

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

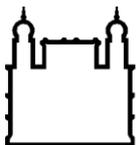
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroline Fraga Cabral Gomes Nunes

**DINÂMICA POPULACIONAL DE CÉLULAS T
REGULADORAS CD4⁺Foxp3⁺ DE NEONATO E
ADULTO NO COMPARTIMENTO PERIFÉRICO**

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroline Fraga Cabral Gomes Nunes

Dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ de neonato e adulto no compartimento periférico

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

Orientador: Prof. Dr. José Orivaldo Mengele Junior

RIO DE JANEIRO

2012

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

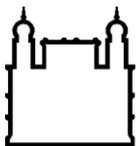
N972 Nunes, Caroline Fraga Cabral Gomes.

Dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺
derivadas de timo neonatal e adulto no compartimento periférico/
Caroline Fraga Cabral Gomes Nunes. – Rio de Janeiro, 2012.
xii, 67 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 55-66

1. Homeostase. 2. Células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺.
3. Compartimento periférico. 4. Células neonatais. I. Título.

CDD 571.75



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroline Fraga Cabral Gomes Nunes

Dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ de neonato e adulto no compartimento periférico

Prof. Dr. José Orivaldo Mengele Junior

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro (Presidente)

Prof. Dra. Adriana Cesar Bonomo

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Rio de Janeiro, de Julho de 2012

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação científica e por essa grande conquista: Família, amigos, em especial Fábio, Jeane e Rita Fucs. Essa Dissertação é de vocês!

AGRADECIMENTOS

*“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo é um prazer para mim,
dividir um planeta e uma época com você.”*

— CARL SAGAN

Á Deus:

Sempre ao meu lado, nas minhas quedas, nas minhas fraquezas, nas lutas e controvérsias, vitórias e derrotas. Agradeço por guiar e iluminar o meu caminho colocando pessoas maravilhosas que preencheram cada momento da minha vida de alegrias e felicidades. Obrigada por este presente. Obrigada por tudo que vi, ouvi e aprendi.

À família:

A meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Vocês são responsáveis por este momento tão marcante em minha vida profissional. Agradeço pela força necessária que transmitiram nos momentos críticos e pela longa espera e compreensão durante os momentos ausentes. Obrigada por sua dedicação, pelo amor que me fez mais forte, fazendo-me entender que sou capaz de ir mais além. Esta vitória também é de vocês!!

Ao meu irmão que durante anos de convívio me proporcionou bons momentos. Superamos dificuldades, enriquecemos nossas vidas. Amadurecemos juntos, com o mesmo ideal de vermos nossos sonhos realizados. Obrigada por fazer parte da minha vida. Sucesso pra nós!

A minhas avós e avôs (*in memorium*), símbolos da experiência e memória de tantos anos vividos. Obrigada pelos sábios conselhos e pelas palavras de carinho. Obrigada por me fazer acreditar que no final tudo daria certo! Vocês são frutos da mais bela obra que Deus colocou na minha história.

A meus pais de coração e por opção. Obrigada pelo carinho e pelas palavras de confiança. Seus incentivos se transformaram em forças para completar esta batalha. Obrigada pela torcida!

Aos Meus Amigos:

Fábio Barrozo

Imprescindível na minha vida pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma achei que não fosse mais possível. Por dizer, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir. Obrigada por ter posto tanta sabedoria, cuidado e carinho na nossa amizade, por compartilhar tantas coisas boas e por marcar tantas lembranças que jamais serão esquecidas. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez e continua fazendo por mim. Embora separados pela distância, todos os cuidados, ajuda e ideias que você teve com esse trabalho só me confirmam o quanto sua amizade é especial para mim!!!! Obrigada Amigo TE ADORO! Volta logo de New York pois estou com muitas saudades!!!

Jeane Nogueira

Indiscutivelmente uma grande Amiga e irmã!! Vivemos juntas tantas horas e carregamos as marcas das experiências que tivemos no laboratório. Sem sua companhia esse trabalho não teria a menor graça. Saiba que você é um exemplo de esforço e dedicação para mim! Seu Astral contagia todo mundo e faz com que todos se sintam felizes ao seu lado, mesmo quando as coisas não andam muito bem! Durante esse tempo crescemos como amigas e só tenho a agradecer por todos os conselhos e confiança que você depositou em mim! Esse trabalho também é seu, pois juntas concluímos com êxito mais essa jornada!!!! Obrigada Amiga TE ADORO sem seus cuidados essa dissertação jamais estaria completa!

Aos meus amigos da Fiocruz, UFRJ, UFF e da vida não acadêmica

A todas vocês que compartilharam durante esse tempo, ideias, estudos e expectativas; Vivemos momentos de alegrias e tristezas e possuímos em comum um ideal a ser conquistado... Juntos, vencemos! Pela convivência, pelos laços que se formaram, obrigada por tornar minha trajetória mais agradável.

Aos Professores:

Rita Fucs

Orientadora e Amiga! Sua confiança foi capaz de me fazer trilhar por um crescimento profissional que julgava impossível em tão pouco tempo. Obrigada pelo constante incentivo, e pela empatia que recebeu minhas ideias, elas foram o estímulo que me permitiu vencer as inseguranças deste processo! Você é um exemplo de que com força de vontade tudo é possível.

José Mengel

Obrigada Zé, pela colaboração e pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação e por tornar possível a realização deste trabalho. Obrigada por seu apoio e inspiração e por todas as suas preciosas críticas e sugestões.

Maria Bellio e Alberto Nóbrega

Obrigada pela colaboração, ideias, sugestões e auxílios técnicos e materiais para o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Adriana Bonomo

Sempre com ótimas ideias e sugestões! Obrigada por ter aceitado participar da minha banca e pelo auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho. Se não fosse por você, jamais teria conseguido fazer os experimentos de enxerto de timo na cápsula renal.

Marcelo Bozza

Obrigada por revisar e participar da conclusão deste trabalho! Suas ideias são geniais em qualquer campo da Imunologia.

À banca examinadora

Pela leitura e revisão precisa e pelas valiosas opiniões e sugestões que serão discutidas ao fim do trabalho. Obrigada por compartilhar seus vastos conhecimentos.

FAPERJ, CNPQ e PROPP UFF

Por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.

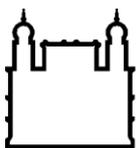
Agradeço por fim, a todas as pessoas, mesmo não mencionadas, que contribuíram com seus conhecimentos para a realização dessa conquista.

EPÍGRAFE

“What we are today comes from our thoughts of
yesterday, and our present thought build our life of
tomorrow: our life is a creation of our mind”
(Pensamento indiano)

“Grandes amores e grandes realizações
envolvem grandes riscos”
(Pensamento chinês)

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ de neonato e adulto no compartimento periférico

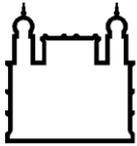
RESUMO

Células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) caracterizadas por controlar clones autorreativos, apresentam uma frequência estável no compartimento periférico (5-15%), sugerindo a existência de uma competição contínua entre Tregs recém emigradas do timo (RTEs) e residentes. Entretanto, ainda não está completamente estabelecido se essa cinética de substituição e persistência é equivalente entre células CD4⁺Foxp3⁺ de idade neonatal e adulta. É possível que características peculiares à população neonatal, como uma menor diversidade de TCR e uma maior frequência de células multirreativas, possam influir na homeostase periférica dessas células. Nosso objetivo neste trabalho foi avaliar a competição homeostática periférica de células Treg CD4⁺Foxp3⁺, comparada à de células convencionais (não reguladoras) CD4⁺Foxp3⁻ em diferentes idades. Os resultados deste estudo podem contribuir para o entendimento de como a homeostase das células reguladoras mantém a memória da tolerância adquirida no período neonatal e influi na diversidade do repertório desta população. A persistência de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ e células CD4⁺Foxp3⁻ frente à chegada de novas populações ao compartimento periférico foi estudada por dois protocolos independentes, ambos usando camundongos atímicos como hospedeiros de: (i) enxertos de timo colonizado de diferentes idades (neonatal ou adulto) e (ii) transferências sequenciais de timócitos policlonais de doadores neonatais e/ou adultos, constituindo três diferentes grupos (neonato-neonato, neonato-adulto, adulto-neonato).

Através dos protocolos de enxerto de timo neonatal observamos que as células do doador neonatal são rapidamente substituídas por novas RTEs diferenciadas a partir das precursoras do hospedeiro. Entretanto, Apesar da rápida substituição dos timócitos neonatais, observamos, de forma surpreendente, que a população reguladora desta idade apresenta uma cinética de substituição mais atrasada, quando comparada à de células convencionais CD4⁺Foxp3⁻ permitindo a sobrevivência de alguns clones inicialmente selecionados no compartimento periférico. O mesmo fenômeno não foi observado nos animais que receberam timo adulto. Nestes, as populações Treg e não-Treg mostraram cinética semelhante de renovação. É possível que a maior afinidade das células Treg intra-tímicas por peptídeos próprios, permita a sobrevivência prolongada preferencial das células Treg de origem neonatal, comparada às células convencionais da mesma idade

Com o segundo protocolo, observamos que a capacidade de incorporação das subpopulações CD4⁺Foxp3⁻ e CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) neonatais em ambiente previamente reconstituído é dificultada, mesmo quando a população residente é derivada de um doador neonatal. A colonização foi expressiva apenas quando timócitos adultos foram transferidos para animais reconstituídos previamente com células neonatais. Considerando que em hospedeiros linfopênicos a expansão das populações reguladoras de timócitos de ambas as idades foi semelhante, a dificuldade de incorporação de novas células neonatais pode estar relacionada a características do repertório de TCR, sugerindo que a afinidade e a multirreatividade dos TCRs das células neonatais estejam relacionados ao fracasso na competição por nichos periféricos.

Esses dados coletivamente sugerem que a densidade de epítomos disponíveis na periferia e a reatividade/afinidade do repertório de TCR podem ser fatores limitantes para a dinâmica populacional das células T reguladoras e não reguladoras de diferentes idades.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ de neonato e adulto no compartimento periférico

ABSTRACT

Peculiar features of TCR repertoire associated with peripheral neonatal populations, such as multireactivity, lower diversity and a lower affinity for peptides present in the peripheral compartment might influence regulatory T cells (Treg) homeostasis. Stable frequencies of peripheral regulatory T cells for almost all life suggest that there must be a continuous competition between resident and recently thymus emigrated (RTEs) Treg cells. Our aim was to evaluate the substitution kinetics of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells and non-regulatory (conventional) CD4⁺Foxp3⁻ T cells at different ages, in the peripheral compartment. The results of this study may contribute to understand how the memory of tolerance acquired in the neonatal period is maintained along with increasing Treg repertoire diversity. The persistence of CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3⁻ T cells after the entry of novel lymphoid populations was studied through two distinct protocols, using athymic mice as hosts: (i) colonized thymus grafts obtained from neonatal or adult syngeneic mice (ii) sequential transfers of polyclonal thymocytes obtained from neonatal or adult donors, comprising three different groups (neonate-neonate, neonate-adult, adult-neonate). Using thymus graft protocols we observed that neonatal T cells were readily replaced by new RTEs differentiated from precursors of the adult host. In the second protocol, neonatal T cells also showed a worse capacity of incorporation in a previously reconstituted environment, even when the resident population was derived from a neonatal donor. Since in lymphopenic conditions the expansion of Treg populations of both ages was similar, the failure of neonatal cells in colonizing a previously reconstituted host might be consequent to TCR repertoire characteristics. The substitution kinetics of regulatory T cells compared to conventional CD4⁺Foxp3⁻ lymphocytes was surprisingly delayed in animals receiving neonatal thymus, allowing the survival of some clones initially selected in the peripheral compartment. The same phenomenon was not observed in animals receiving adult thymus, in which Treg and non-Treg cells showed similar kinetics of renewal. It is possible that a higher TCR affinity to self peptides, which mostly persist in the peripheral compartment throughout life, favors the preferential long-term survival of Treg cells in the neonate. In contrast, non-regulatory cells, at the same age, endowed with a repertoire showing lower affinity toward endogenous peptides and a more limited diversity in relation to adult non-Tregs, could be more easily substituted in the peripheral compartment.

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Homeostase dos linfócitos T	13
1.2	Proliferação homeostática em ambiente linfopênico	2
1.3	Células T reguladoras (Treg)	4
1.3.1	Geração de células T reguladoras	5
1.4	Controle homeostático do compartimento periférico de células T reguladoras CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	9
1.5	Características das células T neonatais	13
2	Objetivos	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	Materiais e Métodos	20
3.1	animais	20
3.2	Enxertos de timo	20
3.3	Preparo e Transferência de populações linfóides	20
3.4	Estudo de marcadores de superfície por imunofluorescência	21
3.5	Análise Estatística	22
4	Resultados	23
5	Discussão	46
7.	Referências Bibliográficas	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AIRE - Autoimmune regulator
APC - Antigen-presenting cell
CDR3 - complementarity-determining region 3
CTLA-4 - Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
FACS - Fluorescence activated cell sorting
FCS - Fetal calf serum
Foxp3 - Forkhead box p3
GITR - Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
IPEX - Immuno-dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
MHC - Major histocompatibility complex
PBS - Phosphate buffered saline
RTE - Recent thymic emigrants
TCR - T cell receptor
Treg - CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells

1 Introdução

1.1 Homeostase dos linfócitos T

No sistema imunológico, o controle homeostático do número de linfócitos T no compartimento periférico já foi evidenciado, impedindo seu acúmulo excessivo por produção constante pelo timo, ou por expansão clonal durante uma resposta imunológica (ALMEIDA *et al.*, 2005). Da mesma forma, foi visto

que a involução do timo na idade adulta não resulta em uma diminuição progressiva no número de linfócitos e que estados temporários de linfopenia, ocasionados por infecções ou manipulações terapêuticas, são seguidos por expansão compensatória, a fim de manter constante o número de células T na periferia (TANCHOT *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os mecanismos homeostáticos responsáveis por regular o número de linfócitos no compartimento periférico possuem uma importância não só quantitativa, mas também qualitativa influenciando em seu repertório. A homeostase da população de linfócitos T precisa manter tanto a diversidade adequada no repertório de TCRs, permitindo a entrada constante de células recém emigradas do timo (RTEs) com novas especificidades, quanto a memória imunológica, através da permanência de clones com número suficiente de linfócitos, capazes de gerar respostas imunológicas rápidas e eficientes (BOURGEOIS & STOCKINGER, 2006).

No caso da população de células T, já foi sugerido que não há uma programação intrínseca rígida com relação ao tempo de vida ou divisão celular. Células já residentes na periferia ou recém emigradas do timo (RTEs) apresentam a mesma probabilidade de sobrevivência e a chegada e permanência de novos linfócitos no compartimento periférico não resultam, por exemplo, na morte dos linfócitos mais antigos. Ao contrário, a substituição não parece ser regulada pela idade (TANCHOT *et al.*, 1997). As interações de baixa afinidade com complexos MHC-peptídeo próprio (MHC-Ppróprio) e com citocinas, como a IL-7, é que funcionam como fatores determinantes da competição pela sobrevivência dos linfócitos T. Linfócitos que expressam TCR com uma maior afinidade pelo complexo MHC-peptídeo podem levar vantagem e conseguir substituir células residentes. Células T virgens que encontram complexos MHC-peptídeos disponíveis para interação no compartimento periférico podem persistir e sua diminuição pode ocorrer apenas em situações de estimulação antigênica, quando seriam recrutadas para a função e fenótipo de células T de memória (KIRBERG, BERNIS & VON BOEHMER, 1997; TANCHOT *et al.*, 1997; MOSES *et al.*, 2003).

1.2 Proliferação homeostática em ambiente linfopênico

A linfopenia é caracterizada por um menor número de linfócitos circulantes na periferia. Ela pode ser congenitamente adquirida, como no caso de camundongos RAG^{-/-} (não apresentam linfócitos T e B) ou induzida por manipulações terapêuticas como radioterapia ou quimioterapia, ou por infecções bacterianas e virais. Flutuações relacionadas à idade também podem ser observadas tanto em neonatos, quando ocorre a emigração das primeiras ondas de linfócitos diferenciados no timo, quanto em idosos, nos quais a involução do timo prejudica a liberação de células T para a periferia.

Diversos estudos também destacaram a importância da interação TCR-MHC na proliferação homeostática das células T que ocorre em condições linfopênicas e mostraram que tal expansão pode ser dependente de interações específicas de baixa afinidade com peptídeos próprios similares aos requeridos para a seleção positiva no timo (ERNST *et al.*, 1999; GOLDRATH & BEVAN, 1999; LEE *et al.*, 1999; VIRET *et al.*, 1999). Além disso, IL-7 tem sido descrita como uma citocina chave envolvida na proliferação de células T virgens, atuando sozinha ou em sinergia com sinais do TCR (SEDDON *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que em condições fisiológicas a IL-7 mantém apenas a sobrevivência das células e induz poucas divisões celulares; no entanto quando suas concentrações estão aumentadas (ambiente linfopênico), essa mesma população sofre intensas divisões celulares (LI *et al.*, 2003).

Dois tipos de competição periférica já foram relatados: a primeira entre clones com diferentes especificidades em uma mesma população funcional (virgem e memória) e a segunda, entre clones de subpopulações diferentes que apresentam a mesma especificidade (MAHAJAM *et al.*, 2005).

A competição entre diferentes TCRs da mesma subpopulação é um evento de extrema relevância para a manutenção da diversidade. Diversos autores têm se dedicado a estudar esse tipo de competição nas linhagens T CD4⁺ e CD8⁺. Foi visto que células T policlonais virgens proliferam quando injetadas em um hospedeiro com TCR transgênico, mas não em um hospedeiro singênico (TROY *et al.*, 2003). Isso sugere que o compartimento periférico dos hospedeiros com TCR transgênico apresenta complexos MHC-peptídeos disponíveis para os linfócitos T de outras especificidades. No compartimento

periférico dos hospedeiros policlonais singênicos, esses complexos MHC-peptídeo já estão ocupados pelos linfócitos T do hospedeiro. Desta forma, apenas as células com maior afinidade pelo complexo MHC-peptídeo seriam capazes de deslocar os linfócitos residentes e serem incorporadas, após a transferência.

Embora o tamanho do compartimento periférico das diferentes subpopulações de linfócitos T (virgem e memória) possa ser regulado de forma independente, alguns autores propõem que os linfócitos T de subpopulações diferentes também possam competir entre si. Min e Paul demonstraram em um de seus trabalhos que linfócitos T virgens transferidos para hospedeiros que apresentam uma pequena quantidade de linfócitos T de memória, só proliferam quando encontram nichos (complexo MHC-peptídeo) disponíveis no repertório. Se as células T virgens encontrarem um nicho inteiramente ocupado elas falham em proliferar (MIN & PAUL., 2005), sugerindo que um repertório amplo residente de células de memória pode ser responsável pelo bloqueio da proliferação homeostática, enquanto repertórios de uma diversidade limitada permitem a proliferação de células T virgens após transferência adotiva (MIN *et al.*, 2004).

Recentemente, células T reguladoras envolvidas na manutenção da tolerância periférica, também vêm sendo associadas ao controle homeostático do compartimento periférico de linfócitos T. As células T reguladoras são responsáveis pela supressão de linfócitos T ativados (efetores) e clones auto-reativos que escaparam da seleção negativa no timo.

Diversas células com função reguladora e fenótipos variados já foram relatadas, como por exemplo, Tr1, Th3, NKT, CD8⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺ (BECKER *et al.*, 2006; WING *et al.*, 2006). Entre essas diferentes subpopulações, as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) são aquelas que estão mais bem caracterizadas, além de já terem sido muito bem relacionadas ao controle de autoimunidade e tolerância a transplantação. Desse modo, os próximos tópicos serão dedicados ao estudo da homeostase dessa sub-população no compartimento periférico.

1.3 Células T reguladoras (Treg)

Experimentos pioneiros na década de 70 revelaram que a timectomia murina neonatal em um período específico (entre os dias 2 e 4) após o nascimento, provocava doenças auto-imunes (AID) órgão-específicas, enquanto a timectomia 7 dias após o nascimento não resultava em AID (KOJIMA *et al.*, 1976). Posteriormente, Sakaguchi e colaboradores demonstraram que a prevenção da auto-imunidade poderia ser obtida através da transferência de linfócitos T CD4⁺ totais para camundongos timectomizados não tratados (SAKAGUCHI *et al.*, 1982). Esses resultados indicam que animais normais possuem não apenas células T autorreativas patogênicas, mas também células T que suprimem autoimunidade e que foram mais tarde caracterizadas como células T reguladoras naturais (nTreg) (SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

Células nTreg, constituem cerca de 5-15% dos linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação (GAVIN & RUDENSKY, 2003) e estão engajadas na supressão de respostas imunes direcionadas para antígenos próprios e não próprios (como microrganismos e aloenxertos). Sua depleção, além de causar autoimunidade e doenças inflamatórias intestinais (como resultado de uma resposta imune excessiva a bactérias comensais do intestino) (SINGH *et al.*, 2001), também provoca imunidade efetiva a determinados tumores, não encontrada em animais normais, e aumenta a imunidade anti-microbiana em infecções crônicas (revisado em WANG & WANG, 2007; BELKAID & ROUSE, 2005). Inversamente, o enriquecimento em células Treg CD4⁺CD25⁺ suprime alergia, estabelece tolerância a órgãos enxertados, previne doença enxerto versus hospedeiro (GvHD) após transplante de medula óssea, e promove a tolerância materno-fetal (SHEVACH, 2002; WOOD & SAKAGUCHI, 2003; SHI & QIN, 2005; CURIEL, 2008, BELKAID & TARBELL, 2009).

Alguns marcadores têm sido relacionados com as nTreg. Dentre os marcadores de superfície podemos destacar CTLA-4 (antígeno-4 associado a linfócito T citotóxico ou CD152), GITR (receptor relacionado à família do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide), CD62-L (L-Selectina) e CD103 (Integrina $\alpha E\beta 7$). Infelizmente, nenhum desses marcadores é específico da subpopulação Treg, visto que a expressão dessas moléculas pode ser um reflexo

do estado de ativação dessas células (GUPTA *et al.*, 2008). Em contrapartida, a maioria dos autores assume que a expressão estável e intensa da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e, principalmente a expressão do fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box P3*), estão mais relacionados com a caracterização dessa população (KASPROWICZ *et al.*, 2003). Entretanto, ainda não existe um consenso com relação à determinação dos marcadores específicos dessa linhagem, principalmente por causa da discrepância observada entre a expressão ubíqua de Foxp3 pelas células Treg murinas, em contraposição à expressão irregular deste fator de transcrição por células Treg humanas (CAMPBELL & ZIEGLER, 2007).

