID: 21453014. Pubmed Central PMCID: 3136744.
36. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*. 2007 Feb 9;128(3):445-58. PubMed PMID: 17289566. Pubmed Central PMCID: 2408375.
37. Cordier AC, Heremans JF. Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scandinavian journal of immunology*. 1975;4(2):193-6. PubMed PMID: 1145127.
38. Baik S, Jenkinson EJ, Lane PJ, Anderson G, Jenkinson WE. Generation of both cortical and Aire(+) medullary thymic epithelial compartments from CD205(+) progenitors. *European journal of immunology*. 2013 Mar;43(3):589-94. PubMed PMID: 23299414. Pubmed Central PMCID: 3960635.
39. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*. 2006 Jun 22;441(7096):988-91. PubMed PMID: 16791197.
40. Gray DH, Seach N, Ueno T, Milton MK, Liston A, Lew AM, et al. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3777-85. PubMed PMID: 16896157.
41. Heng TS, Goldberg GL, Gray DH, Sutherland JS, Chidgey AP, Boyd RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *Journal of immunology*. 2005 Sep 1;175(5):2982-93. PubMed PMID: 16116185.

42. Dumont-Lagace M, Brochu S, St-Pierre C, Perreault C. Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *Journal of immunology*. 2014 Mar 1;192(5):2219-26. PubMed PMID: 24477909.
43. Wong K, Lister NL, Barsanti M, Lim JM, Hammett MV, Khong DM, et al. Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell reports*. 2014 Aug 21;8(4):1198-209. PubMed PMID: 25131206.
44. Boehm T, Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends in immunology*. 2006 Oct;27(10):477-84. PubMed PMID: 16920024.
45. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *Journal of immunology*. 2008 Apr 1;180(7):4639-47. PubMed PMID: 18354187.
46. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine*. 2004 Aug 16;200(4):469-79. PubMed PMID: 15314075. Pubmed Central PMCID: 2211933.
47. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annual review of immunology*. 2006;24:705-38. PubMed PMID: 16551264.
48. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999 May;10(5):547-58. PubMed PMID: 10367900.
49. Wang D, Claus CL, Vaccarelli G, Braunstein M, Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAIt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. *Journal of immunology*. 2006 Jul 1;177(1):109-19. PubMed PMID: 16785505.
50. Guyden JC, Pezzano M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. *International review of cytology*. 2003;223:1-37. PubMed PMID: 12641209.
51. Li A, Liu X, Duan B, Ma J. Thymic nurse cells support CD4-CD8+ thymocytes to differentiate into CD4+CD8+ cells. *Cellular & molecular immunology*. 2005 Aug;2(4):301-5. PubMed PMID: 16274629.

52. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *The Journal of experimental medicine*. 2008 Oct 27;205(11):2507-13. PubMed PMID: 18824583. Pubmed Central PMCID: 2571926.
53. Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, et al. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International immunology*. 2002 Jun;14(6):637-45. PubMed PMID: 12039915.
54. Lehar SM, Bevan MJ. T cells develop normally in the absence of both Deltex1 and Deltex2. *Molecular and cellular biology*. 2006 Oct;26(20):7358-71. PubMed PMID: 16923970. Pubmed Central PMCID: 1636852.
55. De Smedt M, Reynvoet K, Kerre T, Taghon T, Verhasselt B, Vandekerckhove B, et al. Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *Journal of immunology*. 2002 Sep 15;169(6):3021-9. PubMed PMID: 12218117.
56. Hozumi K, Abe N, Chiba S, Hirai H, Habu S. Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis on lymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development. *Journal of immunology*. 2003 May 15;170(10):4973-9. PubMed PMID: 12734340.
57. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature immunology*. 2005 Jul;6(7):663-70. PubMed PMID: 15951813.
58. Visan I, Tan JB, Yuan JS, Harper JA, Koch U, Guidos CJ. Regulation of T lymphopoiesis by Notch1 and Lunatic fringe-mediated competition for intrathymic niches. *Nature immunology*. 2006 Jun;7(6):634-43. PubMed PMID: 16699526.
59. Dallas MH, Varnum-Finney B, Delaney C, Kato K, Bernstein ID. Density of the Notch ligand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005 May 2;201(9):1361-6. PubMed PMID: 15851488. Pubmed Central PMCID: 2213184.
60. Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, et al. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nature immunology*. 2004 Jun;5(6):638-44. PubMed PMID: 15146182.
61. Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell

- lineage commitment. *The Journal of experimental medicine*. 2008 Oct 27;205(11):2515-23. PubMed PMID: 18824585. Pubmed Central PMCID: 2571927.
62. Besseyrias V, Fiorini E, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Dumortier A, Koch U, et al. Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Feb 19;204(2):331-43. PubMed PMID: 17261636. Pubmed Central PMCID: 2118717.
63. Mick VE, Starr TK, McCaughy TM, McNeil LK, Hogquist KA. The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive selection in vivo. *Journal of immunology*. 2004 Nov 1;173(9):5434-44. PubMed PMID: 15494490.
64. Brugnara E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Ginter TI, Yamashita Y, et al. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*. 2000 Jul;13(1):59-71. PubMed PMID: 10933395.
65. Yu Q, Xu M, Sen JM. Beta-catenin expression enhances IL-7 receptor signaling in thymocytes during positive selection. *Journal of immunology*. 2007 Jul 1;179(1):126-31. PubMed PMID: 17579030. Pubmed Central PMCID: 2273996.
66. Yashiro-Ohtani Y, Ohtani T, Pear WS. Notch regulation of early thymocyte development. *Seminars in immunology*. 2010 Oct;22(5):261-9. PubMed PMID: 20630772.
67. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scandinavian journal of immunology*. 1985 Nov;22(5):563-75. PubMed PMID: 4081647.
68. Zhu M, Fu Y. The complicated role of NF-kappaB in T-cell selection. *Cellular & molecular immunology*. 2010 Mar;7(2):89-93. PubMed PMID: 20190822. Pubmed Central PMCID: 4001888.
69. Klug DB, Crouch E, Carter C, Coghlan L, Conti CJ, Richie ER. Transgenic expression of cyclin D1 in thymic epithelial precursors promotes epithelial and T cell development. *Journal of immunology*. 2000 Feb 15;164(4):1881-8. PubMed PMID: 10657637.
70. Jenkinson WE, Bacon A, White AJ, Anderson G, Jenkinson EJ. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *Journal of immunology*. 2008 Nov 1;181(9):6101-8. PubMed PMID: 18941199.

71. Dudakov JA, Khong DM, Boyd RL, Chidgey AP. Feeding the fire: the role of defective bone marrow function in exacerbating thymic involution. *Trends in immunology*. 2010 May;31(5):191-8. PubMed PMID: 20356793.
72. Mackall CL, Punt JA, Morgan P, Farr AG, Gress RE. Thymic function in young/old chimeras: substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *European journal of immunology*. 1998 Jun;28(6):1886-93. PubMed PMID: 9645370.
73. Zhu W, Xu P, Cuascut FX, Hall AK, Oxford GS. Activin acutely sensitizes dorsal root ganglion neurons and induces hyperalgesia via PKC-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid I. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007 Dec 12;27(50):13770-80. PubMed PMID: 18077689.
74. Yang H, Youm YH, Sun Y, Rim JS, Galban CJ, Vandanmagsar B, et al. Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling. *Journal of leukocyte biology*. 2009 Jun;85(6):928-38. PubMed PMID: 19299626. Pubmed Central PMCID: 2718808.
75. Youm YH, Yang H, Sun Y, Smith RG, Manley NR, Vandanmagsar B, et al. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Mar 13;284(11):7068-77. PubMed PMID: 19054770. Pubmed Central PMCID: 2652314.
76. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *Journal of immunology*. 2004 Jul 1;173(1):245-50. PubMed PMID: 15210781.
77. Zook EC, Krishack PA, Zhang S, Zeleznik-Le NJ, Firulli AB, Witte PL, et al. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood*. 2011 Nov 24;118(22):5723-31. PubMed PMID: 21908422. Pubmed Central PMCID: 3228493.
78. Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *International immunology*. 2007 Oct;19(10):1201-11. PubMed PMID: 17804689.

79. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxidants & redox signaling*. 2011 Apr 15;14(8):1551-85. PubMed PMID: 20812785. Pubmed Central PMCID: 3061194.
80. Lee JB, Oelke M, Ramachandra L, Canaday DH, Schneck JP. Decline of influenza-specific CD8+ T cell repertoire in healthy geriatric donors. *Immunity & ageing : I & A*. 2011;8:6. PubMed PMID: 21846352. Pubmed Central PMCID: 3179433.
81. Lepletier A, Chidgey AP, Savino W. Perspectives for Improvement of the Thymic Microenvironment through Manipulation of Thymic Epithelial Cells: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015 Mar 10. PubMed PMID: 25765703.
82. Chidgey A, Dudakov J, Seach N, Boyd R. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. *Seminars in immunology*. 2007 Oct;19(5):331-40. PubMed PMID: 18024073.
83. Olsen NJ, Watson MB, Henderson GS, Kovacs WJ. Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice. *Endocrinology*. 1991 Nov;129(5):2471-6. PubMed PMID: 1834454.
84. Goldberg GL, Dudakov JA, Reiseger JJ, Seach N, Ueno T, Vlahos K, et al. Sex steroid ablation enhances immune reconstitution following cytotoxic antineoplastic therapy in young mice. *Journal of immunology*. 2010 Jun 1;184(11):6014-24. PubMed PMID: 20483779.
85. Metallinou C, Asimakopoulos B, Schroer A, Nikolettos N. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reproductive sciences*. 2007 Dec;14(8):737-49. PubMed PMID: 18089592.
86. Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine*. 1994;45:391-405. PubMed PMID: 8198390.
87. Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, Uldrich AP, Berzins SP, Heng TS, et al. Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *Journal of immunology*. 2005 Aug 15;175(4):2741-53. PubMed PMID: 16081852.
88. Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Adcock IM, Kendall MD, Wheeler MJ. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *The Journal of endocrinology*. 1986 Sep;110(3):417-22. PubMed PMID: 3760740.



89. Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Raiti F, Palumbo G, Jr., et al. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. *Endocrinology*. 1989 Aug;125(2):1037-45. PubMed PMID: 2546733.
90. Dixit VD, Sridaran R, Edmonson MA, Taub D, Thompson WE. Gonadotropin-releasing hormone attenuates pregnancy-associated thymic involution and modulates the expression of antiproliferative gene product prohibitin. *Endocrinology*. 2003 Apr;144(4):1496-505. PubMed PMID: 12639934.
91. Berruti A, Dogliotti L, Terrone C, Cerutti S, Isaia G, Tarabuzzi R, et al. Changes in bone mineral density, lean body mass and fat content as measured by dual energy x-ray absorptiometry in patients with prostate cancer without apparent bone metastases given androgen deprivation therapy. *The Journal of urology*. 2002 Jun;167(6):2361-7; discussion 7. PubMed PMID: 11992038.
92. Lepasovic G, Perisic M, Kosec D, Arsenovic-Ranin N, Radojevic K, Stojic-Vukanic Z, et al. Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats. *Brain, behavior, and immunity*. 2009 Feb;23(2):294-304. PubMed PMID: 19028560.
93. Viselli SM, Olsen NJ, Shults K, Steizer G, Kovacs WJ. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 1995 Mar;109(1):19-26. PubMed PMID: 7789613.
94. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1278-83. PubMed PMID: 11181545.
95. Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. Bone marrow stromal cells mediate androgenic suppression of B lymphocyte development. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Dec;108(11):1697-704. PubMed PMID: 11733565. Pubmed Central PMCID: 200984.
96. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reassessing the role of growth hormone and sex steroids in thymic involution. *Clinical immunology*. 2006 Jan;118(1):117-23. PubMed PMID: 16188505.
97. Garcia-Perez MA, Del Val R, Noguera I, Hermenegildo C, Pineda B, Martinez-Romero A, et al. Estrogen receptor agonists and immune system in ovariectomized

- mice. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2006 Oct-Dec;19(4):807-19. PubMed PMID: 17166402.
98. Leposavic G, Obradovic S, Kosec D, Pejic-Karapetrovic B, Vidic-Dankovic B. In vivo modulation of the distribution of thymocyte subsets by female sex steroid hormones. *International immunopharmacology*. 2001 Jan;1(1):1-12. PubMed PMID: 11367507.
99. Utsuyama M, Hirokawa K. Hypertrophy of the thymus and restoration of immune functions in mice and rats by gonadectomy. *Mechanisms of ageing and development*. 1989 Mar;47(3):175-85. PubMed PMID: 2785623.
100. Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2005;3:6. PubMed PMID: 15661083. Pubmed Central PMCID: 548297.
101. Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(27):2918-24. PubMed PMID: 18045137.
102. Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, et al. Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):411-23. PubMed PMID: 15685552.
103. Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006 Jan;290(1):G137-44. PubMed PMID: 16123203.
104. Rosendahl A, Checchin D, Fehniger TE, ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 Jul;25(1):60-8. PubMed PMID: 11472976.
105. Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, et al. Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1682-4. PubMed PMID: 1900235.
106. Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitamins and hormones*. 2011;85:255-97. PubMed PMID: 21353885.

107. Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*. 1990 Feb 16;247(4944):836-8. PubMed PMID: 2106159.
108. Lerch TF, Shimasaki S, Woodruff TK, Jardetzky TS. Structural and biophysical coupling of heparin and activin binding to follistatin isoform functions. *The Journal of biological chemistry*. 2007 May 25;282(21):15930-9. PubMed PMID: 17409095.
109. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *Journal of immunology*. 2002 Nov 15;169(10):5496-504. PubMed PMID: 12421925.
110. Varas A, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Jimenez E, Garcia-Ceca J, Arias-Diaz J, et al. Age-dependent changes in thymic macrophages and dendritic cells. *Microscopy research and technique*. 2003 Dec 15;62(6):501-7. PubMed PMID: 14635143.
111. Arion V, Koval'skaia NI, Lopukhin Iu M. [Effect of T-activin on thymus involution in mice]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1984 Sep;98(9):354-6. PubMed PMID: 6548393. Vliianie T-aktivina na involiutsiiu timusa u myshei.
112. Koval'skaia NI, Arion VN, Blinkov VN. [Effects of T-activin on the morphology of the thymus gland in experimental injury of the lower limbs in mice (anti-stress effect of T-activin)]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1990 Jun;109(6):585-7. PubMed PMID: 2397300. Izuchenie vliianiia taktivina na morfologiiu timusa pri eksperimental'noi travme nizhnei konechnosti u myshei (antistressorni efekt taktivina).
113. Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoiesis. *International immunology*. 2003 Dec;15(12):1401-14. PubMed PMID: 14645149.
114. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006 Apr;235(4):1124-32. PubMed PMID: 16477644.
115. Licona-Limon P, Aleman-Muench G, Chimal-Monroy J, Macias-Silva M, Garcia-Zepeda EA, Matzuk MM, et al. Activins and inhibins: novel regulators of

thymocyte development. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Apr 3;381(2):229-35. PubMed PMID: 19338778. Pubmed Central PMCID: 2693414.

116. Fitzpatrick FT, Kendall MD, Wheeler MJ, Adcock IM, Greenstein BD. Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *The Journal of endocrinology*. 1985 Sep;106(3):R17-9. PubMed PMID: 4045335.

117. Kendall MD, Fitzpatrick FT, Greenstein BD, Khoylou F, Safieh B, Hamblin A. Reversal of ageing changes in the thymus of rats by chemical or surgical castration. *Cell and tissue research*. 1990 Sep;261(3):555-64. PubMed PMID: 2147125.

118. Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz SM, Dong H, et al. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *Journal of immunology*. 2004 Nov 15;173(10):6098-108. PubMed PMID: 15528346.

119. Yang SJ, Ahn S, Park CS, Holmes KL, Westrup J, Chang CH, et al. The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development. *International immunology*. 2006 May;18(5):729-39. PubMed PMID: 16569676.

120. Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Oct 29;204(11):2521-8. PubMed PMID: 17908938. Pubmed Central PMCID: 2118482.

121. Nowell CS, Bredenkamp N, Tetelin S, Jin X, Tischner C, Vaidya H, et al. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS genetics*. 2011 Nov;7(11):e1002348. PubMed PMID: 22072979. Pubmed Central PMCID: 3207875.

122. Velardi E, Tsai JJ, Holland AM, Wertheimer T, Yu VW, Zakrzewski JL, et al. Sex steroid blockade enhances thymopoiesis by modulating Notch signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2014 Nov 17;211(12):2341-9. PubMed PMID: 25332287. Pubmed Central PMCID: 4235646.

123. Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Dec;84(23):8282-6. PubMed PMID: 3120188. Pubmed Central PMCID: 299526.

124. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):392-404. PubMed PMID: 18692464. Pubmed Central PMCID: 3677783.
125. Hedger MP, Clarke L. Isolation of rat blood lymphocytes using a two-step Percoll density gradient. Effect of activin (erythroid differentiation factor) on peripheral T lymphocyte proliferation in vitro. *Journal of immunological methods*. 1993 Jul 6;163(1):133-6. PubMed PMID: 8393052.
126. Hedger MP, Drummond AE, Robertson DM, Risbridger GP, de Kretser DM. Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*. 1989 Jan;61(1):133-8. PubMed PMID: 2501119.
127. Mather JP, Attie KM, Woodruff TK, Rice GC, Phillips DM. Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology*. 1990 Dec;127(6):3206-14. PubMed PMID: 2249646.