O gene que codifica o Foxp3 (membro da família dos fatores de transcrição *forkhead*) está no cromossomo X e produz uma proteína nuclear chamada de *scurfin* ou foxp3. Camundongos *scurfy* e humanos com IPEX (síndromes de poliendocrinopatias e enteropatias imunes ligadas ao cromossomo X) apresentam um quadro de intensa linfoproliferação autoimune e intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, atribuída à ausência ou deficiência na expressão do gene Foxp3 (SCHUBERT *et al.*, 2001; BRUNKOW *et al.*, 2001). Vários estudos experimentais mostraram que o Foxp3 é essencial para a atividade supressora de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, e que a transdução retroviral ectópica do gene Foxp3 em células T CD4⁺ CD25⁻ pode convertê-las em células semelhantes às Treg CD4⁺ CD25⁺ capazes de suprimir a proliferação de outras células T *in vitro* e inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais *in vivo* (HORI *et al.*, 2003).

A eliminação da proteína Foxp3 em células Treg periféricas maduras resulta em perda da atividade supressora e conversão ao fenótipo efetor. Estas células passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, tornando-se potencialmente patogênicas (WILLIAMS & RUDENSKY, 2007).

1.3.1 Geração de células T reguladoras

Os estudos do grupo de Caton e colaboradores mostraram que a expressão de um TCR específico para antígenos próprios (autoreativo) é o principal requerimento para a diferenciação de células T reguladoras no timo (JORDAN

et al., 2001), uma vez que camundongos transgênicos que expressam o TCR HA (hemaglutinina do vírus influenza), que reconhece hemaglutinina (antígeno exógeno), não são capazes de gerar células Tregs intratímicas (CATON *et al.*, 2004).

Foi inicialmente proposto que esta interação é maior do que a necessária para a seleção positiva de linfócitos T convencionais e menor do que a requerida para a deleção de clones autorreativos no timo (revisto por MUCIDA *et al.*, 2009) (Esquema 1). No entanto, os fatores e interações que afetam o desenvolvimento intra-tímico das células Treg ainda são muito discutidos (HSIEH, LEE & LIO., 2012). O paradigma atual sugere que diversos fatores estão envolvidos na geração de células T reguladoras naturais tais como: a afinidade da molécula de TCR com o complexo MHC-Ppróprio apresentado por APCs, a avidéz da interação célula T-APC, além do tamanho do “nicho” de células Treg antígeno específicas, que é geralmente determinado pelo número total de APCs apresentando determinado antígeno próprio (revisto por HSIEH, LEE & LIO., 2012).

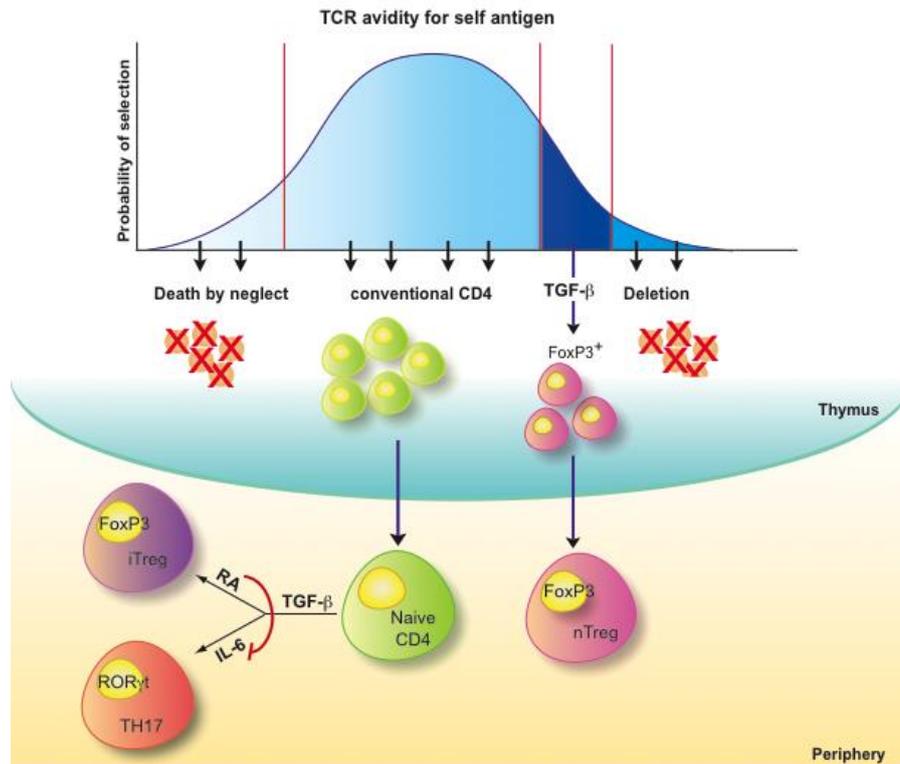
Outros fatores também foram propostos como capazes de influenciar o desenvolvimento de células Tregs no timo. Um deles é o gene *Aire* (regulador de auto-imunidade), responsável por direcionar a expressão de proteínas periféricas tecido-específicas principalmente no epitélio medular tímico (ANDERSON *et al.*, 2002). Uma vez que camundongos deficientes em *Aire* desenvolvem uma série de patologias auto-imunes, é possível que esse gene seja capaz de afetar o desenvolvimento de células T reguladoras antígeno-específicas (ANDERSON *et al.*, 2005).

Células T virgens na periferia também podem adquirir a expressão de Foxp3 e conseqüentemente a função de células Treg, como evidenciado em diversos protocolos experimentais. O grupo de Lafaille, por exemplo, identificou o fenômeno de conversão periférica *in vivo* através de transferências de células T CD4⁺CD25⁻ para hospedeiros linfopênicos RAG *Knock-out*. A intensa proliferação induzida no ambiente linfopênico foi considerada um fator que favoreceu a conversão periférica (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2004). Essas células que foram convertidas na periferia para o perfil regulatório são

caracterizadas como células T reguladoras induzidas (iTreg) com expressão de Foxp3 e mesma função das nTreg (revisto por AKBAR *et al.*, 2007).

Outros trabalhos mostraram a importância de algumas citocinas nesta conversão periférica. A citocina TGF- β , na presença de IL-2, por exemplo, é capaz de induzir a expressão de CD25 e Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁻ virgens e de memória (ZHENG *et al.*, 2007). Por outro lado, o TGF- β na presença de outras citocinas, como a IL-6 e IL-21, induz a diferenciação de células T virgens em células pró-inflamatórias Th17, caracterizadas pela produção da citocina IL-17, capazes de gerar autoimunidade e inflamação (KIN, 2008).

O ácido retinóico, um metabólito da vitamina A obtida da dieta, também foi descrito como um regulador chave nas respostas imunes dependentes de TGF- β . A expressão de genes que promovem a diferenciação de células T virgens ao perfil de células T reguladoras ou Th17 parece ser controlada por uma via dependente de ácido retinóico, capaz de inibir a diferenciação de células Th17 pró-inflamatórias e promover a geração periférica de células Treg Foxp3⁺ anti-inflamatórias no tecido intestinal (MUCIDA *et al.*, 2007). Células dendríticas dos linfonodos mesentéricos e da lâmina própria são especialmente favoráveis à indução de células Treg Foxp3⁺ antígeno-específicas por TGF- β e ácido retinóico, ressaltando o papel do intestino com um sítio extra-tímico relevante para a diferenciação periférica de células Treg (COOMBES *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007).



Esquema 1: **Desenvolvimento de células T reguladoras naturais (nTreg) e induzidas (iTreg).** Células nTreg são selecionadas por sua alta avididade por peptídeos próprios e adquirem a expressão de Foxp3. Alternativamente, células T CD4⁺Foxp3⁻ podem ser convertidas na periferia a células iTregs em resposta a antígenos próprios e não-próprios encontrados na periferia. TGF- β é capaz de promover na presença da citocina inflamatória IL-6, o desenvolvimento de células pró-inflamatórias Th17. No entanto, TGF- β na presença do metabólito da vitamina A, ácido retinóico (RA), promove a diferenciação para células iTreg Foxp3⁺ anti-inflamatórias e inibe a produção de Th17 (Esquema retirado de MUCIDA *et al.*, 2009).

Alguns autores acreditam que as células T virgens recém emigradas do timo (RTE) são mais suscetíveis ao recrutamento para uma função regulatória (MODIGLIANI *et al.*, 1996). Já outros autores acreditam que a geração periférica de Treg ocorre a partir do compartimento de células T de memória (AKBAR *et al.*, 2007).

Em relação ao repertório, estudos que usaram camundongos com uma diversidade limitada de TCR, revelaram que os repertórios das células Treg e T convencionais CD4⁺CD25⁻ são amplamente diversos, com apenas uma pequena sobreposição e que apenas as células T reguladoras CD25⁺ exibem uma alta frequência de TCR com avididade aumentada contra peptídeos próprios ligados a moléculas MHCII. (PACHOLZKY *et al.*, 2006, WONG *et al.*, 2007, HSIEH *et al.*, 2004). Além disso, foi visto que células T convencionais, construídas para

expressar TCRs isolados de células Treg, apresentaram uma alta capacidade de expansão e uma melhor eficiência de interação com complexos MHC-Ppróprio, apresentados por APCs periféricas após transferência para camundongos linfopênicos, sugerindo que uma grande proporção das células nTreg reconhecem constitutivamente antígenos próprios, sendo portanto cronicamente estimuladas no compartimento periférico (HSIEH *et al.*, 2004).

Em adição, alterações no repertório das células Treg no compartimento periférico, através da incorporação de novos clones por conversão periférica, ao longo do tempo, podem ganhar importância especialmente se a ação supressora destas células for TCR-específica.

1.4 Controle homeostático do compartimento periférico de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Em condições normais, o número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras no compartimento periférico é mantido relativamente constante durante grande parte da vida de um animal, indicando que a morte das células ajuda a manter a homeostase de Treg. De fato, após estimulação antigênica, as células Treg podem diminuir a expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (YAMAGUCHI *et al.*, 2007). A presença de uma frequência maior de células Anexina⁺ entre as Treg, em comparação com a frequência obtida entre as células T convencionais também já foi descrita (CHEN *et al.*, 2012). No entanto, este controle parece diminuir no final da vida, uma vez que alguns autores já evidenciaram que a senescência fisiológica está relacionada com um aumento de células T reguladoras Foxp3⁺ (HAN *et al.*, 2009).

Segundo Sakaguchi, as células Treg Foxp3⁺ que migram para tecidos linfóides e não linfóides se tornam ativadas, proliferam, exercem atividade supressora, e depois morrem. Já foi demonstrado que a maioria das células Treg em adultos expressa marcadores de células ativadas CD45RO (AKBAR *et al.*, 2003; TAAMS *et al.*, 2001). Entretanto, alguns estudos têm identificado uma subpopulação de células Treg CD4⁺ murinas que expressam a integrina $\alpha E\beta 7$ e apresentam características semelhantes a células efetoras ($\alpha E^+ CD25^+$) ou de memória ($\alpha E^+ CD25^-$) (HUEHN *et al.*, 2004; HUEHN *et al.*, 2005; SIEWERT *et al.*,

2008), sendo capazes de sobreviver no compartimento periférico por um período mais prolongado. Huehn e colaboradores sugerem que esse fenótipo é adquirido como consequência da expansão e proliferação na periferia de células T (HUEHN *et al.*, 2004).

Ainda não está claro se as células Treg α_E^+ de memória são originadas após as células Treg $\alpha_E^-CD25^+$ (Treg virgens) encontrarem seu antígeno cognato na periferia e sofrerem ativação ou se as células Treg de memória α_E^+ podem ser originadas a partir de células T $CD4^+$ convencionais sob condições tolerogênicas adequadas. Segundo Siewert as duas vias parecem ser importantes para a aquisição desse fenótipo (SIEWERT *et al.*, 2008). Além disso, outro estudo também mostrou que camundongos idosos apresentam um aumento de células de memória ($CD44^+$) e que estas seriam posteriormente convertidas em células T reguladoras $Foxp3^+$. Entretanto, também é discutido que apesar do aumento dessas duas subpopulações (memória e Treg), um equilíbrio homeostático é atingido e que apenas células T com fenótipo virgem seriam diminuídas no compartimento periférico (HAN *et al.*, 2009).

De fato, também já foi demonstrado que protocolos experimentais de timectomia em animais adultos não resultam em uma redução no número de células T reguladoras periféricas, sugerindo que essa subpopulação apresenta mecanismos homeostáticos que controlam o seu tamanho mesmo na ausência de células emigradas do timo (PAPIERNIK *et al.*, 1998).

A população de células Treg no compartimento periférico compreende dois subtipos: as células Treg naturais que emigram do timo já expressando o fenótipo regulador (nTreg) e cerca de 30% de células Treg induzidas periféricamente (iTreg) (BAILEY-BUCKTROUT & BLUESTONE, 2011). Um fator de transcrição da família Ikaros, o Helios, foi identificado como um possível marcador para distinguir esses dois subtipos de células Treg, pois sua expressão parece ser predominante nas células nTreg derivadas do timo (THORNTON *et al.*, 2010). Entretanto, em trabalho mais recente, foi demonstrado que helios pode ser transientemente expresso em células T reguladoras induzidas (iTreg) após sua ativação e proliferação (VERHAGEN & WRAITH., 2010, AKIMOVA *et al.*, 2011). A busca por moléculas capazes de diferenciar cada uma das duas subpopulações (nTreg e iTreg) tem sido alvo de grande interesse por parte dos

pesquisadores. A neuropilina-1 (Nrp1) é uma das moléculas de superfície, recentemente proposta pelo grupo de Lafaille, como uma das candidatas para tal diferenciação, pois ela parece ser preferencialmente expressa em células nTreg e ausente em células T reguladoras induzidas (revisto por BILATE & LAFAILLE., 2012).

Não está muito bem estabelecido, se a proporção desses dois subtipos (Treg naturais e Treg induzidas ou adaptativas) é mantida inalterada após a involução tímica em indivíduos adultos. É possível que uma baixa emigração tímica de células Treg naturais favoreça o predomínio de células Treg adaptativas. Alternativamente, a população de células Treg naturais é capaz de manter sua frequência original através de uma taxa aumentada de proliferação, o que pode ser importante para a preservação da auto-tolerância, uma vez que seu repertório tímico foi caracterizado como mais específico para peptídeos próprios (JORDAM *et al* 2001 e PACHOLCZYK, KRAJ & IGNATOWICZ, 2002). Recentemente foi demonstrado que ambos os subtipos de células Treg são necessários para preservar a auto-tolerância (HARIBHAI *et al*, 2011).

Os fatores que induzem sobrevivência e proliferação de células Treg naturais parecem ser distintos daqueles utilizados por outras subpopulações de células T CD4⁺CD25⁻. A presença do auto-antígeno na periferia tem sido um dos requerimentos sugeridos para a expansão e persistência de células T reguladoras na periferia. Foi sugerido que interações entre TCR e moléculas de MHC de classe II seriam importantes para a proliferação homeostática de Treg (GAVIN *et al.*, 2002).

Tang e colaboradores acreditam que sinais co-estimulatórios também são importantes, visto que camundongos tratados com anticorpos bloqueadores de CD80 e CD86 apresentam uma diminuição no número de Treg na periferia (TANG *et al.*, 2003).

Diminuições no número de células Treg Foxp3⁺ também são citadas em camundongos deficientes em TGF-β1 e TGF-β2. A carência de uma sinalização por TGF-β ocasiona frequentemente lesões autoimunes letais que podem ser decorrentes de alterações no balanço de células Treg (LI *et al.*, 2006).

Percentuais reduzidos de células Treg também são descritos em camundongos deficientes da cadeia μ (carentes em linfócitos B maduros) sugerindo uma possível contribuição dos linfócitos B na homeostase periférica das células Treg (SUTO *et al.*, 2002).

Visto que as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ expressam a subunidade α do receptor de IL-2, não é de se estranhar que essa citocina também seja importante para a sua sobrevivência e proliferação. Camundongos deficientes em IL-2 apresentam reduções substanciais no número de células Treg do timo e de órgãos linfóides, como o baço e linfonodos (FONTENOT *et al.*, 2005). Além de ser crítica para a sobrevivência, a IL-2 também parece ser essencial para a atividade supressora de células Treg naturais. O compartimento de células T CD4⁺ está fortemente indexado ao de células T reguladoras. Deste modo, assumindo que a principal fonte de IL-2 sejam as células ativadas, existe um controle por *feedback* (retroalimentação) negativo da resposta imune via IL-2; que consiste na produção de IL-2 por células T não reguladoras ativadas contribuindo para a manutenção, expansão, e ativação de células Treg naturais, as quais, por sua vez, limitam a expansão de células T não reguladoras (BARRAT *et al.*, 2002). A diminuição do número de efectoras, por sua vez, leva a uma menor quantidade de IL-2 disponível com conseqüente diminuição do número de Treg. Essa diminuição das Treg possibilita, então, que o número de T efectoras volte ao normal (revisto por ALMEIDA *et al.*, 2005).

A ruptura desse controle mediado por IL-2 promove o desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias. Além disso, a manipulação desse controle pode influir na intensidade das células Treg em mediar supressão, desta forma modificando várias respostas imunológicas.

Além da IL-2, fatores específicos como TGF- β e moléculas co-estimulatórias B7 tem sido identificados como essenciais para a manutenção do compartimento de células T reguladoras CD4⁺ Foxp3⁺ (LI *et al.*, 2006; MARIE *et al.*, 2005; SALOMON *et al.*, 2000). Entretanto, a dependência de fatores homeostáticos clássicos como, por exemplo, a IL-7, ainda não está clara. Alguns estudos relataram que essa citocina parece não ser tão essencial quanto IL-2, uma vez que sua deficiência não altera o número de células Foxp3⁺, nem produz auto-imunidade (revisto por SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Entretanto, alguns grupos

investigaram recentemente o papel da IL-7 na homeostase de células Treg *in vivo* e demonstraram que esta citocina é capaz de regular o tamanho do pool periférico de células T reguladoras, aumentando sua expansão no compartimento periférico, mesmo na ausência de células T convencionais (Tconv) (SIMONETTA *et al.*, 2012). Estes resultados descartam, portanto, a possibilidade da expansão de Treg ser mediada por fatores secretados por Tconv e não propriamente pela IL-7. Outro estudo mostrou que a IL-7 periférica não é apenas necessária para a sobrevivência de células T reguladoras, mas também para a expressão de Foxp3 (KIM *et al.*, 2012).

A competição por recursos importantes para a sobrevivência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ residentes e as que emigram constantemente do timo deve ser crítica na seleção do repertório de células T reguladoras presentes no compartimento periférico.

Diante da importância das células Treg em controlar clones autoimunes e respostas exacerbadas a antígenos exógenos, acredita-se que os mecanismos homeostáticos que controlam a sobrevivência desta subpopulação funcionem, por um lado, preservando uma parte do repertório, importante para controlar clones presentes no período neonatal, mas ao mesmo tempo, permitindo a entrada de outras células com novas especificidades, capazes de controlar clones autorreativos que surgem ao longo de toda a vida.

Estudos prévios já relataram que as células T neonatais correspondem a uma população com características diferentes das células T encontradas em indivíduos adultos (ARNOLD *et al.*, 2005). Desta forma dedicaremos o próximo capítulo a uma breve introdução desta subpopulação particular.

1.5 Características das células T neonatais

Neonatos são particularmente suscetíveis a infecções, e a imaturidade do compartimento de células T CD4⁺ neonatais pode ter um papel central nessa maior suscetibilidade (revisado por ADKINS 2007).

Experiências da década de 1950 (BILLINGHAM, BRENT *et al.*, 1953) revelaram que esse período também é especial com relação à indução de tolerância, uma vez que o contato, nesta idade, com células que expressam

epítomos alogênicos confere tolerância a enxertos do mesmo doador quando o hospedeiro se torna adulto. Apesar de seus resultados continuarem válidos, os mecanismos que participam da indução e manutenção dessa tolerância ainda não são claramente compreendidos. Segundo Field e colaboradores (FIELD, GAO *et al.*, 1997; GAO, ROUSE *et al.*, 1999), a tolerância induzida através do protocolo de Medawar poderia ser atribuída à geração de células Treg CD4⁺CD25⁺. Neste trabalho, os autores verificaram que estas células estavam presentes em concentração alta no animal tolerante e eram essenciais para a transferência da tolerância para novos animais.

Estudos prévios utilizando CD25 como um marcador de células T reguladoras sugeriram que o timo imaturo, de animais com menos de três dias de idade, produz poucas células Treg CD25⁺ comparado a um timo adulto (ASANO *et al.*, 1996). Entretanto, estes resultados foram subsequentemente questionados por outros estudos demonstrando a presença de números consideráveis de células T CD25⁺ em neonatos e um número grande de células T CD4⁺CD25⁺ em animais adultos que foram submetidos à timectomia no terceiro dia de vida (DUJARDIN *et al.*, 2004). Uma comparação direta entre a expressão de Foxp3 e CD25 durante a ontogenia revelou que o aparecimento desses marcadores em timócitos CD4SP não apresenta uma correlação perfeita. O grupo de Rudensky observou que no primeiro dia após o nascimento, aproximadamente 4% dos timócitos CD4SP expressavam CD25, enquanto apenas 0,1% expressavam Foxp3 (FONTENOT *et al.*, 2005). Os autores observaram também que ocorre um aumento na proporção de timócitos Foxp3⁺ entre os dias 3 e 4 pós-nascimento, atingindo um platô em aproximadamente 3 semanas de idade. Essas observações podem explicar porque a timectomia no terceiro dia de vida induz severas doenças autoimunes em roedores.

Ainda não está claro porque o timo neonatal é menos eficiente do que o timo adulto em suportar o desenvolvimento de células T reguladoras. Análises histológicas da localização de células Treg em um timo em desenvolvimento revelaram que as células Foxp3⁺ residem primariamente dentro da medula, e que o aumento da produção de timócitos Foxp3⁺ durante o período neonatal é coincidente com a maturação da medula tímica (FONTENOT *et al.*, 2005).

Além de características peculiares inerentes à subpopulação reguladora, diferenças substanciais no compartimento periférico e em outras subpopulações celulares no período neonatal podem influir em homeostase periférica de células T. A linfopenia fisiológica presente em neonatos antes da colonização pelas primeiras células emigradas do timo pode ser importante para a expansão intensa, com conseqüente conversão de células T convencionais ao fenótipo Treg. Esta linfopenia é rapidamente corrigida com o auxílio da alta expressão pelos linfócitos T neonatais de IL-7R α permitindo uma intensa proliferação quando a citocina IL-7 está presente (DARDALHON *et al.*, 2001).

A estimulação antigênica pela flora comensal também contribui para a proliferação homeostática e maturação do pool periférico das células T durante o período neonatal (revisto por ADKINS, 2007). Já foi visto que a colonização de animais com uma microbiota específica no período neonatal possui um impacto significativo no desenvolvimento do sistema imunológico (BJÖRKSTÉN *et al.*, 1999 e BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001). A colonização intestinal precoce por *Bacterioides fragilis* é importante para o desenvolvimento de células Treg Foxp3⁺ no intestino e bactérias filamentosas segmentadas estão relacionadas ao desenvolvimento de células Th17 inflamatórias na lâmina própria intestinal (ROUND *et al.*, 2010; IVANOV *et al.*, 2010), mostrando que o tipo de colonização presente no período neonatal pode influenciar a natureza da resposta imunológica na vida adulta. Desta forma, modificações na carga de peptídeos antigênicos na periferia com alto poder de seleção do repertório linfocitário e de conversão para o fenótipo Treg, podem ter implicações fisiológicas relevantes para o hospedeiro

Em camundongos a taxa de emigração tímica na vida neonatal é similar à encontrada na vida adulta (SCOLLAY *et al.*, 1980). Entretanto ainda não está claro se as RTEs neonatais são comparáveis às RTEs adultas e se o processo de maturação pós-tímica é similar.

Experimentos no final da década de 80 demonstraram que certas células portando receptores TCR V β deletados na vida adulta são ainda detectadas tanto no timo quanto no baço de camundongos neonatais (SCHNEIDER *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989). Células que expressam esses V β “proibidos” começam a declinar no timo no dia quatro após o nascimento (P4) e não são

mais detectáveis nesse órgão a partir do dia dez (P10) (SCHNEIDER *et al.*, 1989). Desta forma, o processo de deleção central aparentemente requer diversos dias pós-nascimento para se tornar completamente maduro. As bases para esse atraso no desenvolvimento são incertas, mas parecem ser devidas aos níveis limitantes de AIRE (ZUKLYS *et al.*, 2000).

GALLEGOS & BEVAN (2006) mostraram que células T expressando os V β “proibidos” são detectadas em tecidos periféricos algumas semanas após o nascimento. Uma consequência da saída destas células autorreativas é que elas podem ser ativadas na periferia e desencadear respostas efetoras voltadas para antígenos próprios. Entretanto essas células na ausência de estimulação parecem estar em estado quiescente. Foi visto que o tratamento de camundongos timectomizados com altas doses de IL-2 anulou a anergia dessas células *in vitro* e promoveu o desenvolvimento de autoimunidade *in vivo* (ANDREU-SANCHEZ *et al.*, 1991).

As razões para o atraso no desenvolvimento da tolerância central ainda não são completamente entendidas. No entanto, pode-se especular que, no início da vida poderia ser perigoso deletar qualquer especificidade de TCR, uma vez que os neonatos encontram muitos antígenos novos. Quando esses “novos” antígenos são agentes patogênicos infecciosos a ausência de uma resposta poderia ser uma ameaça à vida. Portanto, para montar uma resposta primária eficiente a novos micróbios encontrados, deve ser importante ter tantas especificidades quanto possíveis nos tecidos periféricos (revisto por ADKINS, 2007)

Além disso, já foi relatado que em camundongos, a enzima TDT (responsável pela inserção de nucleotídeos nos TCRs), é pobremente detectada nos órgãos hematopoiéticos fetais e não está completamente expressa em timócitos em desenvolvimento até o dia 3-5 pós-nascimento (GREGORIE *et al.*, 1979; BOGUE *et al.*, 1992; ROTHENBERG & TRIGLIA, 1983). Como consequência, as cadeias de TCR formadas durante a vida fetal e pós-natal não apresentam adições significativas na região N do CDR3, formando desta forma células com uma menor diversidade (BOGUE *et al.*, 1991; FEENEY, 1991). No entanto, as respostas à infecção ou imunização parecem ser normais em camundongos deficientes em TDT. A ausência das regiões N não compromete

nem a qualidade nem a intensidade da resposta imunológica (revisto por ADKINS 2007). Foi visto que clones deficientes em TDT são geralmente multirreativos e apresentam uma capacidade de reatividade cruzada a peptídeos muito maior do que os clones selvagens. A natureza promiscua do TCR em neonatos normais parece ser importante para permitir proteção contra patógenos durante este período (GARCIA *et al.*, 2000), permitindo que um pequeno número de células T periféricas seja suficiente para montar respostas efetivas após uma imunização ou infecção (CONDE *et al.*, 1998; FEENEY *et al.*, 2001; ROBEY *et al.*, 2004). Esses autores também especulam que o repertório neonatal seria deficiente em células autorreativas com afinidade alta o suficiente para induzir doença.

Considerando essas diversas características, peculiares ao compartimento periférico presente no período neonatal, é possível que a dinâmica populacional das células Treg também tenha características próprias, diferentes das encontradas no adulto.

A cinética de substituição das primeiras células RTE que colonizam a periferia no período neonatal ainda não foi bem estudada, principalmente em relação à população reguladora. Foi sugerido que as primeiras células Treg emigradas do timo durante o período neonatal seriam responsáveis por estabelecer um repertório de memória que garante a tolerância periférica a tecidos próprios, de forma infecciosa, através do recrutamento de novas células para o fenótipo Treg (QIN *et al.*, 1993 ; MODIGLIANI *et al.*, 1996).

O conceito de tolerância infecciosa prediz que uma vez induzida a tolerância a um determinado enxerto de pele, este fenômeno pode ser transferido para animais singênicos. Ou seja, animais virgens que recebem células CD4⁺ de animais tolerizados, também se tornam tolerantes ao mesmo enxerto de pele, daí o nome de tolerância “infecciosa”.

Levando-se em conta que o timo libera diariamente novas células Treg no compartimento periférico, será que essas primeiras células Treg que chegam à periferia no período neonatal são mantidas por longo período e se tornam células Treg de memória? Por outro lado, se for importante a aquisição de um repertório diverso, uma parcela das células Treg residentes deveria ser constantemente

substituída, permitindo que novas células Treg sejam incorporadas. A cinética de renovação das células Treg é diferente no período neonatal e no adulto?

Se a especificidade é essencial para a função supressora das células Treg em diversas respostas imunológicas, é importante que a sua homeostase favoreça a manutenção de um repertório capaz de preservar clones que mantêm a tolerância periférica adquirida no período neonatal e de permitir a incorporação de novas especificidades que irão controlar, por exemplo, clones autorreativos ou respostas efectoras exacerbadas que surgem ao longo de toda a vida.

Como já foi estabelecido que células de idade neonatal apresentam um repertório de TCR mais multirreativo quando comparado ao das células de um animal adulto, é possível que características peculiares inerentes à população neonatal favoreçam sua sobrevivência no compartimento periférico. Outra hipótese estaria relacionada ao compartimento periférico. Pode ser possível que a presença da linfopenia seja uma condição determinante para a incorporação e manutenção de células T reguladoras de idade neonatal.

Desenvolvemos este trabalho com o intuito de contribuir para o conhecimento a respeito da persistência de células Treg naturais CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em diferentes idades e para entender como a homeostase no compartimento periférico possibilita tanto a manutenção de uma memória da tolerância ao próprio, quanto à renovação contínua do repertório de células Treg. Esse conhecimento poderá auxiliar na busca de estratégias terapêuticas, que corrijam o balanço homeostático de células T reguladoras, capazes de recuperar a tolerância a tecidos próprios em diferentes patologias.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a dinâmica populacional de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ de camundongos neonatos e adultos no compartimento periférico.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a taxa de substituição de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) e não Treg (CD4⁺Foxp3⁻) no compartimento periférico em diferentes idades
- Analisar o potencial de expansão e competição de células Treg de diferentes idades (adultas e neonatais) na periferia.

3 Materiais e Métodos

3.1 animais

Camundongos F1 (BALB/c x C57Bl/6) nu/nu (F1 nu/nu) foram utilizados aos 30 dias de idade como hospedeiros de enxertos de lobos tímicos de camundongos eutímicos F1 (BALB/c x C57Bl6.Ba) Thy1.1⁺/1.2⁺ adultos ou neonatais (P2 a P5) ou de populações celulares de camundongos eutímicos F1 (BALB/c x C57Bl/6) Thy1.2⁺ e F1 (BALB/c x C57Bl6.Ba) Thy1.1⁺/1.2⁺.

As colônias de camundongos nu/nu e dos doadores são mantidas, em um biotério próprio, com micro-isoladores, pressão positiva e entrada de ar filtrado (Sterilflow Filtracom) e recebem ração e água autoclavadas. Todos os protocolos propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal Fluminense.

3.2 Enxertos de timo

O procedimento cirúrgico foi feito em condições estéreis após administração intraperitoneal dos anestésicos Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/Kg) em animais F1nu/nu com 30 dias de idade.

Uma pequena incisão dorsolateral foi feita para expor o rim, e um pequeno orifício foi feito na cápsula renal. Lobos tímicos neonatais P(2 a 5) (10 ou 6 lobos tímicos/animal) ou adulta (1/2 lobo tímico/animal) de F1 (BALB/c x C57Bl6.Ba) Thy1.1⁺/1.2⁺ foram colocados lado a lado, abaixo da cápsula renal dos hospedeiros nudes.

3.3 Preparo e Transferência de populações linfóides

Suspensões estéreis de timócitos de doadores adultos (30-60 dias) ou neonatais (P5) foram maceradas mecanicamente em solução de Hanks' (HBSS – Invitrogen), em placas de petri, utilizando peneiras plásticas. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos de 15mL e lavadas com Hank's em centrifugação a 1200rpm/6min. O número de células viáveis foi contado em solução de azul de tripan a 0,1% em hematocitômetro (câmara de Neubauer) e as concentrações celulares ajustadas conforme o protocolo a ser utilizado.

Todas as transferências foram realizadas por via endovenosa, através do plexo retro-orbitário de camundongos atímicos com aproximadamente 30 dias.

3.4 Estudo de marcadores de superfície por imunofluorescência

Análise das populações presentes no sangue e, em alguns animais, também em populações linfóides periféricas (baço, linfonodo mesentérico (MLN) e linfonodos periféricos (pLN) foi feita por imunofluorescência. As amostras de sangue foram coletadas em heparina (25UI/mL) e submetidas à centrifugação (2000rpm/20min) em gradiente de Ficoll (Histopaque 1083, Sigma). A fração leucocitária foi recolhida e lavada com PBS. Após a centrifugação (2000rpm/10min), as células foram utilizadas para marcação.

Antes de iniciar a marcação, as células foram incubadas com solução PBS-2%FCS- 10% soro camundongo por 5 a 10 minutos. Após esta etapa de bloqueio, os anticorpos diluídos em PBS-FACS (PBS + 3% FCS) foram adicionados. Ao fim de 30 minutos de incubação no gelo e no escuro, as células foram lavadas uma vez em PBS-FACS (150uL/poço) e uma vez em PBS sem soro (150uL/poço) e fixadas em PBS-1% Formaldeído.

Os anticorpos monoclonais específicos para marcadores fenotípicos de superfície utilizados foram adquiridos da eBioscience: *fluorescein isothiocyanate* (**FITC**) anti-Thy-1.1 (OX-70) ou *allophycocyanin* (**APC**) anti-Thy1.1 (HIS51); FITC-anti-CD4 (GK1.5) ou APC-anti-CD4 (GK1.5); *phycoerythrin* (**PE**) anti-CD25 (PC61.5) ou APC-anti-CD25 (PC61.5), *peridinin chlorophyll protein* (**PerCP**) anti-CD45.1 (A20), PE-anti-CD44 (IM7). *streptavidin* conjugada ao fluorocromo PEcy7- , PEcy5.5- , PE- , ou APC foi usada em conjunto com o anticorpo monoclonal biotilado anti-Foxp3 (FJK-16s).

Para a marcação com Foxp3, utilizamos o kit da eBioscience (tampões de fixação e permeabilização), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram fixadas (após marcação de superfície) durante 40 minutos no gelo e no escuro com 100uL de *FixPerm 1X* (Kit e-Bioscience), centrifugadas a 1200 rpm/6min e posteriormente lavadas com 100uL de *Permeabilization Buffer*. A incubação com Anti-Foxp3-APC, anti-Foxp3-PE ou Foxp3-Alexa647 (todos FJK-16s), foi feita no gelo e no escuro por 40 minutos, e posteriormente lavada mais duas vezes com *Permeabilization Buffer 1X* e ressuspensas em 200uL de PBS.

A leitura das marcações foi feita em citômetro de fluxo C6 Flow Cytometer –BD Accuri® utilizando o programa CFlow plus. A análise dos dados foi feita pelo programa flowjo software (Treestar).

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo software Prism5 (GraphPad). Utilizando o teste *t* de student's e one-way ANOVA com Bonferroni's post-test. As amostras foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de *p* foram menores do que 0,05 ($p < 0.05$).

4 Resultados

Visando estudar a dinâmica populacional de células T reguladoras $CD4^+Foxp3^+$ (Treg) em diferentes idades, elaboramos um protocolo que permite avaliar a competição na periferia entre as primeiras células T emigradas do timo enxertado e sua posterior substituição por novas células potencialmente competidoras no compartimento periférico (Figura 1).

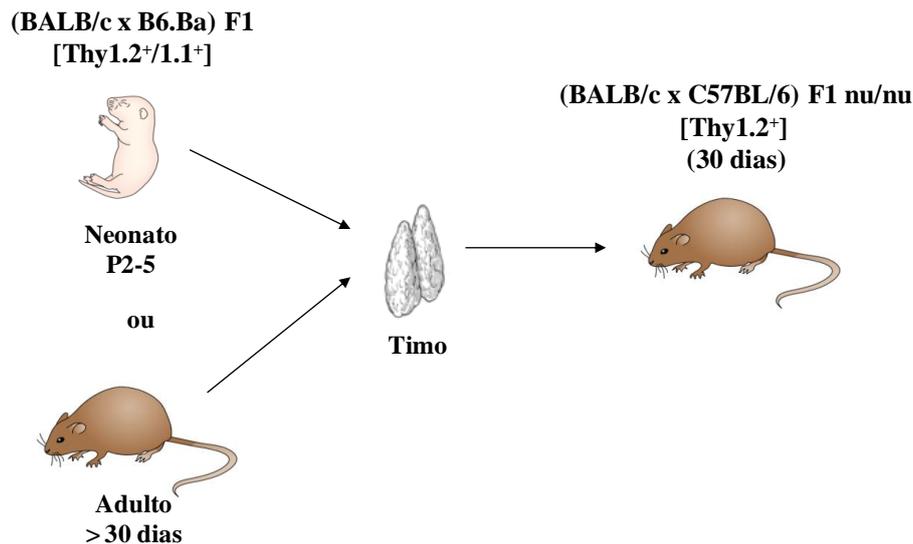


Figura 1: Protocolo experimental: Camundongos atímicos F1nu/nu (F1Thy-1.2⁺) de 30 dias de idade foram enxertados com lobos tímicos de doadores F1 (BALB/c x B6.Ba) (Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺) de idades neonatal ou adulta na cápsula renal. Cerca de 30 dias após o enxerto, verificamos a presença de células da população proveniente do timo colonizado (Thy-1.2⁺/1.1⁺) e da população proveniente do hospedeiro (Thy-1.2⁺/1.2⁺), após diferenciação no timo enxertado (Thy-1.2⁺) entre as células T $CD4^+$ totais e entre as células reguladoras (Treg) ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) e não reguladoras ($CD4^+Foxp3^-$) por imunofluorescência de alíquotas de sangue periférico.

Com este protocolo, objetivamos verificar a capacidade de persistência das células T reguladoras, comparada à persistência de células T não reguladoras quando populações policlonais de idades neonatal ou adulta colonizam inicialmente um ambiente linfopênico singênico e avaliar sua eventual substituição por novas células, derivadas do hospedeiro, diferenciadas no órgão enxertado, que chegam posteriormente ao compartimento periférico.

A técnica de transplante de lobos tímicos já colonizados para camundongos linfopênicos permite estudar a renovação de linfócitos T, analisando a liberação de células pelo timo em frequências e períodos que se aproximam (simulam) a situação fisiológica.

Dados da literatura utilizando o modelo de enxertos de timo fetal ou de neonato em camundongos atímicos mostram que até quatro semanas após o transplante, a maioria das células presentes na periferia são derivadas da população que colonizava inicialmente o timo do doador (THOMAS-VASLIN *et al*,1997). Após esse período, aumenta a colonização periférica por células precursoras derivadas da medula óssea do hospedeiro atímico que se diferenciam no órgão enxertado. Desta forma é possível analisar, ao longo do tempo, a cinética de persistência e substituição de células provenientes de uma primeira onda de colonização por células derivadas de ondas posteriores.

Inicialmente, confirmamos o número absoluto de células presentes nos timos de idade adulta (P60) (120×10^6) e neonatal (P2) (15×10^6) de doadores eutímicos F1 (BALB/c x B6.Ba) (Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺).

Com a intenção de ajustarmos o número de lobos enxertados de modo a conter a mesma proporção de células CD4 simples positivas (CD4SP), avaliamos a frequência de células simples positivas para CD4 (CD4SP) e CD8 (CD8SP) presentes nas duas idades (Figura 2). A quantidade de lobos utilizada em cada grupo experimental está representada na tabela 1.

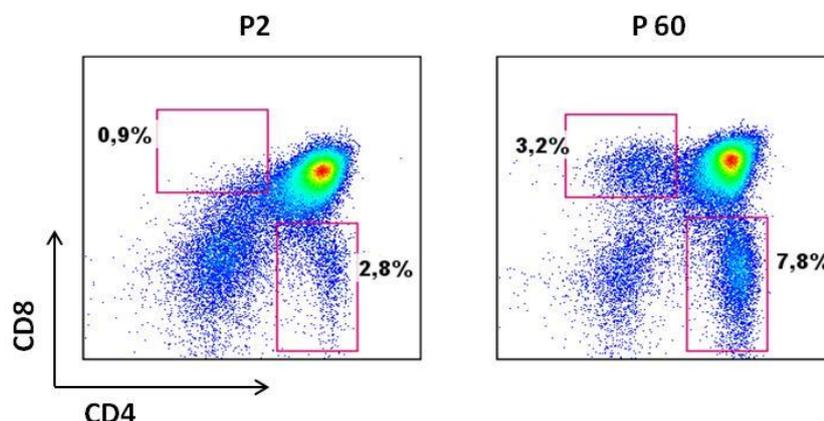


Figura 2: Frequência de timócitos em diferentes idades: Frequência de células T CD4SP e CD8SP presentes em um timo (2 lobos) de doadores F1 (BALB/c x B6,Ba) (Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺) de idade neonatal (P2) e adulta (P60). Os dados são representativos de três experimentos independentes com 3 animais em cada grupo (n=3).

	N° de lobos / N° de células	N° absoluto total de timócitos	N° de células CD4 ⁺ presentes nos lobos enxertados
Timo Adulto (P60)	2 lobos (120 x 10 ⁶)	½ lobo (30 x 10 ⁶)	2,34 x 10 ⁶ CD4SP
Timo Neonatal (P2)	2 lobos (15 x 10 ⁶)	10 lobos (75 x 10 ⁶)	2,1 x 10 ⁶ CD4SP

Tabela 1: Número de lobos enxertados em cada grupo experimental. Número absoluto de células presentes em dois lobos de timo adulto P(60) e neonatal P(2) e a quantidade de lobos enxertados em cada grupo experimental. O cálculo do número de lobos foi feito levando em consideração a frequência relativa de células CD4SP em cada idade, assim como o número absoluto, com o intuito de obter no final número equivalente de células CD4SP.

Avaliamos também a frequência de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ presentes nos timos de idade neonatal (P2) e adulta (P60) entre as células CD4SP (Figura 3).

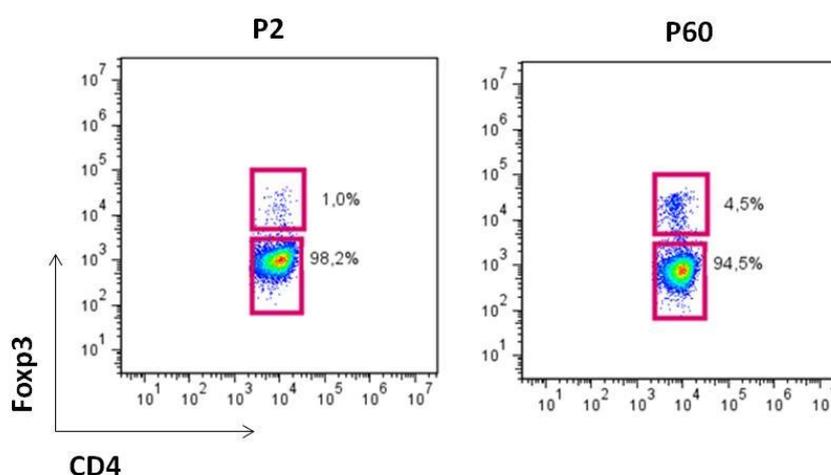


Figura 3: Frequência de células T reguladoras. Frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ entre os timócitos CD4SP de camundongos F1 (BALB/c x B6.Ba) (Thy1.2⁺/Thy1.1⁺) de idade neonatal (P2) e adulta (P60). Os dados são representativos de três experimentos independentes com 3 animais em cada grupo (n=3).

Após o transplante de ½ lobo tímico de adulto e 10 lobos tímicos de neonato na cápsula renal dos hospedeiros linfopênicos, a frequência total de células CD4⁺ foi avaliada, através de imunofluorescência de sangue periférico trinta, sessenta e noventa dias após o enxerto.

A frequência expressiva de populações CD4 simples positivas confirmou a expansão e persistência das células provenientes do timo transplantado durante os meses investigados.

Observamos que nos animais que receberam timo adulto, os valores totais de células T ainda estão abaixo dos observados em camundongos eutímicos normais, o que está de acordo com os dados descritos por ROCHA *et al* (1989), demonstrando que o compartimento periférico linfopênico não é completamente preenchido após a transferência de linfócitos T. Entretanto, o grupo que recebeu timo neonatal, além de ter sofrido uma expansão mais acentuada, parece atingir frequências semelhantes às observadas em um animal eutímico, no segundo mês e, apesar da discreta redução no terceiro mês, suas frequências continuam sendo maiores do que as observadas no grupo de animais que receberam timo adulto (Figura 4A)

Noventa dias após o transplante dos lobos tímicos, a frequência de células CD4⁺ nos hospedeiros que receberam timo neonatal continua sendo significativamente maior na maioria dos órgãos avaliados, com exceção do baço, que apresentou semelhança entre os dois grupos estudados (Figura 4B).

Com o intuito de avaliar se as diferenças observadas nas frequências de células T CD4⁺, no compartimento periférico dos animais enxertados com timo neonatal e adulto, influenciariam na cinética de substituição de células T provenientes do doador (Thy1.1⁺), avaliamos o sangue periférico, trinta, sessenta e noventa dias após o transplante dos lobos tímicos, nos dois grupos experimentais.

Verificamos que as células derivadas do timo adulto parecem sofrer um atraso na substituição por novas células provenientes do hospedeiro, uma vez que no segundo mês, a maioria das células CD4⁺ totais presentes no compartimento periférico, continua sendo composta por células derivadas do doador (Thy1.1⁺), e que apenas no terceiro mês, uma redução significativa é observada. Com relação aos enxertos de timo de neonato, a substituição é mais evidente. Após o primeiro mês, a maioria das células presentes na periferia é derivada do hospedeiro (Thy1.1⁻). Essa substituição, entretanto, não é total, e permite preservar uma frequência de células da primeira colonização (Thy1.1⁺),

que embora pequena, parece ser constante, pelo menos sessenta e noventa dias após o enxerto tímico (Figura 5).

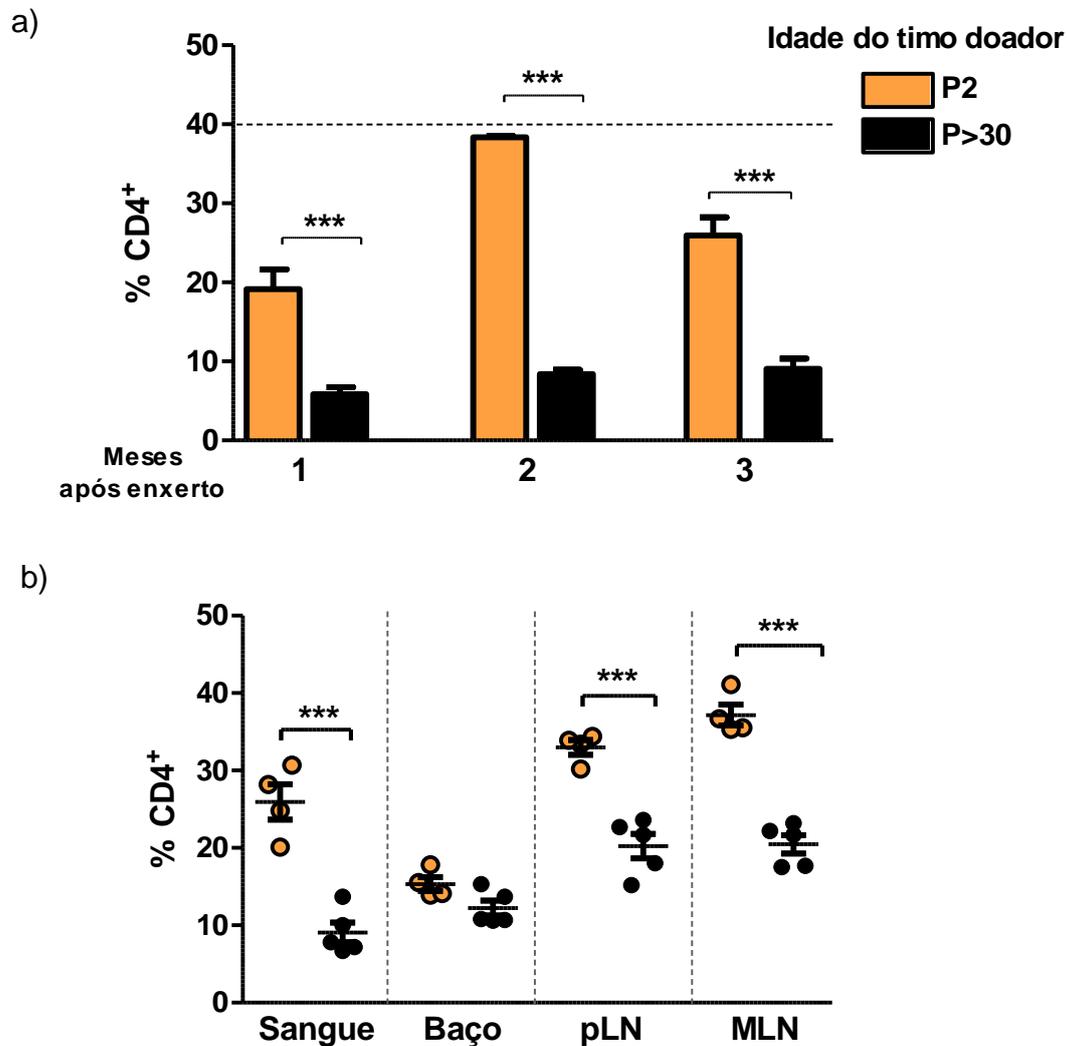


Figura 4: Células T derivadas de timo neonatal atingem frequências maiores de CD4⁺ no compartimento periférico. (A) Frequência de células T CD4⁺ no sangue periférico 1, 2 e 3 meses após o enxerto de timo neonatal ($n=4$) (barra laranja) ou adulto ($n=5$) (barra preta). A linha tracejada representa a frequência de células T CD4⁺ de um controle eutímico F1(BALB/c x B6.Ba). (B) Frequência de células T CD4⁺ no sangue, baço, linfonodos periféricos (pLN) e linfonodos mesentéricos (MLN), em todos os animais estudados, 3 meses após o enxerto de timo neonatal (círculos laranjas) ou adulto (círculos pretos) *** $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Dados são representativos de dois experimentos independentes.

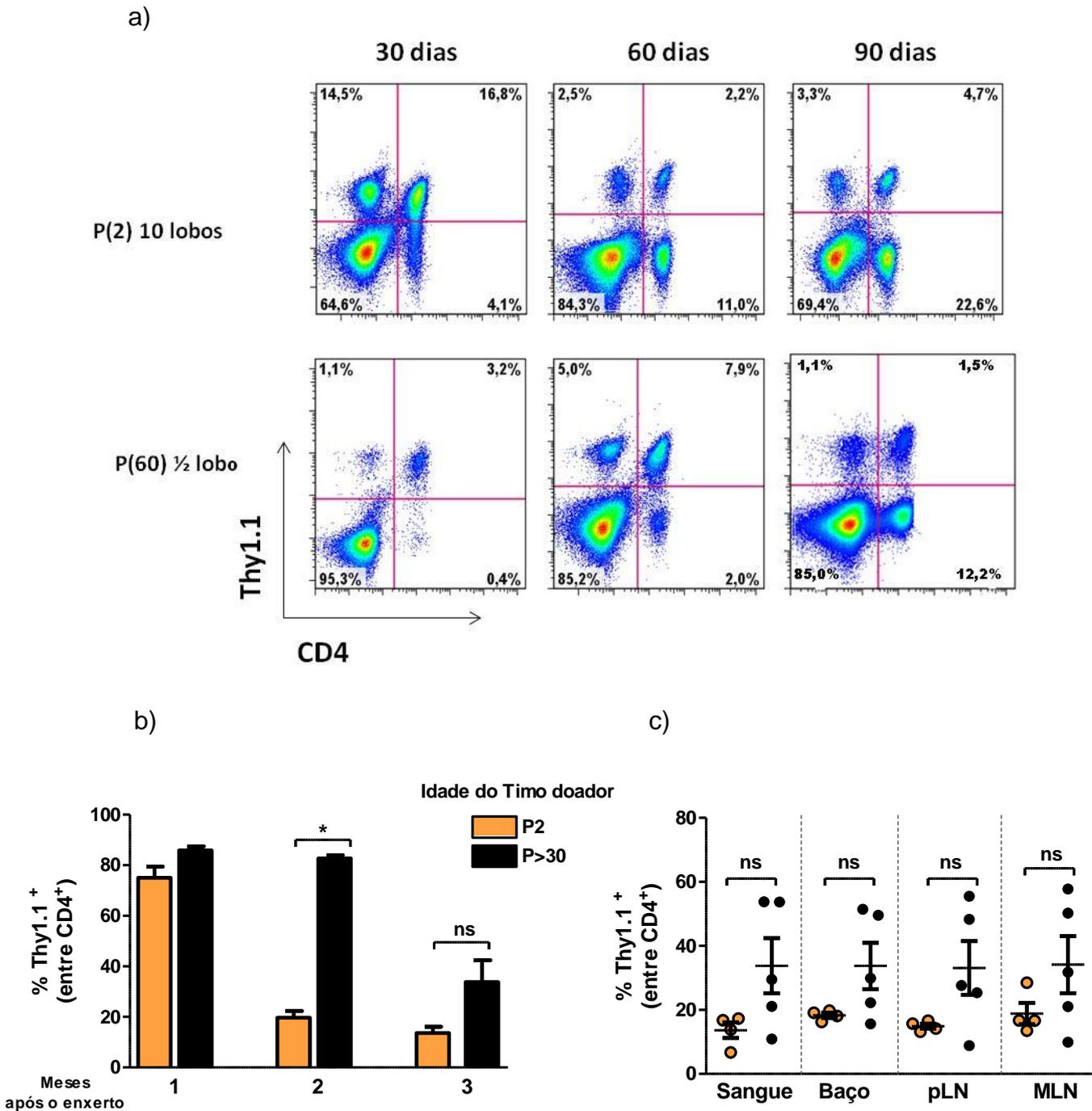


Figura 5: Células derivadas do timo doador neonatal são substituídas mais rapidamente.

Frequência de células T derivadas do doador (Thy1.1⁺) ou derivadas do hospedeiro (Thy1.1⁻) entre linfócitos totais 30, 60 e 90 dias após enxerto de timo neonatal (n=4) (10 lobos) ou adulto (n=5) (1/2 lobo). (A) Dotplots representativos de um animal por grupo (B) Frequência de células T derivadas do doador (Thy1.1⁺) no sangue de todos os animais estudados dos grupos que receberam timo de neonato (barra laranja) ou timo adulto (barra preta) (C) Frequência de células T derivadas do doador (Thy1.1⁺) no sangue, baço, pLN e MLN, 3 meses após o enxerto de timo neonatal (círculos laranjas) ou adulto (círculos pretos). ***P< 0,05 (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Para avaliarmos se esta cinética mais rápida de substituição das células de origem neonatal pelas células do hospedeiro ocorre mesmo quando aumentamos muito (em cerca de nove vezes) o número inicial de células CD4 SP contidas no enxerto, utilizamos doadores neonatos com cinco dias de idade P(5).

Decidimos utilizar em nosso protocolo, camundongos neonatos P(5), uma vez que a cápsula renal não comporta uma quantidade muito grande de lobos enxertados e a frequência de células CD4SP, nesse período, é semelhante à encontrada no timo adulto (além dos números absolutos não variarem significativamente) (Figura 6). Desta forma, seis (6) lobos tímicos de neonato P(5), contendo aproximadamente $17,0 \times 10^6$ de células CD4SP maduras foram utilizados como fontes de células capazes de colonizar o compartimento periférico (Tabela 2).

Os resultados obtidos são semelhantes aos que foram apresentados anteriormente, no qual se observou uma maior substituição de células derivadas do doador no grupo que recebeu timo de neonato. Essa substituição foi equivalente ao grupo que recebeu 2×10^6 CD4SP de P(2), sugerindo que a quantidade de células liberadas, em um primeiro momento, para a periferia não interfere, a princípio, em sua capacidade de persistência ou substituição (Figura 7).

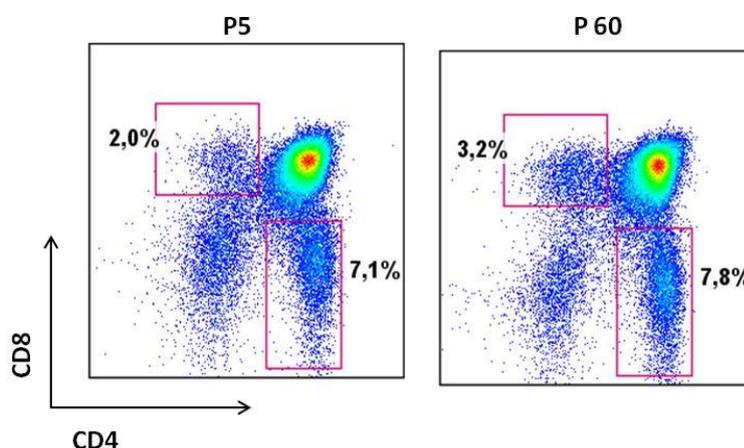


Figura 6: Frequência de timócitos: Frequência de timócitos CD4SP e CD8SP presentes em um timo (2 lobos) de doadores F1 (BALB/c x B6,Ba) (Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺) de idade neonatal (P5) e adulta (P60). Os dados são representativos de três experimentos independentes com 3 animais em cada grupo (n=3).

	N° de lobos / N° de células	N° absoluto total de tímócitos	N° de células CD4 ⁺ presentes nos lobos enxertados
Timo Adulto (P60)	2 lobos (120 x 10 ⁶)	½ lobo (30 x 10 ⁶)	2,34 x 10 ⁶ CD4SP
Timo Neonatal (P5)	2 lobos (80 x 10 ⁶)	6 lobos (240 x 10 ⁶)	17,0 x 10 ⁶ CD4SP

Tabela 2: Número de lobos enxertados em cada grupo experimental. Número absoluto de células presentes em dois lobos de timo adulto P(60) e neonatal P(5) e a quantidade de lobos enxertados em cada grupo experimental. O cálculo do número de lobos foi feito levando em consideração a frequência relativa de células CD4SP em cada idade, assim como o número absoluto, com o intuito de obter no final 9x mais células CD4SP do doador neonatal P5.

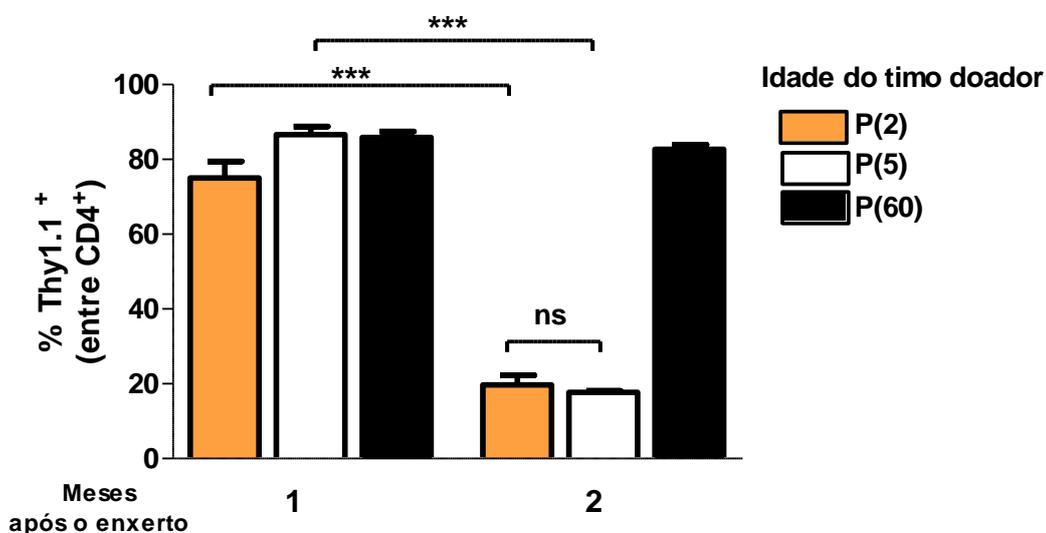


Figura 7: Células T derivadas de timo neonatal são substituídas mais rapidamente que as derivadas de um timo adulto, mesmo contendo 9x mais células CD4SP. Frequência de células T derivadas do doador (Thy1.1⁺) entre linfócitos CD4⁺ 30 e 60 dias após enxerto de timo neonatal P2 ($n=4$) (10 lobos) (barra laranja), P5 ($n=3$) (6 lobos) (barra branca) ou adulto ($n=5$) (1/2 lobo) (barra preta). *** $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Posteriormente, comparamos a dinâmica populacional de células T reguladoras e não reguladoras nos diferentes grupos (que receberam timo de neonato, em diferentes quantidades, ou timo adulto), no compartimento periférico de hospedeiros F1 nu/nu.

Trinta dias após o transplante dos lobos tímicos, observamos que a frequência de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ totais nos animais que receberam ½ lobo de timo adulto é 10x maior (aproximadamente 25%), no sangue periférico, do

que as observadas nos controles eutímicos e nos animais que receberam timo neonatal (P2 e P5). Estas frequências parecem estáveis, uma vez que no segundo mês não observamos modificações expressivas (Figura 8).

Como os resultados dos animais que receberam timo neonatal P2 ou P5 foram semelhantes, resolvemos compilar os resultados dos dois grupos em um único gráfico.

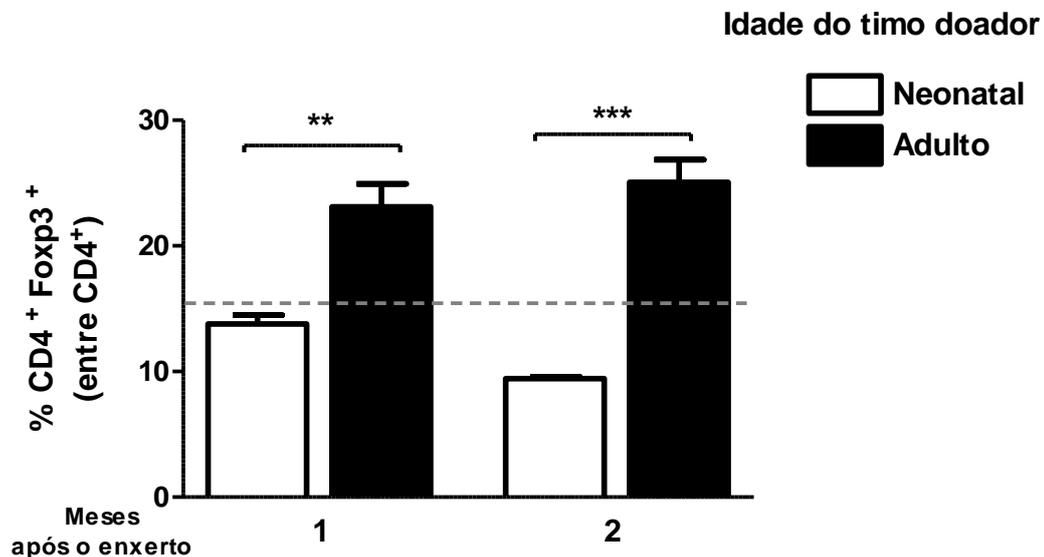


Figura 8: Células T reguladoras derivadas de timo adulto atingem frequência maior entre as CD4⁺ na periferia. Frequência de células T reguladoras totais entre os linfócitos CD4⁺ 30 e 60 dias após enxerto de timo neonatal ($n=7$) (barra branca) ou adulto ($n=5$) (barra preta). A linha tracejada representa a frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ de um controle eutímico F1 (BALB/c x B6.Ba). *** $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Em relação à população proveniente do timo transplantado (Thy1.1⁺) de adulto, observamos que ambas as populações, T reguladora (CD4⁺Foxp3⁺) e não reguladora (CD4⁺Foxp3⁻) são mais resistentes à substituição por novas RTEs, uma vez que dois meses após o enxerto suas proporções não sofreram modificações expressivas (Figura 9A e B). Ao contrário, quando comparamos ambas as populações nos grupos que receberam timo neonatal (P2 e P5) observamos que suas frequências reduzem após o primeiro mês (Figura 10 A e B)

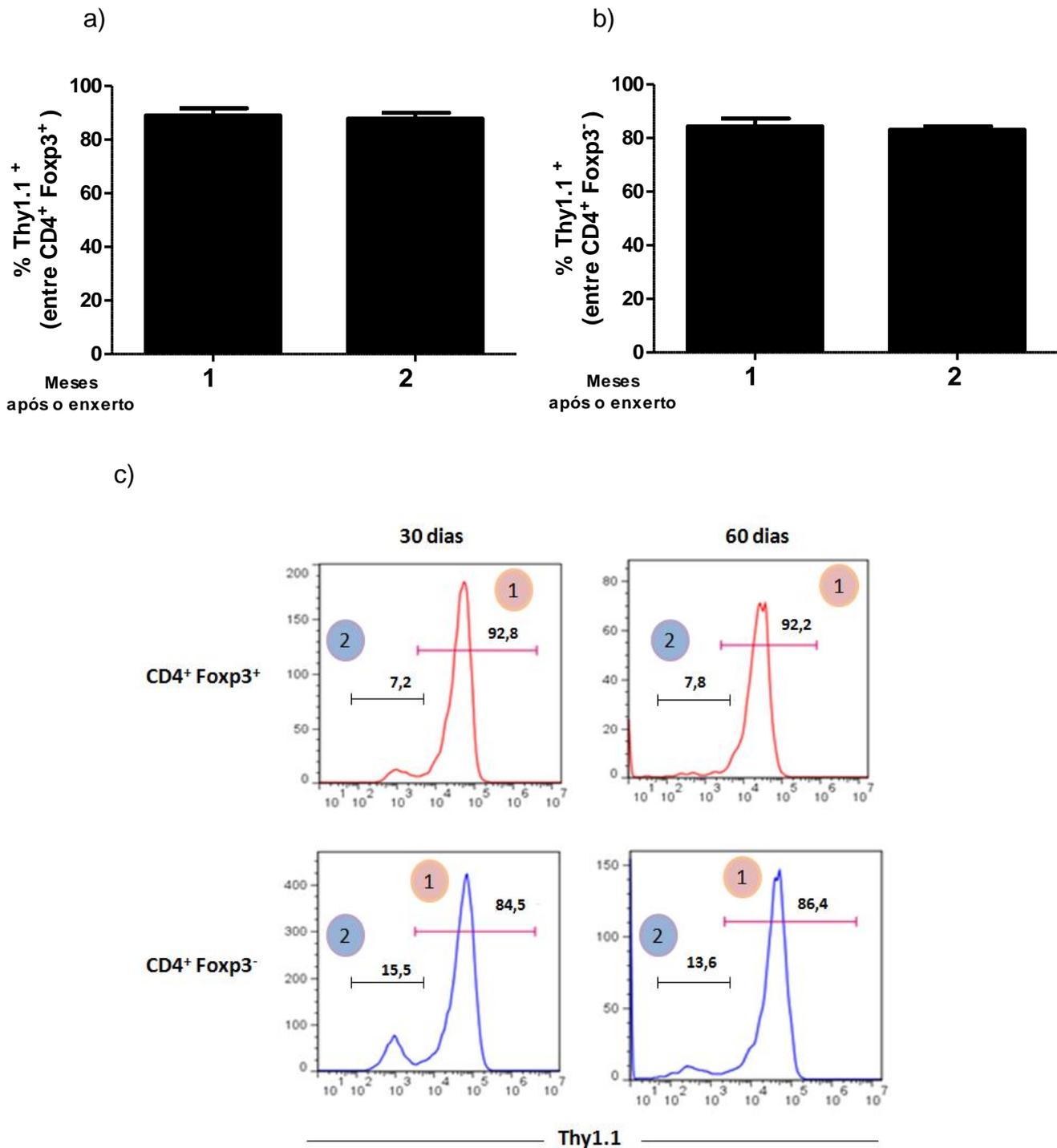
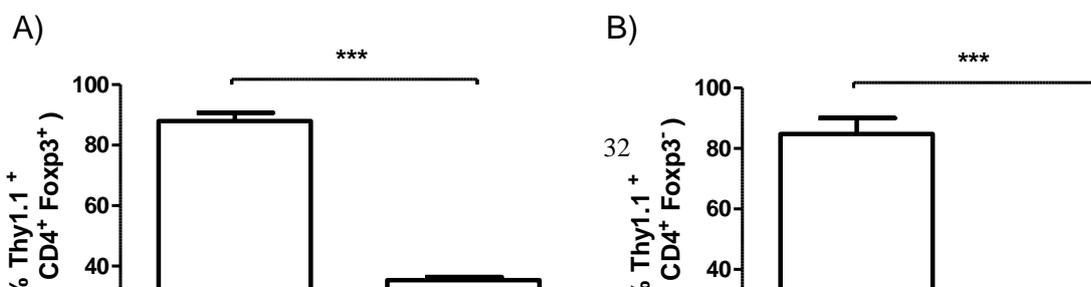


Figura 9: Células T derivadas de timo adulto (Treg e não-Treg) são dificilmente substituídas na periferia. Frequência de células T do doador (Thy1.1⁺) entre CD4⁺Fxp3⁺ (A) ou CD4⁺Fxp3⁻ (B) no sangue periférico 1 e 2 meses após o enxerto de timo adulto. (C) Histogramas representativos de células T derivadas do doador Thy1.1⁺ (1) ou do hospedeiro Thy1.1⁻ (2) entre as células Treg (vermelho) e não-treg (azul) após 1 mês (esquerda) ou 2 meses (direita). Dados representativos de um animal. (n=5). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.



C)

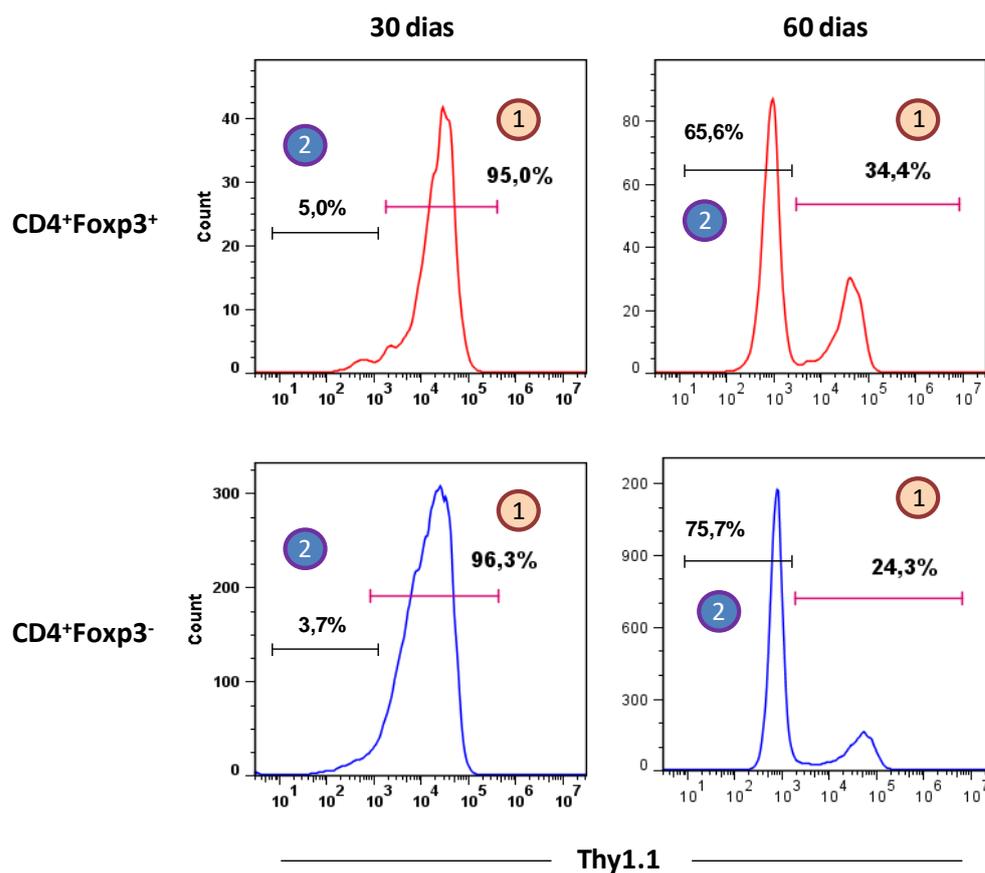


Figura 10: As populações reguladora e não reguladora provenientes do enxerto de timo neonatal são rapidamente substituídas após o primeiro mês no compartimento periférico. Gráficos de barras indicando a frequência de células Thy1.1⁺ (doador) entre as Tregs (A) e entre as CD4⁺Foxp3⁻ (B) 1 e 2 meses após o enxerto de timo neonatal. (C) Os histogramas indicam as porcentagens de células Thy1.1⁺, correspondentes à primeira população que emerge do timo (1) e de células Thy1.1⁻, correspondentes à segunda população (2) entre as células CD4⁺Foxp3⁺ (Tregs) em vermelho e CD4⁺Foxp3⁻ (não reguladoras) em azul após 1 e 2 meses de transplante de lobos de timo neonatal para hospedeiros F1 (BALB/c X C57Bl6) nu/nu. (n=7). ***P< 0,05 (t-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Após 3 meses, as análises da persistência de células do doador entre as T reguladoras ($CD4^+Foxp3^+$) e não reguladoras ($CD4^+Foxp3^-$) nos camundongos enxertados foram feitas também no baço, linfonodos periféricos (pLN) e linfonodos mesentéricos (MLN), além da investigação no sangue periférico. Nossos resultados não apontaram diferenças significativas entre esses órgãos e o sangue e revelaram que a maioria das células residentes após três meses são derivadas do hospedeiro ($Thy1.1^-$). Em relação à população $CD4^+Foxp3^+$, a frequência de células Treg derivadas do doador ($Thy1.1^+$) correspondeu a aproximadamente 30,0% das células $Foxp3^+$ totais no grupo que recebeu timo adulto e frequências semelhantes (aproximadamente 25,0%) nos grupos que receberam timo neonatal, não representando portando uma diferença significativa entre os dois. Com relação ao compartimento de células $CD4^+Foxp3^-$, observamos que as células derivadas do timo neonatal apresentam uma frequência menor quando comparada com as células derivadas do timo adulto (Figura 11 A e B).

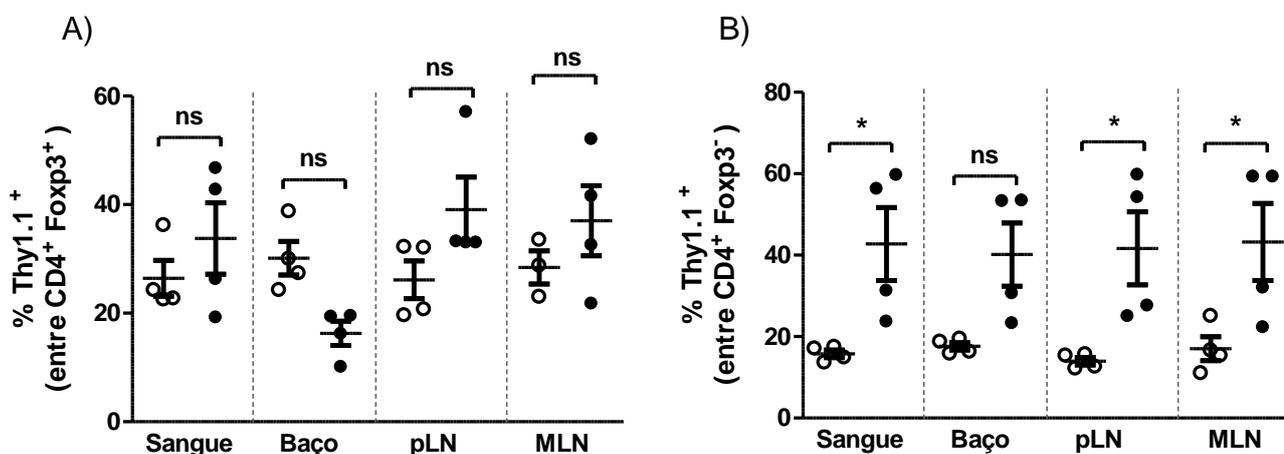


Figura 11: Após três meses, as células T reguladoras derivadas de timo adulto apresentam frequências semelhantes às das derivadas de timo neonatal no compartimento periférico.

Frequência de células do doador ($Thy1.1^+$) entre as Treg (A) e entre as não-Treg (B) no sangue, baço, pLN e MLN, 3 meses após o enxerto tímico de neonato (P2 e P5) (círculos brancos) e adulto (círculos pretos). ($n=4$). *** $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Quando comparamos as populações reguladoras e não reguladoras dentro de cada grupo, observamos, de forma surpreendente, que as células $CD4^+Foxp3^+$ de neonato são mais resistentes à substituição, quando comparadas às $CD4^+Foxp3^-$. De forma contrária, não são observadas diferenças entre estas populações nos grupos que receberam timo adulto (Figura 12 A e B). Esses dados sugerem que, independente da idade e, portanto, de características peculiares inerentes a cada população (neonatal e adulta), ambos os grupos

preservam, no compartimento periférico, uma parcela de células T reguladoras em concentrações semelhantes.

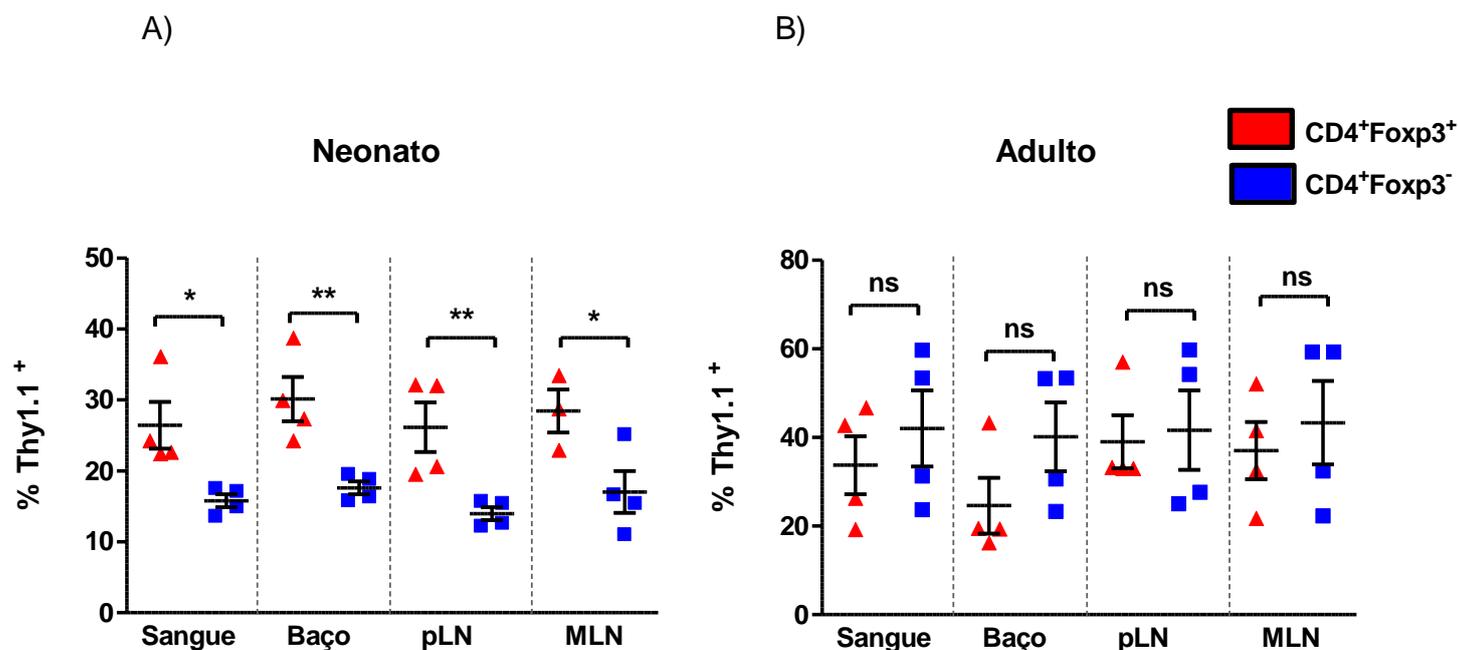


Figura 12: Células T reguladoras derivadas de timo neonatal são mais resistentes à substituição que as células CD4⁺Foxp3⁻. Frequência de células derivadas do doador (Thy1.1⁺) entre as Treg (triângulos vermelhos) e as não-Treg (quadrados azuis) no sangue, baço, pLN e MLN, 3 meses após o enxerto tímico de neonato (P2 e P5) (A) e adulto (B). (n=4). ***P < 0,05 (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Esses resultados nos estimularam a avaliar se as células T reguladoras de neonato apresentam alguma peculiaridade intrínseca que influi na sua capacidade de persistência no compartimento periférico em comparação com as células CD4⁺Foxp3⁻. É possível que a multirreatividade inerente aos timócitos dessa idade, em especial nas células T CD4⁺Foxp3⁺, possuam alguma influência na capacidade inicial de expansão e posterior sobrevivência em ambiente periférico já colonizado.

Para isto, resolvemos comparar timócitos de doadores neonatais com timócitos de adultos quanto ao potencial de colonização periférica quando transferidos em suspensão. Timócitos neonatais de camundongos F1 (BALB/c x C57Bl6) Thy1.2⁺/Thy1.2⁺ (que serão analisados como Thy1.1⁻) foram transferidos juntamente com timócitos adultos de camundongos F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ (que serão analisados como Thy1.1⁺) (em uma mesma

proporção de células CD4SP) para hospedeiros atímicos F1 (BALB/c x C57BL6) nu/nu (Figura 13).

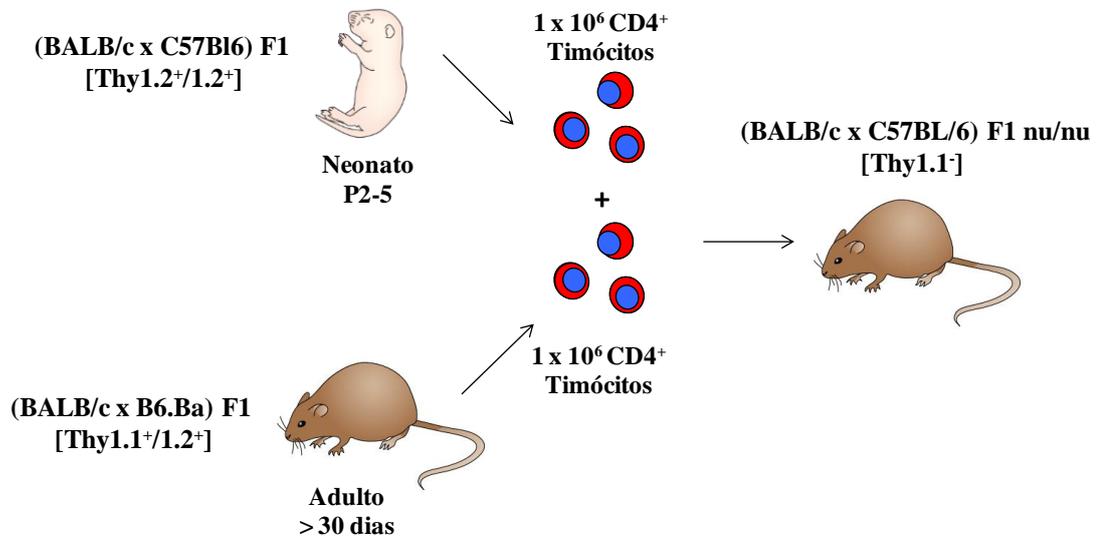
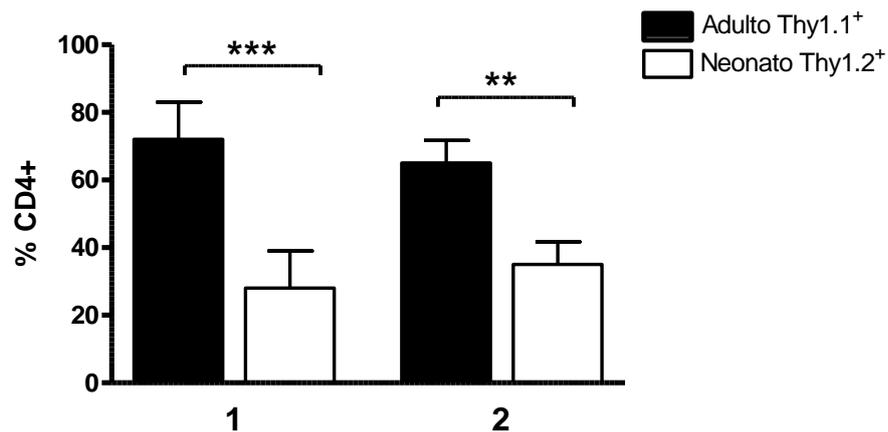


Figura 13: Protocolo experimental 2. Camundongos atímicos F1 nu/nu foram utilizados como hospedeiros de co-transferências de timócitos de camundongos F1 (BALB/c x C57BL6) Thy1.2⁺/Thy1.2⁺ neonatais e de doadores F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ adultos. As duas suspensões foram ajustadas para conter a mesma proporção (1×10^6) de células CD4 simples positivas. Com este protocolo procuramos comparar o potencial de competição das células neonatais com células de adultos quanto à colonização periférica.

Verificamos que as células T CD4⁺ totais de neonatos (Thy1.2⁺) não atingem frequências equivalentes às das células de adulto (Thy1.1⁺/Thy1.2⁺), nos dois primeiros meses, quando transferidas na mesma proporção para hospedeiros F1 nu/nu (Figura 14A). Da mesma forma, tanto as células T CD4⁺Foxp3⁺ quanto as CD4⁺Foxp3⁻, de neonatos do inóculo inicial apresentaram frequências reduzidas no sangue periférico quando comparadas às derivadas dos timócitos adultos, transferidos simultaneamente (Figura 14B e C).

A)



b)

c)

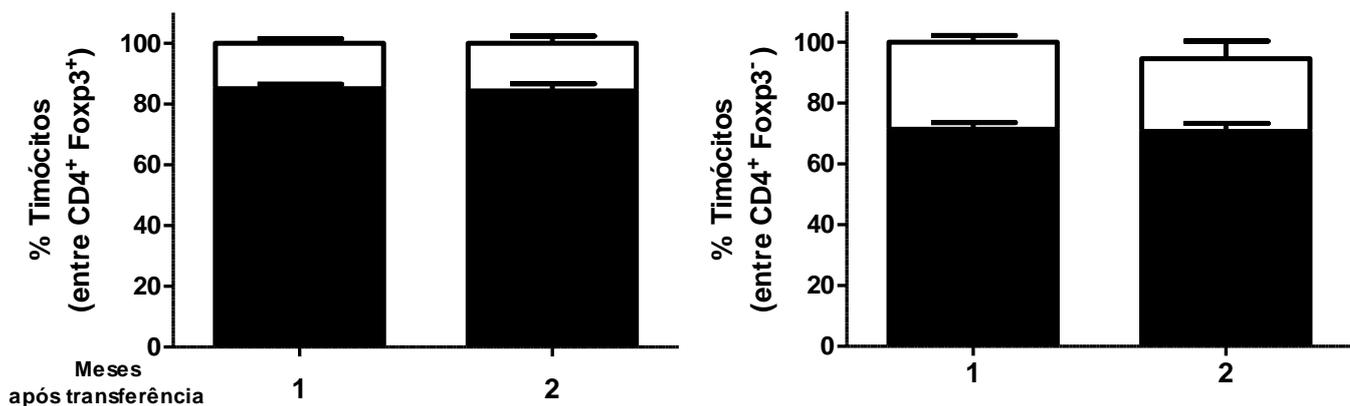


Figura 14: Timócitos neonatais (Thy1.1) apresentam menor capacidade de persistência em comparação com timócitos adultos (Thy1.1) quando transferidos na mesma proporção de células CD4⁺ simples positivas. (A) Frequência de células T CD4⁺ totais derivadas da suspensão de timócitos de adultos (barras pretas) ou de neonatos (barras brancas) no sangue periférico, 1 e 2 meses após a transferência (1×10^6 timócitos) para hospedeiros linfopênicos (B,C) Frequência de células Thy1.1⁺, derivadas de timócitos adultos (barra preta) e de células Thy 1.1⁺, derivadas de timócitos neonatais (barra branca) entre as células CD4⁺Foxp3⁺ (Tregs) (B) e entre as CD4⁺Foxp3⁻ (não reguladoras) (C) um e dois meses após a transferência para hospedeiros F1 (BALB/c X C57Bl6) nu/nu. ($n=9$). *** $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Uma vez que, fisiologicamente, as primeiras células T reguladoras, que emigram do timo no período neonatal, encontram na periferia um ambiente linfopênico, elaboramos um terceiro protocolo para avaliar a importância da linfopenia no compartimento periférico na expansão de células neonatais e de células adultas e comparar a persistência e substituição de cada população por uma segunda população de timócitos.

Para isso, camundongos atímicos F1 nu/nu foram utilizados como hospedeiros de transferências sequenciais de timócitos (contendo 1×10^6 células

CD4⁺SP) de doadores eutímicos adultos ou neonatais, como indicado abaixo (Figura 15):

F1 (BALB/c x C57Bl.6) Thy-1.2⁺/Thy-1.2⁺ Adulto (P>30) ou neonatal (P 3-5);

no dia 0

F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺ Adulto (P>30) ou neonatal (P 3-5);

no dia 60

Cerca de 30 e 60 dias após a primeira transferência, a presença de células (Thy-1.2⁺/1.2⁺) ou (Thy1.1⁻) inicialmente transferidas foi analisada por imunofluorescência de alíquotas de sangue periférico para avaliar sua expansão e persistência no compartimento periférico. Uma vez observada que suas frequências estavam estáveis, transferimos uma segunda população de células (Thy-1.2⁺/Thy-1.1⁺) ou (Thy1.1⁺) (no dia 60) e trinta dias após a segunda transferência (ou 90 dias após a primeira transferência) avaliamos a frequência de incorporação dessas células (Thy1.1⁺) no ambiente previamente colonizado entre as células T totais, entre as células CD4⁺ totais e entre as células com fenótipo característico de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) e não-Treg (CD4⁺Foxp3⁻). Camundondos atímicos F1 nu/nu que receberam apenas a segunda transferência foram utilizados como controle. Com este protocolo podemos avaliar a importância da linfopenia no ambiente periférico para a expansão de células neonatais e adultas.

Inicialmente, mostramos a presença da primeira população de células transferidas (Thy1.1⁻), em amostras de sangue periférico dos dois grupos experimentais (que receberam células de adulto ou neonato) através de imunofluorescência após 1 e 2 meses. Os resultados obtidos estão representados na figura 16.

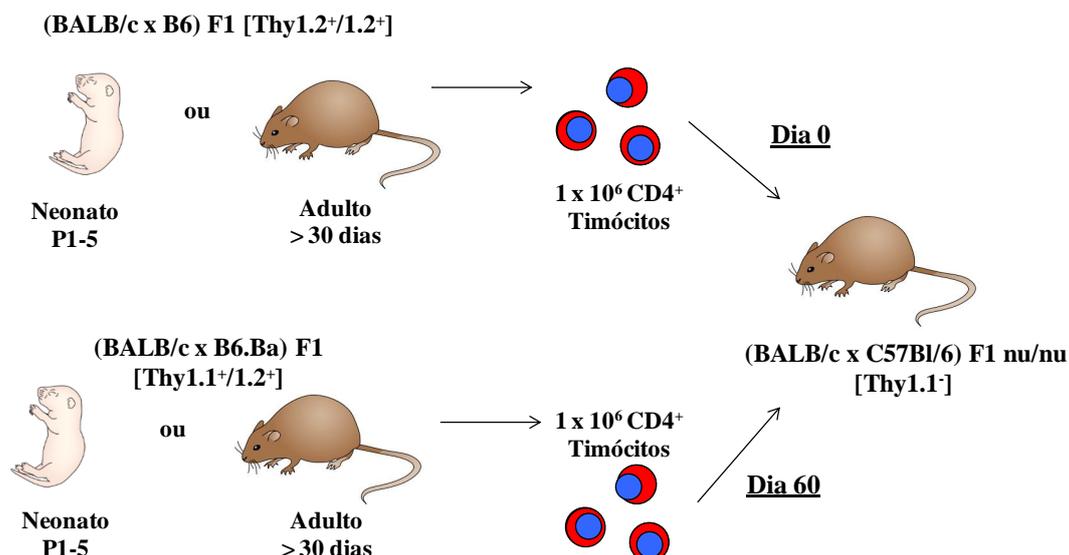
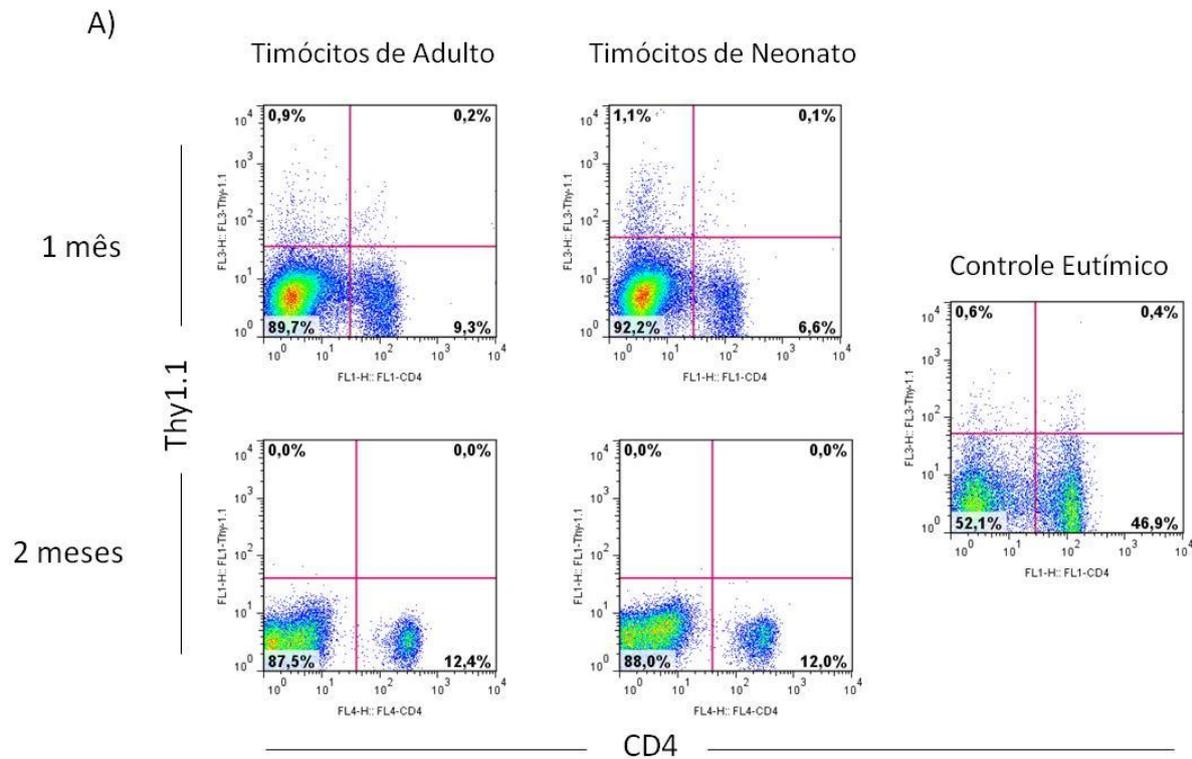


Figura 15: Protocolo experimental 3. Camundongos atímicos F1 nu/nu foram utilizados como hospedeiros de transferências sequenciais de timócitos de camundongos F1 (BALB/c x C57Bl/6) Thy1.2⁺/Thy1.2⁺ (Thy1.1⁻) neonatais ou adulto no dia 0 e de doadores F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ (Thy1.1⁺) adultos ou neonatais 60 dias depois da primeira transferência. Cada suspensão foi ajustada para conter a mesma proporção (1 x 10⁶) de células CD4SP.

A frequência expressiva das células transferidas CD4⁺Thy1.1⁻Thy1.2⁺ nos dois grupos mostrou que a expansão e persistência de timócitos de adultos e neonatos ocorre com eficiência equivalente em ambiente linfopênico singênico, quando transferidas nas mesma proporção (Figura 16A).

As frequências de linfócitos T (Thy1.1⁺) no sangue dos animais que receberam timócitos de adulto ou timócitos de neonato foram semelhantes e pareceram constantes ao longo dos meses investigados. Esses níveis parecem ter estabilizado em torno de 10%, sugerindo que após dois meses o equilíbrio homeostático periférico foi alcançado (Figura 16B).



B)

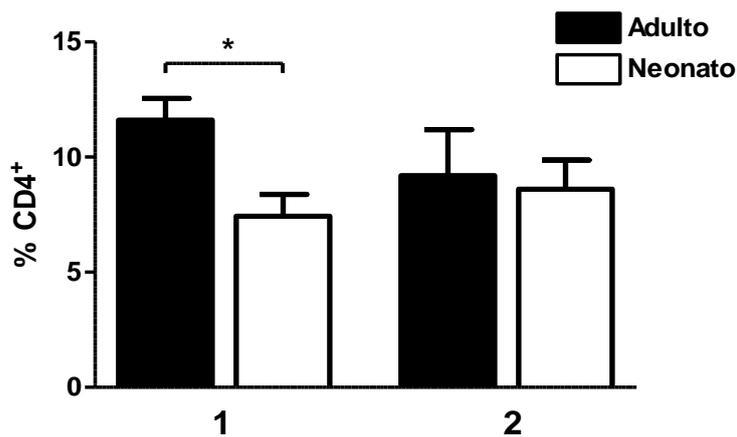


Figura 16: Timócitos de camundongos F1 (BALB/c x C57Bl6) (Thy1.1⁻) adultos ou neonatos expandem e persistem em hospedeiros atímicos F1 (BALB/c x C57Bl6) nu/nu. (A) Níveis totais de linfócitos Thy1.1⁻ em amostras de sangue de um animal representativo de cada grupo após 1 e 2 meses e de um controle eutímico BALB/c (Thy1.1⁻). (B) percentual de células Thy1.1⁻ em todos os animais testados. Timócitos de adulto ($n=3$) (preto), timócitos de neonato ($n=3$) (branco). * $P < 0,05$ (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Além de investigar a população CD4⁺ total, analisamos também, através de imunofluorescência, a persistência de células CD4⁺Foxp3⁺Thy1.1⁻ após 1 e 2 meses no sangue periférico. Observamos que em ambos os grupos (transferidos com timócitos de adulto ou timócitos de neonatos) o percentual de células Treg foi maior que nos controles eutímicos (~20%) somente no segundo mês. Além disso, não foi observada diferença no potencial de expansão das células Treg entre os dois grupos, sugerindo que com relação às células Treg, o ambiente linfopênico permite a expansão equivalente das células neonatais e células T adultas (Figura 17).

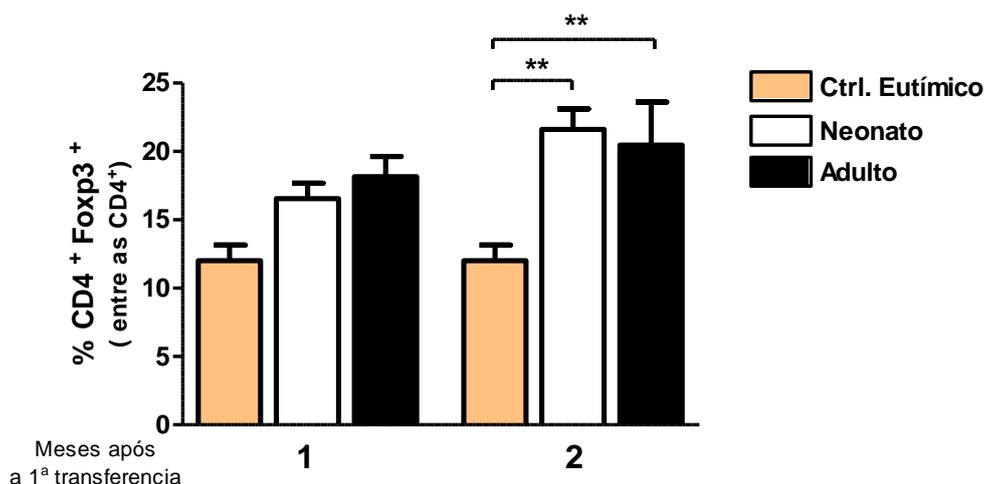


Figura 17: Células CD4⁺Foxp3⁺ de camundongos F1 (BALB/c x C57Bl6) neonatos ou adultos expandem igualmente e persistem em hospedeiros atímicos F1 (BALB/c x C57Bl6)nu/nu mantendo frequências estáveis em 2 meses. Percentual de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ em todos os animais testados 1 e 2 meses após transferência de timócitos de neonato (n=3) (barra branca) ou timócitos de adulto (n=3) (barra preta) em comparação com os controles eutímicos (barra laranja). **P < 0,05 (one-way ANOVA com Bonferroni's post-test). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Após identificar que em dois meses já ocorreu a estabilização dos níveis periféricos de células T nos hospedeiros reconstituídos com a primeira população, adotamos este intervalo para a segunda transferência de células. Suspensões de timócitos de adulto ou timócitos de neonato (contendo 1 x 10⁶ células CD4⁺ simples positivas/animal) de doadores F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy 1.1⁺/1.2⁺ foram transferidas para os grupos experimentais previamente reconstituídos com células de F1 (BALB/c x C57Bl6) Thy 1.2⁺/1.2⁺ e para camundongos atímicos F1 (BALB/c x C57Bl6) nu/nu vazios, como controle. Os

animais que receberam inicialmente uma população de células de neonato receberam, como segunda transferência, timócitos de adulto. Por outro lado, os hospedeiros que foram reconstituídos inicialmente com timócitos de neonato receberam células de adulto na segunda transferência. Com este protocolo procuramos verificar a persistência da primeira população transferida (Thy1.1⁻) e a capacidade de incorporação das novas células recém chegadas nesse ambiente já colonizado, permitindo avaliar como a reconstituição do ambiente periférico altera a incorporação de células de diferentes idades.

Os resultados demonstram que trinta dias após a transferência, a colonização por células T CD4⁺ provenientes do segundo inóculo foi evidente apenas nos grupos reconstituídos inicialmente com timócitos de neonato, apresentando uma frequência em torno de 20-30%. Já nos grupos que receberam uma primeira população de timócitos de adulto, não foi observada incorporação das células de neonato (0, 3%) quando a frequência é calculada entre as células T CD4⁺ totais no sangue periférico (figura 18A). Análises a longo prazo (doze meses após a segunda transferência) demonstram que a proporção de células oriundas do segundo inóculo (Thy1.1⁺) não sofreu modificações, mantendo seus níveis relativamente estáveis nos grupos que receberam timócitos de neonato na primeira transferência (~30%) e nos grupos que receberam timócitos de adulto na primeira transferência (~0,3) (figura 18B).

Comparamos também o percentual de células provenientes da segunda transferência entre as T reguladoras (CD4⁺Foxp3⁺) e as não reguladoras (CD4⁺Foxp3⁻) e observamos resultados semelhantes aos encontrados, anteriormente, para a população CD4⁺ total. Nos grupos que receberam timócitos de adultos como primeira transferência, a incorporação de novas células Treg CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁻ foi irrisória (A+N), comparada aos grupos que receberam uma primeira transferência de timócitos de neonato (N+A) (Figura 19A e B).

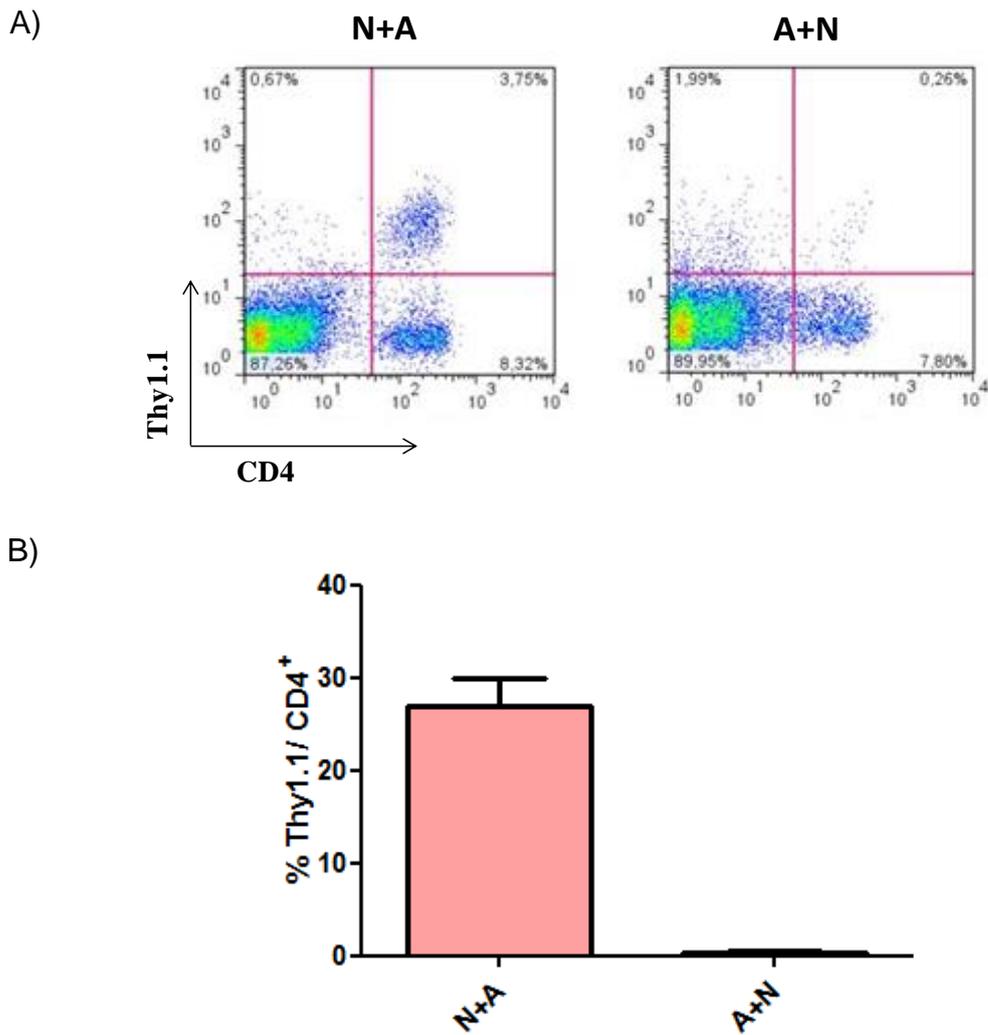


Figura 18: Células CD4⁺Thy1.1⁺ de camundongos F1 (BALB/c x C57Bl6) neonatos não são capazes de colonizar um ambiente previamente reconstituído com timócitos de adulto. (A) Níveis totais de linfócitos CD4⁺Thy1.1⁺ em amostras de sangue de grupos que receberam uma primeira população de timócitos de neonato e uma segunda de timócitos de adulto (N + A) e grupos que receberam uma primeira transferência de timócitos de adulto e uma segunda de timócitos de neonato (A + N) após 1 mês. Dados representativos de um animal por grupo. (B) Percentual de células Thy1.1⁺ oriundas do segundo inóculo entre as células CD4⁺ totais em todos os animais testados 12 meses após transferência de timócitos de adulto (N+A) (n=3) ou timócitos de neonato (A+N) (n=4). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Como controle, mostramos na figura 20 que as células Treg da segunda transferência, de doadores F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy 1.1⁺/1.2⁺, possuem um potencial de expansão em hospedeiros linfopênicos semelhante ao das células Treg da primeira população transferida de doadores F1(BALB/c x C57Bl/6) Thy1.2⁺, mostrado na figura 17

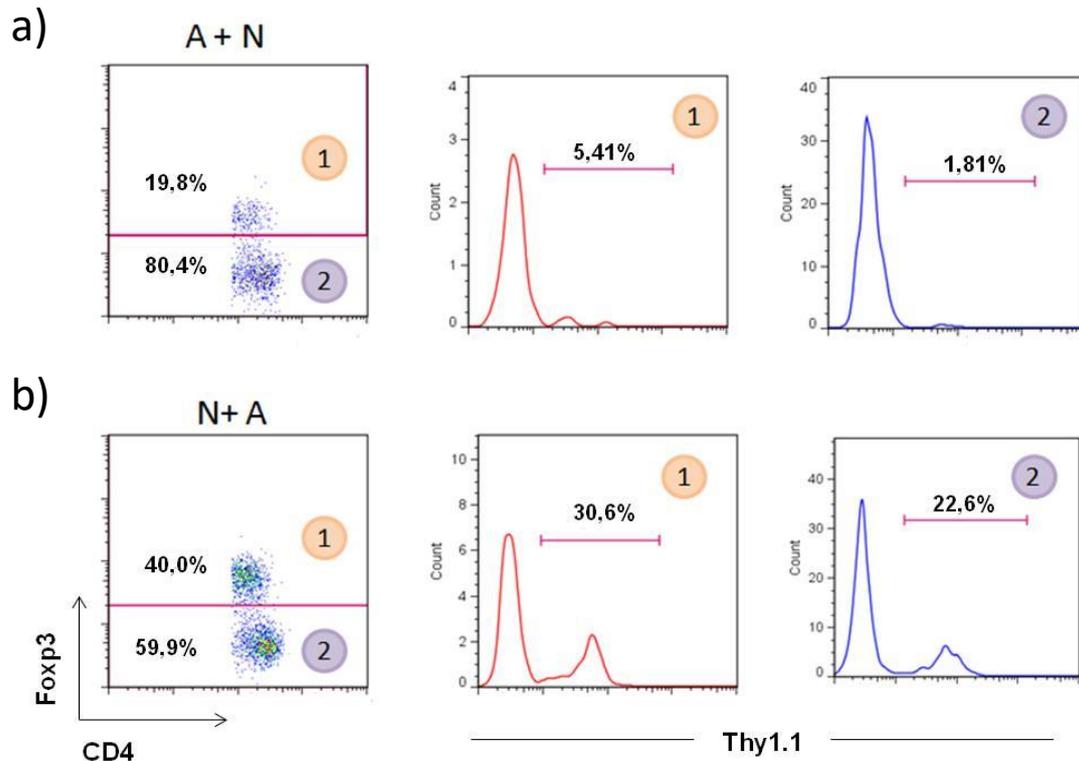


Figura 19: Células Treg $CD4^+Foxp3^+$ de neonato são capazes de expandir apenas em ambientes linfopênicos. Gráficos representativos da frequência de células derivadas da segunda transferência ($Thy1.1^+$) entre as subpopulações $CD4^+Foxp3^+$ (1) ou $CD4^+Foxp3^-$ (2), 30 dias após transferência. (A) grupos que receberam timócitos de adulto no dia 0 e timócitos de neonato no dia 60 (A+N). (B) Grupos que receberam timócitos de neonato no dia 0 e timócitos de adulto no dia 60 (N+A).

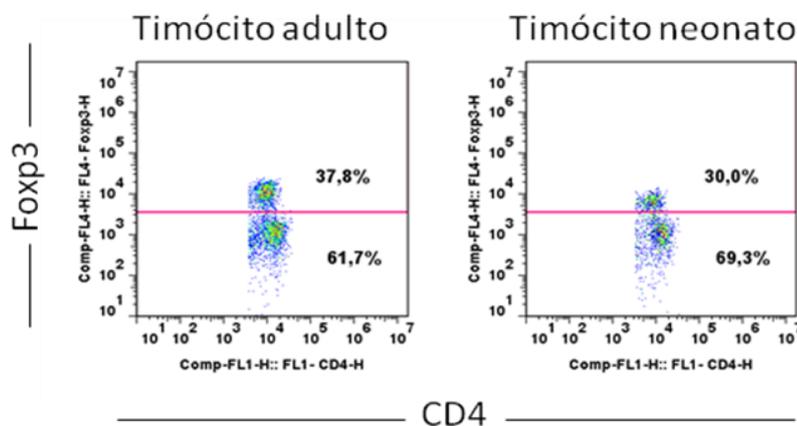


Figura 20: Células $CD4^+Foxp3^+$ expandem igualmente em ambiente linfopênico. Níveis totais de linfócitos $CD4^+Foxp3^+Thy1.1^+$ em amostras de sangue de um representante de cada grupo, 1 mês após transferência de timócitos de adulto ou timócitos de neonato (contendo 1×10^6 células $CD4^+$ simples positivas/animal) para hospedeiros F1(Balb/c x C57bl6) $Thy1.1^-$ nu/nu. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Esses dados demonstram que a capacidade de incorporação de novas células em ambiente periférico previamente colonizado só é evidente quando se transfere timócitos de doadores adultos e que esta incorporação parece ser semelhante tanto entre as sub-populações CD4⁺Foxp3⁺ quanto CD4⁺Foxp3⁻ transferidas. Além disso, uma vez estabelecidas, suas frequências são mantidas estáveis.

A fim de verificar se a ausência de incorporação das células de neonato em ambientes previamente colonizados é decorrente de sua incapacidade de competir com células de adulto, transferimos timócitos de doadores F1(BALB/c x C57Bl/6) Thy1.2⁺ neonatos para hospedeiros F1 (BALB/c x C57Bl/6) nu/nu vazios no dia 0 e sessenta dias depois transferimos uma segunda população de timócitos de F1 (BALB/c x B6.Ba) Thy 1.1⁺/1.2⁺ também neonatos .

Resultados iniciais demonstraram que, assim como os grupos (A+N), as células de neonato são incapazes de colonizar e expandir em ambiente periférico previamente colonizado, mesmo quando reconstituídos inicialmente com células de neonato (Figura 21).

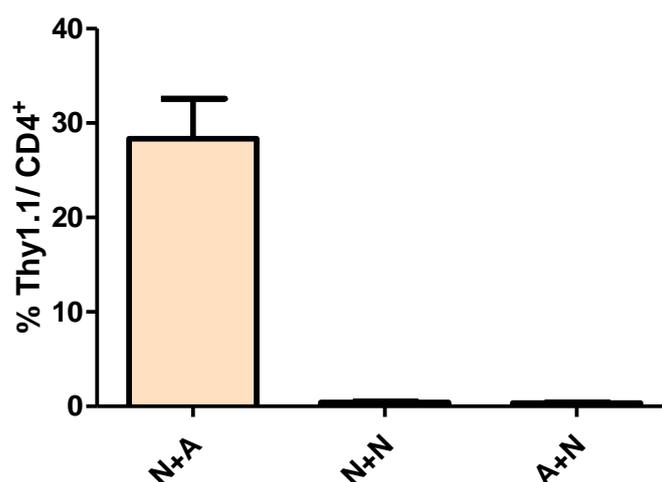


Figura 21: Células CD4⁺Foxp3⁺ de neonato são incapazes de expandir em ambientes previamente colonizado. Percentual de células Thy1.1⁺ oriundas do segundo inóculo entre as células CD4⁺ Totais em todos os animais testados 30 dias após a transferência de timócitos de adulto para hospedeiros previamente colonizados com timócitos de neonato (N+A), timócitos de neonato para hospedeiros previamente colonizados com timócitos de neonato (N+N) ou previamente colonizados com timócitos de adulto (A+N). (n=4). Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

5 Discussão

No presente trabalho foi avaliada a dinâmica populacional de células T reguladoras (Treg) e não reguladoras no compartimento periférico através de protocolos que simulam uma cinética de colonização periférica próxima à fisiológica. A persistência das primeiras células que expandem na periferia, em ambiente linfopênico, e sua substituição por incorporação de novas populações de células T recém emigradas do timo (recent thymic emigrants – RTEs) foi avaliada através de transplante de lobos tímicos singênicos para hospedeiros F1 (BALB/c x C57BL/6) nu/nu. Este modelo permite estudar esta dinâmica populacional sob a influência da liberação de células RTE em ritmo e concentrações fisiológicas

Por este protocolo, logo após o enxerto de timo as primeiras células que chegam à periferia correspondem aos linfócitos provenientes do timo do doador (Thy-1.1⁺). Posteriormente as células precursoras da medula óssea do hospedeiro colonizam o órgão transplantado e se diferenciam em linfócitos T maduros capazes de ingressar no compartimento periférico. Como descrito por Thomas-Vaslin et al., (1997), aproximadamente quatro semanas após o transplante não são mais encontradas células do doador no timo enxertado e o órgão já foi plenamente colonizado por precursores derivados do hospedeiro. A partir desse período, portanto, podemos analisar a cinética de substituição e incorporação de novas células na periferia.

Trinta dias após o transplante dos lobos tímicos, encontramos uma frequência maior de células T CD4⁺ no compartimento periférico dos animais que receberam timo neonatal (P2 e P5), em comparação com os animais enxertados com timo adulto. Embora o número de timócitos CD4SP presentes nos enxertos de ambas as idades tenha sido equivalente, observamos baixas frequências de células T reguladoras nos timos de neonato. Já foi descrito que o timo neonatal é menos eficiente em suportar a diferenciação de células T reguladoras (FONTENOT *et al.*, 2005a) e que a expansão de células Foxp3⁺ intratímicas só acontece após o terceiro/quarto dia pós-nascimento. (FONTENOT *et al.*, 2005b).

Desta forma, é possível que nos hospedeiros de timo neonatal as células maduras ingressaram em um compartimento periférico escasso em células T reguladoras e, conseqüentemente, foram capazes de proliferar e expandir mais intensamente atingindo uma frequência inicial maior de células CD4+.

Por outro lado, características intrínsecas às células neonatais como uma maior expressão de IL-7R α , comparada com as células adultas (DARDALHON *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2001), podem ter permitido uma proliferação mais intensa. Já foi demonstrado que animais com linfopenia crônica, como camundongos atímicos, por exemplo, apresentam altas concentrações da citocina IL-7 no compartimento periférico (FRY & MACKALL., 2005).

Outra possível explicação poderia estar relacionada com a maior exportação de timócitos derivadas do timo neonatal. Após o nascimento, o timo continua a se desenvolver e organizar seu compartimento estrutural ao ser periodicamente colonizado com progenitores hematopoéticos da medula óssea (LI *et al.*, 2009). Durante o início do período pós-natal, o timo aumenta em tamanho com conseqüente aumento de células T virgens liberadas, preenchendo assim o ambiente periférico “vazio” (ADKINS.,1999; ADKINS.,2003 ; MIN. *et al.*, 2003). Desta forma, é possível que os lobos tímicos neonatais transplantados tenham aumentado em tamanho e contribuído para uma maior exportação de timócitos comparado ao ½ lobo tímico enxertado de adulto, que provavelmente mantém o tamanho e número de células após ser enxertado.

Após o primeiro mês, os resultados demonstraram que tanto as células T CD4+ como as T CD4+Foxp3+, provenientes do timo neonatal do doador, decaem de forma acentuada e permanecem estáveis em baixa frequência pelos próximos meses no sangue e órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos mesentéricos (MLN) e linfonodos periféricos (pLN) dos hospedeiros. Este resultado se repetiu mesmo quando aumentamos muito (em nove vezes) o número de células CD4+SP presentes nos timos neonatais enxertados, pelo uso de doadores P5.

Como há uma emigração contínua de novas células a partir do timo, uma competição por recursos para a persistência no compartimento periférico é esperada. No caso das células provenientes do doador neonatal (Thy-1.1+) sua rápida substituição após o primeiro mês ocorre por células que diferenciam a partir das precursoras hematopoiéticas do hospedeiro adulto.

Como a afinidade por complexos MHC-Ppróprio foi descrita como um fator determinante da sobrevivência de linfócitos T no compartimento periférico (TAKEDA *et al.*, 1996; STOCKINGER *et al.*, 2004), podemos pensar que diferenças, também já descritas (SCHNEIDER *et al.*, 1989; BOGUE *et al.*, 1992), no repertório das células T oriundas das primeiras ondas de timócitos, neonatal, sejam responsáveis por favorecer a maior incorporação de novas células T diferenciadas no timo a partir de precursoras de idade adulta. O repertório mais multirreativo do neonato (GARCIA *et al.*, 2000) poderia resultar em menor afinidade pelos peptídeos, facilitando seu “desligamento” das APCs periféricas.

Alternativamente, diferenças entre as células de adulto e neonatos na expressão de receptores para citocinas (DARDALHON *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2001) ou diferenças metabólicas que afetem seu potencial intrínseco de proliferação poderiam influir nesta competição.

Já nos hospedeiros que receberam enxerto de timo adulto, o decaimento das células do doador não foi tão acentuado quando comparado ao dos hospedeiros de timo neonatal. As células provenientes da primeira onda de colonização (ou seja, as células derivadas do doador) parecem ter uma substituição menos acelerada, uma vez que após o segundo mês suas proporções são mantidas constantes e somente no terceiro mês foi observada uma redução semelhante à encontrada nos grupos que receberam timo neonatal.

Embora existam dados controversos com relação ao tempo exato de início da senescência tímica, sabe-se que o timo entra em um período de declínio, resultando em degeneração do órgão e contribuindo para sua involução (MIN *et al.*, 2004). Mudanças nas taxas de células epiteliais tímicas (TECs) e diminuição da produção de linfócitos T já foram evidenciados. Embora os mecanismos relacionados a este processo não sejam claramente caracterizados, a consequência é uma redução na produção e exportação de linfócitos maduros para o compartimento periférico. No caso dos animais que receberam enxerto de timo adulto, o atraso na substituição de células do doador pode estar relacionado com a dificuldade de produção, pelo timo enxertado, de novas células T virgens derivadas de precursores da medula óssea do hospedeiro. Além disso, pode ser possível que a vascularização do timo adulto na cápsula

renal siga uma cinética diferente da observada no neonato. Esse atraso na pega do enxerto poderia ser uma explicação para o atraso na substituição de células Thy1.1⁺ (do doador). Entretanto, não descartamos a possibilidade dessa menor substituição estar relacionada ao repertório ou a diferenças fenotípicas das células T das duas idades, como comentado anteriormente.

Ao contrário das células neonatais, as células Treg de adulto possuem uma afinidade mais restrita para complexos MHC-Ppróprio. Desta forma, é possível que as novas células T reguladoras exportadas do timo adulto ao chegarem à periferia, encontrem uma população residente que já esteja interagindo com os nichos disponíveis, o que atrasaria sua incorporação. Entretanto, com a contínua exportação tímica, ao longo dos dias, de células com especificidades variadas, é possível que uma substituição semelhante às encontradas nos grupos que receberam timo neonatal seja observada.

Entretanto, apesar da rápida substituição das células do neonato pelas novas RTE, é importante destacarmos que as frequências de células T reguladoras do doador são mantidas estáveis com o tempo. Estas células preservadas da primeira onda de colonização poderiam ser importantes, portanto, para compor o repertório até a idade adulta.

No grupo que recebeu timo neonatal, a cinética de substituição de células Treg CD4⁺Foxp3⁺Thy1.1⁺ pareceu ser especialmente mais atrasada em relação às células CD4⁺Foxp3⁻ no terceiro mês, o que não ocorreu nos animais enxertados com timo adulto. Estes clones Treg remanescentes do período neonatal, inicialmente selecionados no compartimento periférico, poderiam ser essenciais para manter a tolerância adquirida neste período a peptídeos próprios ao longo da vida.

Com o objetivo de avaliar se os timócitos das duas idades (neonatal e adulta) apresentam alguma peculiaridade intrínseca que influi na capacidade de expansão no compartimento periférico já colonizado, testamos a expansão e persistência das células de diferentes idades (neonatal e adulta) transferidas simultaneamente e nas mesmas proporções de células CD4⁺ para hospedeiros atímicos F1 (BALB/c x C57BL6) nu/nu.

Nossos dados demonstraram que células T CD4⁺Foxp3⁻ e CD4⁺Foxp3⁺ de neonatais não são capazes de persistir nos hospedeiros quando competem por nichos na periferia com os timócitos adultos, transferidos simultaneamente. Resultados semelhantes foram obtidos quando as células neonatais foram transferidas para ambiente previamente colonizado, onde foram incapazes de competir com as células residentes, mesmo quando essas são derivadas de um timo de neonato. Já as células de adulto são capazes de expandir facilmente na periferia de hospedeiros que foram inicialmente reconstituídos com timócitos de neonato.

Esses resultados indicaram que em sistema de transferência policlonal as células neonatais apresentam menor potencial de competição por recursos que as células adultas, e persistem em frequências mais baixas no compartimento periférico colonizado. Entretanto, as células de neonato apresentam a mesma capacidade de expansão que as células adultas quando transferidas isoladamente para hospedeiros atímicos ainda não colonizados. Esses resultados indicaram que não existem diferenças intrínsecas importantes na capacidade de proliferação ou no uso de citocinas entre as células de neonato e as de adulto que interfiram em sua expansão no compartimento periférico. Em ambiente linfopênico, ambas são capazes de atingir frequências similares com a mesma cinética. É possível que características do repertório de TCR associadas à população de células Treg de cada uma dessas idades influenciem em sua capacidade de competição com células já residentes na periferia e se reflitam em sua capacidade de expansão e sobrevivência em ambiente já colonizado.

Novamente, podemos pensar que a desvantagem competitiva das células de neonato pode ser devida a uma menor diversidade do repertório, o que impediria uma interação mais abrangente com os complexos MHC-peptídeos disponíveis na periferia. Já foi descrito que células liberadas no período neonatal não sofrem adição de nucleotídeos na região que codifica o segmento CDR3 do TCR e, portanto são células com uma maior promiscuidade (BOGUE *et al.*, 1991; FEENEY, 1991). Em parte, essa promiscuidade permite que o pequeno número de células T periféricas encontradas nesse período seja efetivo em expandir rapidamente e montar uma resposta adequada após uma imunização ou infecção. Porém, parece não permitir sua sobrevivência, quando células com

uma maior afinidade ingressam ou já estão presentes no compartimento periférico.

Entretanto, não estudamos ainda a persistência de cada população transferida (de neonato e de adulto) em um prazo mais longo e não sabemos se as células neonatais apresentarão a mesma cinética de substituição observada no protocolo de enxerto e, se essa dinâmica será equivalente entre as duas subpopulações (CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁻) transferidas. Nesse protocolo, onde não existe contínua incorporação de novas especificidades de células ao longo do tempo, e a disponibilidade de células com novas especificidades só ocorre após transferência de novas populações policlonais, é possível que a cinética de persistência tanto das células neonatais quanto adultas não sofra alterações expressivas.

Nossa perspectiva será verificar se diferenças na idade do hospedeiro influenciam na persistência ou substituição de células T reguladoras na periferia. Pretendemos fazer injeções intraperitoneais de timócitos (neonatais ou adultos) para hospedeiros eutímicos recém-nascidos (P0-1) congênicos, que expressem um marcador diferencial nas células T (Thy-1.1⁺ ou CD45.1⁺). Utilizando essa abordagem, as primeiras células que chegam à periferia (injetadas intraperitonealmente em um ambiente linfopênico) serão fisiologicamente substituídas por timócitos liberados pelo timo do hospedeiro. Como este hospedeiro é neonato, poderemos estudar, neste protocolo, a velocidade de substituição das primeiras células de neonato que chegam à periferia, por novas células também de neonato, correspondentes às precursoras que fisiologicamente diferenciam no timo do hospedeiro. Portanto este protocolo será muito mais próximo do fisiológico em comparação com o que utilizamos em nossos primeiros experimentos de enxerto, sendo possível, assim, avaliar a influência de um ambiente periférico presente no neonato e o potencial de competição das células residentes com células derivadas de ondas sucessivas que emigram do timo neonatal.

Pretendemos também, avaliar o fenótipo das células derivadas do doador presentes na periferia ao longo dos meses investigados e observar se existem diferenças quanto a marcadores de ativação e memória nas subpopulações reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ e não reguladoras CD4⁺Foxp3⁻.

Por fim, seria interessante verificar se essa fração persistente de células Treg, que emigram do timo nas primeiras ondas, no período neonatal, apresenta alguma peculiaridade como, por exemplo, uma reatividade maior a peptídeos periféricos que favoreça sua persistência por um período mais prolongado. Para isso, pretendemos avaliar a influência da multirreatividade dos TCR e da presença do antígeno em diferentes tecidos no compartimento periférico na cinética de substituição da população Treg e não-Treg de idade adulta e neonatal.

6 Conclusão

Utilizando estratégias de transplante de lobos tímicos de diferentes idades, observamos que as células neonatais são rapidamente substituídas por novas RTEs em comparação com timócitos provenientes de um timo adulto. Além da rápida substituição das células neonatais no ambiente periférico, resultados de transferências subsequentes de timócitos de neonato e adulto demonstraram que a capacidade de incorporação dos timócitos neonatais em ambiente previamente colonizado é dificultada, mesmo quando a população residente é derivada de um doador neonatal. Como em ambiente linfopênico seu potencial de expansão é semelhante ao das células adultas, os resultados sugerem que a afinidade e a multirreatividade do TCR das células neonatais estejam relacionados ao fracasso na competição por nichos periféricos.

Entretanto, observamos que a subpopulação de células T reguladoras de neonatos apresenta uma persistência maior em comparação com a das células CD4⁺Foxp3⁻, permitindo a sobrevivência de alguns clones inicialmente selecionados no compartimento periférico, que poderiam ser importantes para manter a tolerância a peptídeos próprios ao longo da vida. É possível que a persistência destes peptídeos favoreça a sobrevivência prolongada preferencial das células Treg no neonato.

7. Referências Bibliográficas

1. ADKINS, B. **Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness.** *Curr. Immunol. Rev.*, 3, 151-159. 2007.
2. AKBAR, A.N., TAAMS, L.S., SALMON, M. & VUKMANOVIC-STEJIC, M. **The peripheral generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *Immunol.* 109, 319–325, 2003.
3. AKBAR, A.N., VUKMANOVIC-STEJIC, M., TAAMS, L.S. & MACALLAN, D.C. **The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery.** *Nat. Rev. Immunol.*, 7 (3), 231-237, 2007.
4. AKIMOVA, T., BEIER, U.H., WANG, L., LEVINE, M.H. & HANCOCK, W.W. **Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation.** *PLoS ONE* 6:e24226 2011.
5. ALMEIDA, A.R., ROCHA, B., FREITAS, A.A. & TANCHOT, C. **Homeostasis of T cell numbers: From thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells.** *Semin. Immunol.*, 17 (3), 239-49, 2005.
6. ANDERSON, M. S., VENANZI, E. S., KLEIN, L., CHEN, Z., BERZINS, S. P., TURLEY, S.J., VON BOEHMER, H., BRONSON, R., DIERICH, A., BENOIST, C. & MATHIS, D. **Projection of an immunological self shadow within the thymus by the *Aire* protein.** *Science*, 298, 1395-1401, 2002.
7. ANDERSON, M., VENANZI, E., CHEN, Z., BERZINS, S., BENOIST, C. & MATHIS, D. **The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance.** *Immunity*, 23 (2), 227–239, 2005.
8. ANDREU-SANCHEZ, J.L., MORENO DE ALBORAN, I.M., MARCOS, M.A, SANCHEZ-MOVILLA, A., MARTINEZ, A.C. & KROEMER, G. **Interleukin 2 abrogates the nonresponsive state of T cells expressing a forbidden T cell receptor repertoire and induces autoimmune disease in neonatally thymectomized mice.** *J. Exp.Med.*, 173, 1323, 1991.
9. ARNOLD, B., SCHULER, T. & HAMMERLING, G.J. **Control of peripheral T-lymphocyte tolerance in neonates and adults.** *Trends Immunol.*, 26 (8), 406-411, 2005.

10. ASANO, M., TODA, M., SAKAGUCHI, N. & SAKAGUCHI, S. **Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.** J. Exp. Med., 184, 387-396, 1996.
11. BAILEY-BUCKTROUT, S.L. & BLUESTONE, J.A. **Regulatory T cells: stability revisited.** Trends Immunol. 32, 301-306, 2011.
12. BARRAT, F.C., CUA, D.J., BOONSTRA, A., RICHARDS D.F., CRAIN, C., SAVELKOUL, H.F., DE WAAL-MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., HAWRYLOWICZ, C.M & O'GARRA, A. **In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines.** J. Exp.Med.,195, 603-616, 2002.
13. BECKER, C., STOLL, S., BOPP, T., SCHMITT, E. & JONULEIT, H. **Regulatory T cells: Present facts and future hopes.** Med. Microbiol. Immunol. 195 (3), 113-124, 2006.
14. BELKAID, Y. & ROUSE, B.T. **Natural regulatory T cells in infectious disease.** Nat. Immunol., 4, 353-360, 2005.
15. BELKAID, Y. & TARBELL, K. **Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions.** Annu. Rev. Immunol., 27, 551-589, 2009.
16. BILATE, A.M. & LAFAILLE, J.J. **Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance.** Annu. Rev. Immunol. 30, 733-758, 2012.
17. BILLINGHAM, R.E. & BRENT, L. **Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. (1934-1990), 242 (694), 439-477, 1959.
18. BILLINGHAM, R.E., BRENT, L. & MEDAWAR, P.B. **Actively acquired tolerance of foreign cells.** Nature, 172 (4379), 603-606, 1953.
19. BJÖRKSTÉN, B., NAABER, P., SEPP, E. & MIKELSAAR, M. **The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children.** Clin. Exp. Allergy, 29 (3), 342-346, 1999.
20. BJÖRKSTÉN, B., SEPP, E., JULGE, K., VOOR, T. & MIKELSAAR, M. **Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life.** J. Allergy. Clin. Immunol., 108 (4), 516-520, 2001.

21. BOGUE, M., GILFILLAN, S., BENOIST, C. & MATHIS, D. **Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11011–11015, 1992.
22. BOGUE, M., CANDEIAS, S., BENOIST, C., & MATHIS, D. **A special repertoire of alpha: beta T cells in neonatal mice.** EMBO J. 10, 3647–3654, 1991.
23. BOURGEOIS, C. & STOCKINGER, B. **T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions.** Immunol. Lett., 107 (2), 89-92, 2006.
24. BRUNKOW, M.E., JEFFERY, E.W., HJERRILD, K.A., PAEPER, B., CLARK, L.B., YASAYKO, S.A., WILKINSON, J.E., GALAS, D., ZIEGLER, S.F. & RAMSDELL, F. **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** Nat. Genet., 27, 68–73, 2001.
25. CAMPBELL, D.J. & ZIEGLER, S.F. **Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells.** Nat. Rev. Immunol., 7, 305-310, 2007.
26. CATON, A.J., COZZO, C., LARKIN, JIII, LERMAN, M.A., BOESTEANU, A. & JORDAN, M.S. **CD4(+) CD25(+) regulatory T cell selection.** Ann. NY Acad. Sci. 1029, 101–114, 2004.
27. CHEN, Y., SHEN, S., GORENTLA, B.K., GAO, J. & ZHONG, X-P. **Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression.** J. Immunol., 188, 1-10, 2012.
28. CONDE, C., WELLER, S., GILFILLAN, S., MARCELLIN, L., MARTIN, T. & PASQUALI J.L. **Terminal deoxynucleotidyl transferase deficiency reduces the incidence of autoimmune nephritis in (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice.** J. Immunol., 161, 7023–7030, 1998.
29. COOMBES, J. L., SIDDIQUI, K. R. R., ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V., HALL, J., SUN, C., BELKAID, Y. & POWRIE, F. **A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent manner.** J. Exp. Med., 204 (8), 1757-1764, 2007.
30. COUTINHO, A., CARAMALHO, I., SEIXAS, E. & DEMENGEOT, J. **Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. , 293, 43-71, 2005.

31. CUIRIEL, T. J. **Regulatory T cells and treatment of cancer**. *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 241-246, 2008.
32. CUROTTO DE LAFAILLE, M.A., LINO, A.C., KUTCHUKHIDZE, N. & LAFAILLE, J.J. **CD25⁻ T cells generate CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion**. *J. Immunol.*, 173 (12), 7259-7268, 2004.
33. DARDALHON, V., JALECO, S., KINET, S., HERPERS, B., STEINBERG, M., FERRAND, C., FROGER, D., LEVEAU, C., TIBERGHEN, P., CHARNEAU, P., NORAZ, N. & TAYLOR N. **IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4⁺ T cells**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9277–9282, 2001.
34. DUJARDIN, H.C, BURLIN-DEFRAUOX, O., BOUCONTET, L., VIEIRA, P., CUMANO, A. & BANDEIRA, A. **Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4⁺ T cells**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10, 14473-14478, 2004.
35. ERNST, B., LEE, D.S., CHANG, J.M., SPRENT, J. & SURH, C.D. **The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery**. *Immunity*, 11, 173–181, 1999.
36. FEENEY, A.J. **Junctional sequences of fetal T cell receptor beta chains have few N regions**. *J. Exp. Med.*, 174, 115–124, 1991.
37. FEENEY, A.J, LAWSON, B.R, KONO, D.H & THEOFILOPOULOS, A.N. **Terminal deoxynucleotidyl transferase deficiency decreases autoimmune disease in MRL-Fas (lpr) mice**. *J. Immunol.*, 167, 3486–3493, 2001.
38. FIELD, E. H., GAO, Q., CHEN, N. X. & ROUSE, T. M. **Balancing the immune system for tolerance: A case for regulatory CD4 cells**. *Transplantation*, 64 (1), 1-7, 1997.
39. FONTENOT, J.D., RASMUSSEN, J.P., GAVIN, M.A. & RUDENSKY, A.Y. **A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells**. *Nat. Immunol.*, 6 (11), 1142-1151, 2005a
40. FONTENOT, J.D., DOOLEY, J.L., FARR, A.G. & RUDENSKY, A.Y. **Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny**. *J. Exp. Med.* 202, 901-906. 2005b.
41. FRY TJ, MACKALL CL. **The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance**. *J Immunol.* v.174, p.6571-6., 2005.

42. GALLEGOS, A.M. & BEVAN, M.J. **Central tolerance: good but imperfect.** *Immunol. Rev.*, 209, 290–296, 2006.
43. GAO, Q., ROUSE, T. M., KAZMERZAK, K. & FIELD, E. H. **CD4⁺CD25⁺ cells regulate CD8 cell anergy in neonatal tolerant mice.** *Transplantation*, 68 (12), 1891-1897, 1999.
44. GARCIA, A.M., FADEL, S.A., CAO, S. & SARZOTTI, M. **T cell immunity in neonates.** *Immunol. Rev.*, 22, 177-190, 2000.
45. GAVIN, M.A., CLARKE, S.R., NEGROU, E., GALLEGOS, A. & RUDENSKY, A. **Homeostasis and anergy of CD4(+)⁺CD25(+)⁺ suppressor T cells *in vivo*.** *Nat Immunol*, 3 (1), 33-41, 2002.
46. GAVIN, M.A. & RUDENSKY, A.Y. **Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4⁺ T cell.** *Curr. Opin. Immunol.*, 15 (6), 690-696, 2003.
47. GREGOIRE, K.E., GOLDSCHNEIDER, I., BARTON, R.W. & BOLLUM, F.J. **Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells in lymphohemopoietic tissues of rat and mouse.** *J. Immunol.*, 123, 1347, 1979.
48. GOLDRATH, A.W. & BEVAN, M.J. **Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts.** *Immunity*, 11, 183–190, 1999.
49. GUPTA, S., SHANG, W. & SUN, Z. **Mechanism regulating the development and function of natural regulatory T cells.** *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 56 (2), 85-102, 2008.
50. HAN, G.M., ZHAO, B., JEYASEELAN, S. & FENG, J.M. **Age-associated parallel increase of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory and CD44⁺CD4⁺ memory T cells in SJL/J mice.** *Cell Immunol.*, 258(2),188-196, 2009.
51. HARIBHAI, D., WILLIAMS, J.B., JIA, S., NICKERSON, D., SCHMITT, E.G., EDWARDS, B., ZIEGELBAUER, J., YASSAI, M., LI, S., RELLAND, L.M., WISE, P.M., CHEN, A., ZHENG, Y., SIMPSON, P.M., GORSKI, J., SALZMAN, N.H., HESSNER, M.J., CHALITA, T.A. & WILLIAMS, C.B. **A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity.** *Immunity*, 35, 109-122, 2011.
52. HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.** *Science*, 299, 1057–1061, 2003.

53. HSIEH, C.S., LEE, H.M. & LIO, C.W. **Selection of regulatory T cells in the thymus**. *Nat. Rev. Immunol.* 12(3), 157-167, 2012.
54. HSIEH, C.S., LIANG, Y., TYZNIK, A.J., SELF, S.G., LIGGITT, D. & RUDENSKY, A.Y. **Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺CD4⁺ T cell receptors**. *Immunity*. 21(2), 267-277, 2004.
55. HSIEH, C.S., ZHENG, Y., LIANG, Y., FONTENOT, J.D. & RUDENSKY, A.Y. **An intersection between the self-reactive regulatory and non regulatory T cell receptor repertoires**. *Nat. Immunol.*, 7 (4), 401-410, 2006.
56. HUEHN, J., K. SIEGMUND, J., LEHMANN, C., SIEWERT, U., HAUBOLD, M., FEUERER, G.F., DEBES, J., LAUBER, O., FREY, G.K., PRZYBYLSKI, G.K., NIESNER, U., DE LA ROSA, M., SCHMIDT, C.A., BRÄUER, R., BUER, J., SCHEFFOLD, A. & HAMANN, A. **Developmental stage, phenotype and migration distinguish naive and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells**. *J. Exp. Med.*, 199, 303–313, 2004.
57. HUEHN, J. & A. HAMANN. **Homing to suppress: address codes for Treg migration**. *Trends Immunol.*, 26, 632–636, 2005.
58. IVANOV, II & MANEL, N. **Induction of gut mucosal Th17 cells by segmented filamentous bacteria**. *Med. Sci.*, 26 (4), 352-355, 2010.
59. JORDAN, M.S., BOESTEANU, A., REED, A.J., PETRONE, A.L., HOLENBECK, A.E., LERMAN, M.A., NAJI, A. & CATON, A.J. **Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide**. *Nat. Immunol.*, 2, 301-306, 2001.
60. JORDAN, M.S, BOESTEANU, A., REED, A.J., PETRONE, A.L., HOLENBECK, A.E., LERMAN, M.A., NAJI, A. & CATON, A.J. **Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide**. *Nat. Immunol.*, 2(4), 301-306, 2001.
61. KIM, G.Y., LIGONS, D.L., HONG, C., LUCKEY, M.A., KELLER, H.R., TAI, X., LUCAS, P.J., GRESS, R.E. & PARK, J.H. **An In Vivo IL-7 Requirement for Peripheral Foxp3⁺ Regulatory T Cell Homeostasis**. *J. Immunol*, 188, 5859–5866, 2012.
62. KIRBERG, J.; BERNS, A. & VON BOEHMER, H. **Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex encoded molecules**. *J. Exp. Med.*, 186, 1269-1275, 1997.

63. KASPROWICZ, D.J., SMALLWOOD, P.S., TYZNIK, A.J. & ZIEGLER, S.F. **Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4(+) T cell effector function.** J. Immunol., 171, 1216, 2003.
64. KIN, C.H. **Regulation of FoxP3⁺ Regulatory T Cells and Th17 Cells by Retinoids.** Clin. Dev. Immunol., 2008, 1-12, 2008.
65. KOJIMA, A., TANAKA-KOJIMA, Y., SAKURA, T. & NISHIZUKA, Y. **Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice.** Lab. Invest., 34, 550, 1976.
66. LEE, D.S., AHN, C., ERNST, B., SPRENT, J. & SURH, C.D. **Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells.** Immunity, 10, 83–92, 1999.
67. LI, J., HUSTON, G. & SWAIN, S.L. **IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells.** J. Exp. Med., 198, 1807–1815, 2003.
68. LI J, PARK J, FOSS D, GOLDSCHNEIDER I. **Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus.** J. Exp. Med., 206, 607-22, 2009.
69. LI, M.O., SANJABI, S. & FLAVELL, R.A. **Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms.** Immunity, 25 (3), 455–471, 2006.
70. MAHAJAN, V.S., LESKOV, I.B. & CHEN, J. **Homeostasis of T cell diversity.** Cel. Mol. Immunol., 2 (1), 1-10, 2005.
71. MARIE, J.C.; LETTERIO, J.J.; GAVIN, M. & RUDENSKY, A.Y. **TGF-1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ T cells.** J.Exp.Med. 201, 1061–1067, 2005.
72. MIN B., MCHUGH, R., SEMPOWSKI, G.D., MACKALL C., FOUCRAS, G., PAUL. W.E. **Neonates support lymphopenia-induced proliferation.** Immunity, v. 18, p.131-140, 2003.
73. MIN, B., FOUCRAS, G., MEIER-SHELLERSHEIM, M. & PAUL, W.E. **Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 3874–3879, 2004.

74. MIN, B. & PAUL, W. E. **Endogenous proliferation: Burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings.** *Semin. Immunol*, 17 (3), 201-207, 2005.
75. MODIGLIANI, Y., BANDEIRA, A. & COUTINHO, A. **A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens.** *Immunol. Rev.*, 149, 155-159, 1996.
76. MOSES, C.T., THORSTENSON, K.M., JAMESON, S.C. & KHORUTS. A. **Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (3), 1185-1190, 2003.
77. MUCIDA, D., PARK, Y., KIM, G., TUROVSKAYA, O., SCOTT, I., KRONENBERG, M. & CHEROUTRE H **Reciprocal Th-17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid.** *Science*, 317, 5835, 256-260, 2007.
78. MUCIDA, D., PARK, Y. & CHEROUTRE, H. **From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine.** *Semin. Immunol.*, 1, 14-21, 2009.
79. PACHOLCZYK, R.; KRAJ, P. & IGNATOWICZ, L. **Peptide specificity of thymic selection of CD4⁺CD25⁺ T cells.** *J. Immunol.*, 168, 613-620, 2002.
80. PACHOLCZYK, R.; IGNATOWICZ, H.; KRAJ, P. & IGNATOWICZ, L. **Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Immunity*, 25 (2), 249-259, 2006.
81. PAPIERNIK, M.; DE MORAES, M.L; PONTOUX, C.; VASSEUR, F. & PENIT, C. **Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R a chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency.** *Int. Immunol.*, 10 (4), 371-378, 1998.
82. QIN, S., COBBOLD, S.P., POPE, H., ELLIOTT, J., KIOUSSIS, D., DAVIES, J. & WALDMANN, H. **Infectious transplantation tolerance.** *Science*, 259, 974-977, 1993.
83. ROBEY, I.F., PETERSON, M., HORWITZ, M.S., KONO, D.H., STRATMANN, T., THEOFILOPOULOS, A.N., SARVETNICK, N., TEYTON, L. & FEENEY A.J. **Terminal deoxynucleotidyltransferase deficiency decreases autoimmune disease in diabetes-prone nonobese diabetic mice and lupus-prone MRL-Fas(lpr) mice.** *J. Immunol.*, 172, 4624–4629, 2004.

84. ROTHENBERG, E. & TRIGLIA, D. **Clonal proliferation unlinked to terminal deoxynucleotidyl transferase synthesis in thymocytes of young mice.** J. Immunol., 130, 1627-1633, 1983.
85. ROUND, J.L. & MAZMANIAN, S.K. **Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 (27), 12204-12209, 2010.
86. SAKAGUCHI, S., TAKAHASHI, T. & NISHIZUKA, Y. **Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement f Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis.** J. Exp. Med., 156, 1577-1586, 1982.
87. SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., ASANO, M., ITOH, M., AND TODA, M. **Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** J. Immunol., 155, 1151-1164, 1995.
88. SAKAGUCHI, S., YANAGUCHI, T., NOMURA, T. & ONO, M. **Regulatory T cells and Immune tolerance.** Immunity, 133, 775-787, 2008.
89. SCHNEIDER, R., LEES, R.K., PEDRAZZINI, T., ZINKERNAGEL, R.M., HENGARTNER, H. & MACDONALD, H.R. **Postnatal disappearance of self-reactive (V γ 6⁺) cells from the thymus of Mls^a mice.** J. Exp. Med., 169, 2149-2158, 1989.
90. SCHUBERT, L.A., JEFFERY, E., ZHANG, Y., RAMSDELL, F. & ZIEGLER, S.F. **Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T Cell Activation.** J. Biol. Chem., 276 (40), 37672-37679. 2001.
91. SCOLLAY, R.G., BUTCHER, E.C. & WEISSMAN, I.L. **Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice.** Eur. J. Immunol., 10, 210, 1980.
92. SEDDON, B., TOMLINSON, P. & ZAMOYSKA, R. **Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells.** Nat. Immunol., 4, 680-686, 2003.
93. SHEVACH, E.M. **CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers.** Nat. Rev. Immunol., 2(6), 389-400, 2002.
94. SHI, H. Z. & QIN, X. J. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma.** Allergy, 60, 986-995, 2005.

95. SIEWERT, C., LAUER, U., CORDING, S., BOPP, T., SCHMITT, E., HAMANN, A. & HUEHN, J. **Experience-driven development: effector/memory-like alphaE⁺Foxp3⁺ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells.** *J. Immunol.*, 180, 146-155, 2008.
96. SINGH, B., READ, S., ASSEMAN, C., MALMSTROM, V., MOTTET, C., STEPHENS, L.A., STEPANKOVA, R., TLASKALOVA, H. & POWRIE, F. **Control of intestinal inflammation by regulatory T cells.** *Immunol. Rev.*, 182, 190-200, 2001.
97. SALOMON, B.; LENSCHOW, D.J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A. & BLUESTONE, J.A. **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** *Immunity*, 12(4), 431-440, 2000.
98. SIMONETTA, F., GESTERMANN, N., MARTINET, K.Z., BONIOTTO, M., TISSIÈRES, P., SEDDON, B. & BOURGEOIS, C. **Interleukin-7 Influences FOXP3⁺CD4⁺ Regulatory T Cells Peripheral Homeostasis.** *PLoS One*. 7, e36596, 2012.
99. SMITH, H., CHEN, I-M., KUBO, R. & TUNG, K.S.K. **Neonatal thymectomy results in a repertoire enriched in T cells deleted in the adult thymus.** *Science*, 245, 749, 1989.
100. STOCKINGER, B., KASSIOTIS, G. E BOURGEOIS, C. **Homeostasis and T cell regulation.** *Curr Opin Immunol*, v.16, n.6, p.775-9, 2004.
101. SUN, C.M., HALL, J.A., BLANK, R.B., BOULADOUX, N., OUKKA, M., MORA, J.R. & BELKAID, Y. **Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid.** *J. Exp. Med.*, 204, 1775-1785, 2007.
102. SUTO, A.; NAKAJIMA, H.; IKEDA, K.; KUBO, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SAITO, Y. & IWAMOTO, I. CD4(+)/CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood*, 99, 555–560, 2002.
103. TAAMS, L.S., SMITH, J., RUSTIN, M.H., SALMON, M., POULTER, L.W. & AKBAR, A.N. **Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population.** *Eur. J. Immunol.* 31, 1122-1131, 2001.

104. TAKEDA, S., RODEWALD, H.R., ARAKAWA, H., BLUETHMANN E H., SHIMIZU, T. **MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span.** *Immunity*, v. 5, n.3, p.217-228, 1996.
105. TAN, J.T., DUDL, E., LEROY, E., MURRAY, R., SPRENT, J., WEINBERG, K.I. & SURH, C.D. **IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15, 8732-8737, 2001.
106. TANCHOT C., LEMONNIER F.A., PÉRARNAU B., FREITAS, A.A. & ROCHA, B. **Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells.** *Science*, 276, 2057-2062, 1997.
107. TANG, Q., HENRIKSEN, K.J., BODEN, E.K., TOOLEY, A.J., YE J, SUBUDHI, S.K., ZHENG, X.X., STROM, T.B. & BLUESTONE, J.A. **Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *J. Immunol.*, 171, 7, 3348-3352, 2003.
108. THOMAS-VASLIN V, SALAÜN J, COLTEY M, VAIGOT P, FUCS R. **Kinetics and repertoire selection of T cells derived from the early waves of fetal thymus colonization after thymus grafting in allogeneic nude recipients.** *Scand J Immunol.* v.45, p. 482-486, 1997
109. THORNTON, A.M.; KORTY, P.E.; TRAN, D.Q.; WOHLFERT, E.A.; MURRAY, P.E.; BELKAID, Y. & SHEVACH, E.M. **Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells.** *J. Immunol.*, 184 (7), 3433-3441, 2010.
110. TROY, A.E. & SHEN, H. **Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition.** *J. Immunol.*, 170 (2), 672-676, 2003.
111. VERHAGEN, J. & WRAITH, D.C. **Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells."** *J. Immunol.* 185, 7129-7130, 2010.
112. VIRET, C., WONG, F.S. & JANEWAY JR, C.A. **Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition.** *Immunity*, 10, 559-568, 1999.

113. WANG, H.Y. & WANG, R.F. **Regulatory T cells and cancer**. *Curr. Opin. Immunol.*, 19, 217-223, 2007.
114. WILLIAMS, L.M. & RUDENSKY, A.Y. **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3**. *Nat. Immunol.*, 8(3), 277-284, 2007.
115. WING, K., FEHÉRVÁRI, Z. & SAKAGUCHI, S. **Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells**. *Intern. Immunol.*, 18 (7), 991-1000, 2006.
116. WONG, J., OBST, R., CORREIA-NEVES, M., LOSYEV, G., MATHIS, D. & BENOIST, C. **Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and non regulatory CD4⁺ T cells**. *J. Immunol.*, 178 (4), 7032-7041, 2007.
117. WOOD, K. J. & SAKAGUCHI, S. **Regulatory T cells in transplantation tolerance**. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(3), 199-210, 2003.
118. YAMAGUCHI, T., HIROTA, K., NAGAHAMA, K., OHKAWA, K., TAKAHASHI, T., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. **Control of immune responses by antigen- specific regulatory T cells expressing the folate receptor**. *Immunity*, 27, 145-159, 2007.
119. ZHENG, S.G., PU WANG, J.W., GRAY, J.D. & HORWITZ, D.A. **IL-2 is essential for TGF- β to convert naïve CD4⁺CD25⁻ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells**. *J. Immunol.*, 178 (4), 2018-2027, 2007.
120. ZUKLYS, S., BALCIUNAITE, G., AGARWAL, A., FASLER-KAN, E., PALMER, E. & HOLLANDER, G.A. **Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)**. *J. Immunol*, 165, 1976-1983, 2000.